



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**Efek pemberian mangiferin dibandingkan dengan pioglitazon  
terhadap resistensi insulin pada tikus yang diinduksi  
dengan diit tinggi fruktosa**

**TESIS**

**KURNIASARI  
NPM. 1206178685**

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
KEKHUSUSAN FARMAKOLOGI  
JAKARTA  
JUNI 2014**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**Efek pemberian mangiferin dibandingkan dengan pioglitazon  
terhadap resistensi insulin pada tikus yang diinduksi  
dengan diit tinggi fruktosa**

**TESIS**

**KURNIASARI  
NPM. 1206178685**

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
KEKHUSUSAN FARMAKOLOGI  
JAKARTA  
JUNI 2014**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**Efek pemberian mangiferin dibandingkan dengan pioglitazon  
terhadap resistensi insulin pada tikus yang diinduksi  
dengan diit tinggi fruktosa**

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Magister Ilmu Biomedik**

**KURNIASARI  
NPM. 1206178685**

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
KEKHUSUSAN FARMAKOLOGI  
JAKARTA  
JUNI 2014**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,  
dan sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar.**

**Nama : Kurniasari**

**NPM : 1206178685**

**Tanda Tangan :**



**Tanggal : 17 Juni 2014**

## HALAMAN PENGESAHAN

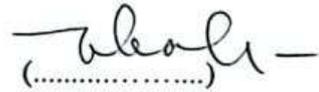
Tesis ini diajukan oleh:

Nama : Kurniasari  
NPM : 1206178685  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Judul Tesis : Efek Pemberian Mangiferin Dibandingkan dengan Pioglitazon terhadap Resistensi Insulin pada Tikus yang Diinduksi dengan Diit Tinggi Fruktosa

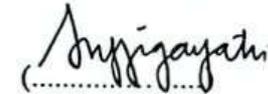
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas

### DEWAN PENGUJI

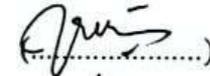
Pembimbing I : dr. Wawaimuli Arozal, PhD, M. Biomed

(.....) 

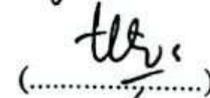
Pembimbing II : dr. Anggi Gayatri, Sp.FK

(.....) 

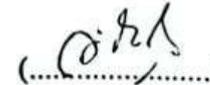
Penguji I : dr. Vivian Soetikno, Sp.FK, Ph.D

(.....) 

Penguji II : dr. Rr. Dyah P. Sulistianingsih, Sp.PD

(.....) 

Penguji III : Prof. Dr. dr. Sri Widia A. Jusman, MS

(.....) 

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 17 Juni 2014

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik

Dr. rer. Physiol. Dr. Septelia Inawati Wanandi



## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis ucapkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan berkat dan pertolongan-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul “Efek Pemberian Mangiferin Dibandingkan dengan Pioglitazon terhadap Resistensi Insulin pada Tikus yang Diinduksi dengan Diit Tinggi Fruktosa”. Tesis ini disusun untuk memenuhi persyaratan dalam memperoleh gelar Master Biomedik dari Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Penulis ingin mengucapkan terima kasih dan penghargaan sebesar-besarnya kepada dr. Wawaimuli Arozal, M.Biomed, PhD dan dr. Anggi Gayatri, SpFK selaku pembimbing yang telah bersedia meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan serta masukan berupa saran dan kritik kepada penulis sehingga tesis ini dapat diselesaikan. Ucapan terima kasih ini juga ingin penulis sampaikan kepada Dr. Melva Louisa, S.Si, Apt.,M. Biomed selaku ketua kekhususan yang telah memberikan motivasi, saran, dan dukungan selama penulis mengikuti pendidikan, saat mengerjakan penelitian, serta saat penulisan tesis berlangsung. Ucapan terima kasih juga ingin penulis sampaikan kepada para staf pengajar Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang telah membagi ilmu dan waktunya sehingga tesis ini dapat ditulis dengan baik. Selain itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada para laboran, yaitu Pak Arif, Pak Dede, Pak Rukmana, serta Chiswyta Chaliana yang telah banyak membantu dalam hal teknis kegiatan laboratorium.

Terima kasih sebesar-besarnya juga ingin disampaikan kepada kedua orang tua dan sahabat yang telah memberikan dukungan, saran, serta kritik sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Penulis menyadari bahwa tesis yang ditulis ini masih memiliki banyak sekali kekurangan. Harapan penulis semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Jakarta, Juni 2013

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Kurniasari  
NPM : 1206178685  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Departemen : Farmakologi dan Terapeutik  
Fakultas : Kedokteran  
Jenis karya : Tesis

demikian pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Rights*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**Efek pemberian mangiferin dibandingkan dengan pioglitazon terhadap resistensi insulin pada tikus yang diinduksi dengan diit tinggi fruktosa**

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan hak bebas royalti noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Jakarta

Pada tanggal: 17 Juni 2014

Yang menyatakan



Kurniasari

## ABSTRAK

Nama : Kurniasari  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Judul : Efek Pemberian Mangiferin dibandingkan dengan Pioglitazon terhadap Resistensi Insulin pada Tikus yang Diinduksi dengan Diit Tinggi Fruktosa

**Latar Belakang:** Mangiferin (MGR) adalah glikosida xanton yang pertama kali diisolasi dari *Mangifera indica*. Efek anti hiperglikemik dan anti hiperlipidemik MGR merupakan akibat dari aktivasi *peroxisome proliferator activated gamma* (PPAR $\gamma$ ) dan *AMP-activated protein kinase* (AMPK). Aktivasi PPAR $\gamma$  menyebabkan peningkatan transkripsi gen *glucose transporter 4* (GLUT4) sedangkan aktivasi AMPK menyebabkan stimulasi translokasi GLUT4 ke membran sel serta peningkatan oksidasi asam lemak. Mekanisme tersebut sama dengan tiazolidinedion (TZD), yaitu obat yang digunakan untuk pengobatan resistensi insulin.

**Metode:** Tikus Spraque Dawley jantan diinduksi resistensi insulin selama 6 minggu dengan memberikan larutan fruktosa 60% melalui sonde dan fruktosa 10% sebagai air minum. Setelah induksi resistensi insulin selesai dilakukan terapi dengan MGR 50 mg/kgBB/hari atau MGR 100 mg/kgBB/hari atau pioglitazon (PIO) 3 mg/kgBB/hari diberikan selama 4 minggu dan selama itu induksi fruktosa tetap dilakukan. Pemeriksaan kadar glukosa, trigliserida, insulin, dan perhitungan nilai HOMA-IR dilakukan pada akhir minggu ke-6 sedangkan kadar kolesterol total plasma puasa, kadar protein kinase C alfa otot, serta tingkat ekspresi mRNA GLUT4 otot dan lemak diperiksa pada akhir minggu ke-10.

**Hasil:** Pada tikus dengan resistensi insulin yang mendapatkan MGR 50 mg/kgBB/hari dan MGR 100 mg/kgBB/hari terdapat kecenderungan penurunan kadar trigliserida dan kolesterol total puasa, sedangkan kecenderungan penurunan kadar glukosa dan insulin puasa serta nilai HOMA-IR ditemukan pada kelompok yang mendapatkan MGR 50 mg/kgBB/hari bila dibandingkan dengan kelompok yang tidak mendapatkan terapi (IND FRK). Pada kelompok yang mendapatkan PIO 3 mg/kgBB/hari terdapat penurunan kadar glukosa, trigliserida, insulin, kolesterol total puasa, dan nilai HOMA-IR yang berbeda bermakna dengan kelompok IND FRK. Peningkatan ekspresi mRNA GLUT4 pada jaringan otot dan lemak terlihat pada kelompok yang mendapatkan MGR dan PIO, dan peningkatan ekspresi tersebut sedikit lebih besar pada kelompok yang mendapatkan PIO. Pada pemeriksaan kadar PKC $\alpha$  tidak ditemukan adanya perbedaan yang bermakna di semua kelompok.

**Kesimpulan:** Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian MGR 50 mg/kgBB memiliki potensi untuk memperbaiki resistensi insulin meskipun perbaikan tersebut masih belum optimal dibandingkan dengan kelompok yang mendapatkan PIO 3 mg/kgBB/hari.

**Kata kunci:** mangiferin, resistensi insulin, HOMA-IR, mRNA GLUT4, fruktosa

## ABSTRACT

Name : Kurniasari  
Study Program : Biomedical Science  
Title : Effect of Mangiferin versus Pioglitazon Against Insulin Resistance in Rats Induced by High Fructose Diet

**Introduction:** Mangiferin (MGR) is a glucoside xanthone that is first isolated from *Mangifera indica*. Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effect of mangiferin related to activation of *peroxisome proliferator activated gamma* (PPAR $\gamma$ ) and *AMP-activated protein kinase* (AMPK). Mangiferin act as PPAR $\gamma$  agonist and activate glucose transporter 4 (GLUT4) gene transcription while activation of AMPK leads to GLUT4 translocation to cell membrane and fatty acids oxidation. This mechanism are same as tiazolidinedion (TZD), which is one of medicine used for insulin resistance treatment.

**Method:** Male Spraque-Dawley rats are fed with high fructose concentration (60% on direct oral and 10% in drinking water) for 6 weeks (IND FRK) to induced insulin resistance. Treatment with MGR 50 mg/kgBW/day or 100 mg/kgBW/day or pioglitazone (PIO) 3 mg/kgBW/day is given for 4 weeks after insulin resistance induction. Fasting plasma glucose, triglyceride, insulin, and HOMA-IR value are measured in the end of sixth and tenth week. Fasting plasma total cholesterol, muscle protein kinase C (PKC $\alpha$ ) level, and mRNA GLUT4 expression level in muscle and white adipose tissue are measured in the end of tenth week.

**Result:** In this study we found that MGR 50 mg/kgBW and MGR 100 mg/kgBW had tendention to decreased fasting plasma triglyceride and total cholesterol, while MGR 50 mg/kgBW/day also had tendention to decreased fasting plasma glucose and insulin, and HOMA-IR value. In PIO treated rats, there were significant decrease of fasting plasma glucose, triglyceride, insulin, and total cholesterol, and HOMA-IR value compared with untreated rats. Increase expression level of mRNA GLUT4 in muscle and adipose tissue were observed in rats given MGR 50 and 100 mg/kgBW/day and PIO 3 mg/kgBW/day. Expression level of muscle and adipose mRNA GLUT4 in PIO treated rats were higher than in MGR treated rats. In all study groups there were no significant difference of muscle PKC $\alpha$  level.

**Conclusion:** MGR 50 mg/kgBW/day has potention to improve insulin resistance even though this effect less than PIO 3 mg/kgBW/day.

**Key Words:** mangiferin, insulin resistance, HOMA-IR, mRNA GLUT4, fructose

## DAFTAR ISI

Halaman Pernyataan Orisinalitas.....	ii
Halaman Pengesahan.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Lembar Persetujuan Publikasi Ilmiah.....	v
Abstrak.....	vi
Abstract.....	vii
Daftar Isi.....	viii
Daftar Gambar.....	xi
Daftar Tabel.....	xii
Daftar Lampiran.....	xiii
Daftar Singkatan.....	xiv
<b>BAB I. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	5
Kerangka teori.....	6
Kerangka konsep.....	7
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>8</b>
2.1. Insulin.....	8
2.1.1. Sekresi Insulin.....	8
2.1.2. Jalur Signal Transduksi Insulin.....	10
2.1.3. Resistensi Insulin.....	11
2.2. Fruktosa.....	13
2.2.1. Metabolisme Fruktosa.....	13
2.2.2. Fruktosa dan Resistensi Insulin.....	14

2.2.3. Induksi Resistensi Insulin dengan Diit Tinggi Fruktosa pada Hewan Coba.....	15
2.3. GLUT4 dan Resistensi Insulin.....	16
2.4. PKC alfa dan Resistensi Insulin.....	17
2.5. Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance (HOMA-IR).	18
2.6. Terapi Resistensi Insulin.....	19
2.6.1. Tiazolidinedion.....	18
2.6.1.1. Mekanisme Kerja.....	19
2.6.1.2. Efek Samping.....	20
2.6.2. Mangiferin.....	21
2.6.2.1. Efek Terapetik.....	22
2.6.2.2. Absorpsi dan Toksisitas Mangiferin pada Pemberian Oral.....	24
<b>BAB III. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>25</b>
3.1. Disain Penelitian.....	25
3.2. Waktu dan Tempat Penelitian.....	25
3.3. Bahan dan Alat Penelitian.....	26
3.4. Prosedur Penelitian.....	26
3.5. Protokol Penelitian.....	27
3.5.1. Bagan Kerja Penelitian.....	28
3.5.2. Cara Kerja.....	29
3.5.3. Pembuatan Larutan Fruktosa.....	30
3.5.4. Penetapan Kadar Glukosa, Trigliserida, dan Kolesterol Total.....	30
3.5.5. Penetapan Kadar Insulin.....	30
3.5.6. Pembuatan Homogenat dan Pemeriksaan Kadar PKC alfa.....	31
3.5.7. Pemeriksaan Kadar Protein Total.....	31
3.5.8. Pembuatan Homogenat dan Isolasi RNA.....	31
3.5.9. Sintesis cDNA.....	32
3.5.10. Real-Time PCR.....	32
3.5.11. Perhitungan Ekspresi gen GLUT4.....	32

3.5.12. Perhitungan Nilai HOMA-IR.....	32
3.5.13. Pengolahan dan analisa data.....	33
<b>BAB VI. HASIL PENELITIAN.....</b>	<b>34</b>
4.1. Pemantauan Perubahan Berat Badan Tikus selama 10 Minggu.....	34
4.2. Pemeriksaan Kadar Glukosa Plasma.....	35
4.3. Pemeriksaan Kadar Trigliserida Plasma.....	36
4.4. Pemeriksaan Kadar Insulin Plasma.....	36
4.5. Perhitungan Nilai HOMA-IR.....	37
4.6. Pemeriksaan Kadar Kolesterol Total Plasma.....	38
4.7. Pemeriksaan Kadar PKC alfa pada Jaringan Otot.....	38
4.8. Pemeriksaan Ekspresi mRNA GLUT4 pada Jaringan Otot.....	40
4.9. Pemeriksaan Ekspresi mRNA GLUT4 pada Jaringan Lemak.....	40
<b>BAB V. PEMBAHASAN.....</b>	<b>41</b>
<b>BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>48</b>
6.1. Kesimpulan.....	48
6.2. Saran.....	48
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>50</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>57</b>
<b>KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK.....</b>	<b>65</b>
<b>DRAFT ARTIKEL.....</b>	<b>66</b>
<b>BIODATA PENULIS.....</b>	<b>74</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Jalur signal transduksi insulin.....	11
Gambar 2.2. Metabolisme fruktosa.....	14
Gambar 2.3. Struktur kimia mangiferin.....	22
Gambar 4.1. Berat badan rata-rata tiap kelompok selama 10 minggu.....	35
Gambar 4.2. Kadar glukosa minggu ke-6 dan ke-10.....	35
Gambar 4.3. Kadar trigliserida minggu ke-6 dan ke-10.....	36
Gambar 4.4. Kadar insulin minggu ke-6 dan ke-10.....	37
Gambar 4.5. Nilai HOMA-IR minggu ke-6 dan ke-10.....	37
Gambar 4.6. Kadar kolesterol total minggu ke-10.....	38
Gambar 4.7.1. Kadar PKC $\alpha$ pada pemeriksaan ELISA.....	39
Gambar 4.7.2. Kadar protein total.....	39
Gambar 4.7.3. Kadar PKC $\alpha$ dalam pg/mg protein.....	40
Gambar 4.8. Ekspresi mRNA GLUT4 pada otot <i>vastus lateralis</i> .....	40
Gambar 4.9. Ekspresi mRNA GLUT4 pada lemak intraperitoneal.....	41

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Berat badan awal dan akhir, delta berat badan, berat otot vastus lateralis, dan berat lemak intraperitoneal.....	35
---	----

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Contoh kurva standar penelitian.....	57
Lampiran 2. Data berat badan.....	59
Lampiran 3. Data pemeriksaan parameter minggu ke-6.....	53
Lampiran 4. Data pemeriksaan parameter minggu ke-10.....	60
Lampiran 5. Data tingkat ekspresi mRNA GLUT4 pada otot.....	61
Lampiran 6. Data tingkat ekspresi mRNA GLUT4 pada lemak.....	62
Lampiran 7. Data kadar PKC alfa pada otot.....	63

## DAFTAR SINGKATAN

VLDL	: <i>very low density lipoprotein</i>
PKC $\alpha$	: protein kinase C isoform alfa
TZD	: <i>tiazolidinedion</i>
PPAR $\gamma$	: <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
AMPK	: <i>AMP-activated protein kinase</i>
NF $\kappa$ B	: <i>nuclear factor kappa B</i>
LD <sub>50</sub>	: <i>Lethal dose 50</i>
FFA	: <i>free fatty acid</i>
GLUT4	: <i>glucose transporter-4</i>
HSL	: <i>hormon sensitive lipase</i>
GLP-1	: <i>glucose like peptide-1</i>
GIP	: <i>glucose dependent insulinotropic polypeptide</i>
GLUT2	: <i>glucose transporter-2</i>
ATP	: <i>adenosine triphosphate</i>
K <sub>ATP</sub>	: <i>K<sup>+</sup> ATP sensitive channel</i>
VDCC	: <i>voltage dependent calcium channel</i>
Asetil KoA	: <i>asetil koenzim A</i>
CPT-1	: <i>carnitine palmitoyltransferase 1</i>
DAG	: <i>diasilgliserol</i>
cAMP	: <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
PKA	: <i>protein kinase A</i>
cAMP-GEFII	: <i>cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II</i>
SUR1	: <i>sulfonylurea receptor 1</i>
PI3K	: <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
IR	: <i>reseptor insulin</i>

IRS	: <i>insulin receptor substrate</i>
SH2	: <i>src-homology-2</i>
[PI(3,4)P2]	: <i>phosphatidylinositol 3,4 biphosphate</i>
[PI(3,4,5)P3]. [PI(3,4,5)P3]	: <i>phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate</i>
PDK-1	: <i>phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
MAPK	: <i>ras-mitogen activated protein kinase</i>
UPR	: <i>unfolded protein response</i>
PKC $\Theta$	: <i>protein kinase C isoform teta</i>
IKK	: <i>inhibitor of <math>\kappa</math>B kinase</i>
JNK	: <i>jun N-terminal kinase</i>
TNF- $\alpha$	: <i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
MCP-1	: <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
IL-6	: <i>interleukin-6</i>
IL-1 $\beta$	: <i>interleukin-1<math>\beta</math></i>
SOCS	: <i>protein suppressor of cytokine signaling</i>
NO	: <i>nitric oxide</i>
TG	: <i>trigliserida</i>
SREBP-1c	: <i>sterol regulatory element-binding protein-1c</i>
ChREBP	: <i>carbohydrate regulatory element-binding protein</i>
FIRI	: <i>fasting insulin resistance index</i>
cPKC	: <i>PKC tipe klasik</i>
nPKC	: <i>PKC tipe novel</i>
aPKC	: <i>PKC tipe atipikal</i>
HOMA-IR	: <i>Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance</i>
LBD	: <i>ligand binding domain</i>
RXR	: <i>retinoid X receptor</i>
PPRE	: <i>peroxisome proliferator response element</i>

MAPK	: <i>mitogen activated protein kinase</i>
ACC	: <i>acetyl-CoA carboxylase</i>
LXR $\alpha$	: <i>liver X receptor-<math>\alpha</math></i>
RANKL	: <i>receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand</i>
RANK	: <i>receptor activator of nuclear factor-kappaB</i>
2-DG	: <i>2-deoxy-glucose</i>
AICAR	: <i>aminoimidazole carboxamide ribonucleotide</i>
MAPK/ERK	: <i>Mitogen-activated protein kinases/Extracellular signal-regulated</i>

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Kebiasaan dan gaya hidup manusia saat ini memberikan dampak yang besar bagi kesehatan. Berat badan lebih dan obesitas telah menjadi masalah kesehatan yang sering ditemukan bahkan pada anak dan remaja.<sup>1</sup> Pada tahun 2012, sekitar 12% dari penduduk dunia menderita obesitas.<sup>2</sup> Di Indonesia prevalensi obesitas pada individu usia lebih dari 18 tahun adalah 11,7% sedangkan prevalensi berat badan lebih pada kelompok dengan usia yang sama adalah 10%. Data tersebut berdasarkan Rinkesdas tahun 2010.<sup>3</sup> *World Health Statistics*, pada tahun yang sama melaporkan bahwa 10% dari penduduk dunia memiliki kadar glukosa darah di atas normal.<sup>2</sup> Di Indonesia, berdasarkan data dari Riset Kesehatan Dasar tahun 2007, prevalensi diabetes di daerah perkotaan adalah 5,7%.<sup>4</sup>

Obesitas terutama obesitas sentral dapat menyebabkan resistensi insulin. Obesitas sentral dan resistensi insulin bersama dengan intoleransi glukosa, dislipidemia dan hipertensi merupakan komponen dari sindrom metabolik, yang diketahui dapat meningkatkan risiko penyakit kardiometabolik.<sup>1</sup> Penyakit kardiometabolik yang sering ditemukan adalah diabetes melitus tipe 2, penyakit jantung koroner, dan stroke.

Salah satu kebiasaan yang memiliki peranan besar dalam menyebabkan terjadinya obesitas adalah pola makan yang tidak sehat. Hal ini terlihat dari kebiasaan masyarakat sekarang mengonsumsi makanan ringan dan minuman berkemasan. Kebiasaan mengonsumsi fruktosa kadar tinggi seperti yang terdapat dalam berbagai macam makanan serta minuman berkemasan merupakan salah satu faktor yang berperan pada peningkatan kejadian obesitas yang disertai dengan resistensi insulin. Penelitian yang menggunakan model induksi resistensi insulin dengan menggunakan diet tinggi fruktosa pada berbagai spesies hewan coba telah banyak dilakukan. Hasil yang diperoleh bervariasi berupa peningkatan

berat badan, penurunan sensitifitas insulin, dan hipertrigliseridemia.<sup>5</sup> Ketiga keadaan tersebut dapat ditemukan pada individu dengan sindrom metabolik.

Fruktosa merupakan monosakarida yang memegang peranan penting dalam menyebabkan terjadinya resistensi insulin. Hal ini dikarenakan oleh adanya peningkatan *lipogenesis de novo* di hati pada konsumsi fruktosa yang berlebih. Peningkatan *lipogenesis de novo* akan menyebabkan peningkatan sekresi dan penurunan klirens *very low density lipoprotein* (VLDL)-triasilgliserol sehingga mengakibatkan terjadinya hipertriasilgliserolemia. Keadaan inilah yang menyebabkan peningkatan lemak visceral dan penumpukan lemak ektopik di otot. Kedua hal inilah yang secara langsung memegang peranan dalam terjadinya resistensi insulin.<sup>5-8</sup>

Pada individu dengan resistensi insulin terjadi gangguan signal transduksi insulin sehingga respon sel terhadap insulin menurun. Salah satu protein yang berperan dalam regulasi signal transduksi insulin adalah protein kinase C isoform alfa (PKC $\alpha$ ) seperti yang dikemukakan dalam penelitian yang dilakukan oleh Cipok dkk dan Oriente dkk.<sup>9,10</sup> Selain itu, Avignon dkk<sup>11</sup> menemukan hubungan antara kadar dan aktivasi PKC $\alpha$  dengan resistensi insulin. Pada penelitian tersebut ditemukan bahwa pada tikus Goto-Kakizaki terdapat peningkatan kadar dan aktivasi PKC $\alpha$  di membran sel serta penurunan kadar dan aktivasi PKC $\alpha$  di sitosol.

Saat ini terapi resistensi insulin salah satunya adalah dengan menggunakan obat golongan tiazolidinedion (TZD). TZD merupakan agonis *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ) dan aktifator *AMP-activated protein kinase* (AMPK) yang digunakan untuk mengatasi resistensi insulin. TZD. Akan tetapi, penggunaan TZD jangka panjang dapat menyebabkan terjadinya beberapa efek samping yang cukup serius, seperti edema, peningkatan berat badan, dan kehilangan massa tulang.<sup>12,13</sup> Peningkatan berat badan terjadi akibat peningkatan jaringan lemak subkutan dan retensi cairan,<sup>13</sup> Kehilangan massa tulang menyebabkan terjadinya osteoporosis sedangkan adanya retensi cairan dapat meningkatkan risiko terjadinya gagal jantung kongestif.<sup>12,13</sup> Oleh karena itu, penemuan obat lain yang memiliki efek samping yang lebih ringan perlu dilakukan.

Salah satu kandidat terapi resistensi insulin yang diharapkan lebih aman adalah mangiferin. Mangiferin adalah glukosida xanton yang banyak terdapat pada berbagai tanaman seperti *Mangifera indica*, *Anemarrhena asphodeloides*, dan *Salacia oblonga*.<sup>14-16</sup> Mangiferin telah dibuktikan melalui penelitian *in vitro* dan *in vivo* memiliki efek anti diabetik<sup>16</sup> dan anti hiperlipidemik.<sup>14</sup> Pada penelitian yang dilakukan oleh Mahali SK dan Manna SK<sup>17</sup> pada tahun 2012 ditemukan bahwa mangiferin dapat berikatan dengan *ligand binding domain* PPAR $\gamma$  meningkatkan kemampuan PPAR $\gamma$  untuk berikatan dengan DNA.<sup>17</sup> Selain itu, ditemukan bahwa mangiferin juga mencegah terjadinya *down regulation* PPAR $\gamma$  dengan cara menghambat aktivasi *nuclear factor kappa B* (NF $\kappa$ B). Dimitrov M dkk<sup>18</sup> yang melakukan penelitian pada tahun 2011 menemukan bahwa mangiferin yang diberikan secara oral praktis tidak toksik. Akan tetapi, absorpsi mangiferin kurang baik pada pemberian oral. Pada penelitian tersebut disebutkan bahwa LD<sub>50</sub> mangiferin yang diberikan secara oral pada mencit adalah 4984 mg/kgBB.<sup>18</sup>

Salah satu penelitian yang telah dilakukan untuk melihat potensi mangiferin untuk mengatasi sindrom metabolik adalah penelitian yang dilakukan pada tahun 2012 oleh Niu Y dkk.<sup>14</sup> Penelitian dilakukan dengan menggunakan sel HepG2 yang diberikan asam oleat dan tikus Wistar yang diinduksi dengan diet tinggi lemak. Dari penelitian tersebut diketahui bahwa terdapat penurunan kadar asam lemak bebas (FFA) secara signifikan pada kelompok hiperlipidemia yang diberikan mangiferin bila dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok hiperlipidemia tanpa perlakuan. Hal ini dikarenakan mangiferin mempromosikan katabolisme FFA di hepar melalui aktivasi AMPK. Pengaruh mangiferin terhadap penurunan kadar FFA ini penting karena kadar FFA yang tinggi dapat menyebabkan terjadinya resistensi insulin.<sup>14</sup> Pada penelitian lain yang dilakukan Giron MD dkk<sup>16</sup> dengan menggunakan mangiferin yang diisolasi dari *Salacia oblonga* ditemukan bahwa mangiferin menstimulasi *uptake* glukosa pada sel otot rangka L6 dan sel adiposit 3T3. Stimulasi *uptake* glukosa oleh mangiferin lebih besar dibandingkan dengan rosiglitazon dan metformin. Mangiferin meningkatkan translokasi GLUT4 ke membran plasma dan menstimulasi ekspresi protein GLUT4. Dua jalur signal mangiferin melibatkan aktivasi PPAR $\gamma$  dan peningkatan fosforilasi 5' AMPK.<sup>16</sup>

Pada penelitian ini digunakan tikus yang diinduksi dengan diit tinggi fruktosa sehingga terjadi resistensi insulin.<sup>19,20</sup> Pemberian diit tinggi fruktosa diharapkan menyebabkan resistensi insulin, yang terlihat dari peningkatan kadar glukosa dan insulin plasma puasa serta peningkatan nilai HOMA-IR. Pada penelitian ini dilakukan pengukuran kadar insulin, glukosa, trigliserida, dan kolesterol total pada plasma, serta kadar PKC $\alpha$  pada jaringan otot dan ekspresi mRNA GLUT-4 pada jaringan otot dan lemak. Pemberian mangiferin diharapkan dapat menurunkan kadar glukosa, trigliserida, dan kolesterol total plasma puasa, serta memperbaiki hiperinsulinemia dan nilai HOMA-IR. Selain itu, juga diharapkan terjadi peningkatan ekspresi mRNA GLUT4 pada jaringan otot dan lemak dan juga peningkatan kadar PKC $\alpha$  di sitosol sel. Penelitian ini terutama akan berfokus pada PKC $\alpha$  dan mRNA GLUT4. PKC $\alpha$  berperan dalam jalur transduksi sinyal insulin dan aktivasi PKC $\alpha$  berhubungan dengan resistensi insulin. GLUT4 berperan dalam *uptake* glukosa ke dalam sel melalui perantaraan insulin sehingga peningkatan ekspresi mRNA GLUT4 akibat dari pemberian mangiferin dapat memperbaiki resistensi insulin. Efek mangiferin akan dibandingkan dengan obat golongan tiazolidenidion, yakni pioglitazon yang telah terbukti efektif dalam mengatasi resistensi insulin.

### **1.2. Rumusan masalah**

Mangiferin diketahui memiliki efek anti hiperglikemik dan anti hiperlipidemik. Akan tetapi, efek pemberian mangiferin terhadap resistensi insulin sampai saat ini masih belum diketahui.

### **1.3. Tujuan penelitian**

Tujuan umum:

Menganalisis pengaruh pemberian mangiferin dibandingkan dengan pioglitazon terhadap resistensi insulin pada tikus yang diinduksi dengan diit tinggi fruktosa.

Tujuan khusus:

1. Menganalisis pengaruh pemberian mangiferin dibandingkan dengan pioglitazon terhadap resistensi insulin pada tikus yang diinduksi dengan

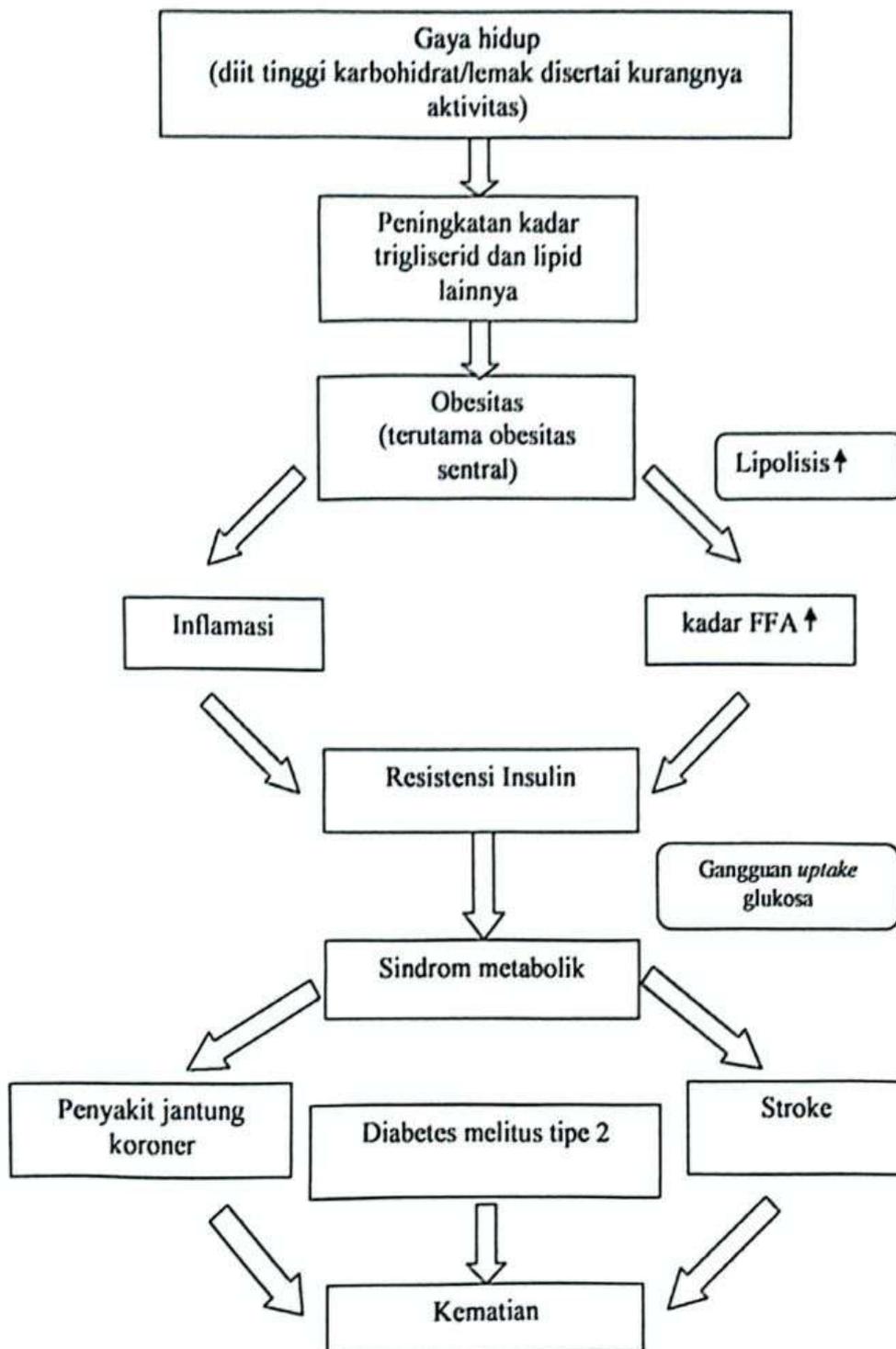
diit tinggi fruktosa melalui pemeriksaan kadar insulin, glukosa, trigliserida, dan kolesterol total dalam darah.

2. Menganalisis pengaruh pemberian mangiferin dibandingkan dengan pioglitazon terhadap resistensi insulin pada tikus yang diinduksi dengan diit tinggi fruktosa melalui pemeriksaan ekspresi mRNA GLUT-4 pada jaringan otot dan lemak viseral.
3. Menganalisis pengaruh pemberian mangiferin dibandingkan dengan pioglitazon terhadap resistensi insulin pada tikus yang diinduksi dengan diit tinggi fruktosa melalui pemeriksaan kadar PKC $\alpha$  pada jaringan otot

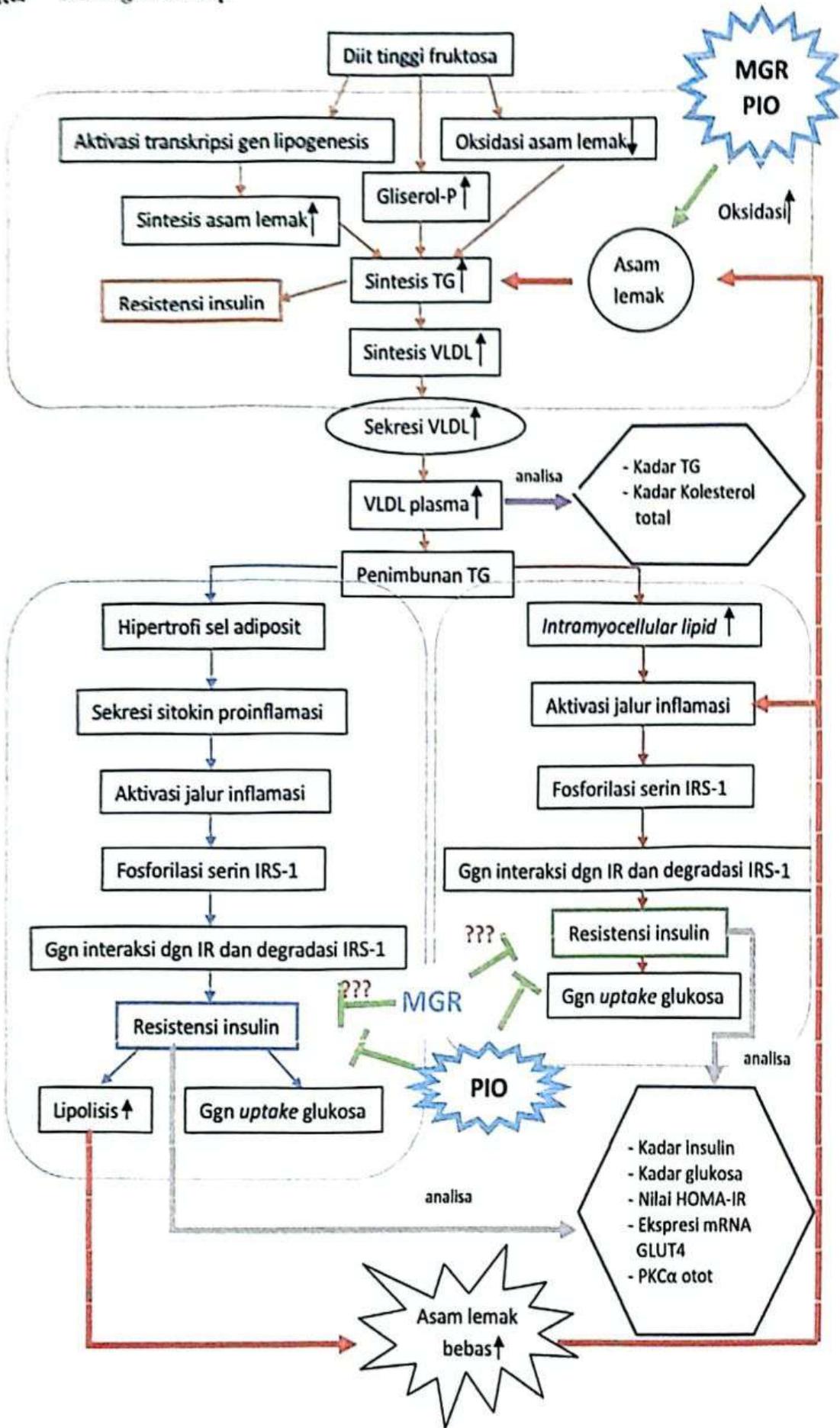
#### **1.4. Manfaat penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar penelitian selanjutnya baik studi pada hewan maupun pada manusia untuk menilai potensi mangiferin sebagai pilihan terapi atau terapi adjuvan resistensi insulin dengan efek samping minimal pada pasien dengan resistensi insulin.

## 1.5. Kerangka teori



1.6 Kerangka konsep



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Insulin

Insulin adalah hormon anabolik paling poten yang diketahui sampai saat ini. Peranan insulin sangat penting, antara lain sebagai promotor sintesa dan penyimpanan karbohidrat, lipid, dan protein, serta menghambat degradasi dan pelepasan kembali ke sirkulasi.<sup>21</sup> Hepar, otot skelet, dan jaringan adiposa adalah organ target kerja insulin. Pada otot skelet dan jaringan adiposa terjadi stimulasi translokasi transporter glukosa (GLUT) 4. Insulin juga berperan dalam menurunkan aktifitas *hormon sensitive lipase* (HSL) sehingga menghambat efluks asam lemak bebas keluar dari sel adiposit.<sup>22</sup>

##### 2.1.1. Sekresi insulin

Sekresi insulin ke sirkulasi darah dipengaruhi oleh kadar glukosa darah. Peningkatan kadar glukosa darah akan merangsang sekresi insulin yang terjadi terutama terjadi setelah konsumsi makanan yang mengandung glukosa. Hal ini dipengaruhi oleh kerja hormon inkretin, yaitu: *glucose like peptide-1* (GLP-1) dan *glucose dependent insulinotropic polypeptide* (GIP). GIP disekresikan oleh sel K yang terdapat di duodenum dan jejunum bagian proksimal sedangkan GLP-1 disekresikan oleh sel L yang terdapat pada usus kecil bagian distal dan kolon. Kadar kedua hormon ini mulai naik pada 10-15 menit setelah konsumsi makanan.<sup>23,24</sup>

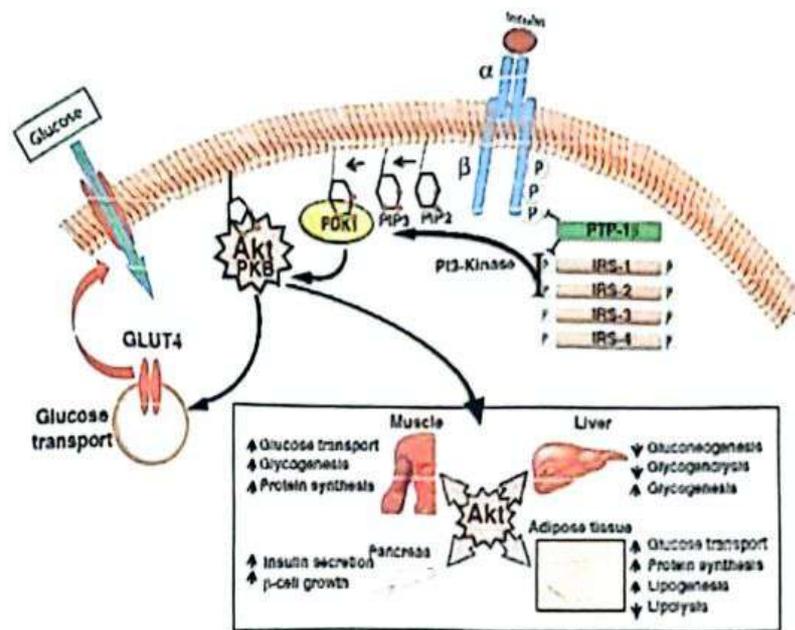
Glukosa yang ada di dalam sirkulasi darah masuk ke dalam sel beta pankreas melalui perantara GLUT2. Kemudian glukosa tersebut akan dimetabolisme dan masuk ke dalam siklus krebs di mitokondria dan menghasilkan *adenosine triphosphate* (ATP). Hal ini menyebabkan peningkatan kadar ATP yang akan mengakibatkan penutupan *K<sup>+</sup> ATP sensitive channel* ( $K_{ATP}$ ) sehingga terjadi depolarisasi membran sel. Depolarisasi membran sel menyebabkan terbukanya *voltage dependent calcium channel* (VDCC) sehingga terjadi influks  $Ca^{2+}$  ke dalam sel yang disertai dengan peningkatan kadar  $Ca^{2+}$  sitosol. Selain

meningkatkan kadar ATP, metabolisme glukosa juga meningkatkan kadar sitrat di dalam sel. Sitrat diperlukan untuk sintesis malonil KoA yang berperan dalam inhibisi terhadap *carnitine palmitoyltransferase 1* (CPT-1). Inhibisi tersebut akan menyebabkan terjadinya peningkatan asil KoA rantai panjang di sitosol, yang berperan sebagai mediator sekresi insulin melalui esterifikasi  $\alpha$ -gliserol fosfat sehingga terbentuk diasilgliserol (DAG). DAG tersebut kemudian akan mengaktifasi protein kinase C (PKC). Aktifasi PKC menyebabkan peningkatan kadar  $Ca^{2+}$  intrasel yang kemudian akan menyebabkan fusi vesikel yang mengandung granula-granula insulin dengan membran sel sehingga terjadi sekresi insulin.<sup>25-27</sup>

GIP dan GLP-1 menstimulasi sekresi insulin melalui ikatan dengan reseptornya masing-masing di sel beta pankreas. Ikatan tersebut menyebabkan aktifasi adenilat siklase yang kemudian akan menyebabkan peningkatan kadar *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) intraseluler. Adanya peningkatan kadar cAMP menyebabkan aktifasi protein kinase A (PKA) dan *Epac2/cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II* (cAMP-GEFII). Aktifnya PKA menyebabkan fosforilasi subunit *sulfonylurea receptor 1* (SUR1) sehingga mengakibatkan penutupan saluran  $K_{ATP}$  dan memfasilitasi terjadinya depolarisasi membran. PKA bersama dengan *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) menyebabkan inhibisi saluran  $K_v$  sehingga terjadi perpanjangan potensial aksi. Depolarisasi membran menyebabkan *voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels* (VDCC) terbuka sehingga terjadi konsentrasi  $Ca^{2+}$  intrasel yang memicu fusi granula-granula yang mengandung insulin dengan membran plasma dan meningkatkan sekresi insulin dari sel beta pankreas. Selain itu, mobilisasi  $Ca^{2+}$  menstimulasi sintesis ATP di mitokondria, yang menyebabkan semakin meningkatnya depolarisasi membran sel melalui penutupan saluran  $K_{ATP}$ . Peningkatan kadar  $Ca^{2+}$  intrasel juga mempromosikan transkripsi gen proinsulin. Faktor transkripsi Pdx-1 merupakan target penting aksi GLP-1 pada ekspresi gen insulin. Pengurangan atau eliminasi ekspresi Pdx-1 berasosiasi dengan penurunan ekspresi GLP-1R dan hilangnya efek GLP-1 pada sel beta. Aktifasi Epac2 menyebabkan peningkatan densitas granula-granula yang mengandung insulin dan berada di dekat membran plasma sehingga memfasilitasi sekresi insulin dari sel beta.<sup>24,28</sup>

### 2.1.2. Jalur signal insulin

Reseptor insulin (IR) terdiri dari sub-unit  $\alpha$  dan sub-unit  $\beta$ . Terdapat dua isoform IR, yaitu IR-A dan IR-B. IR-B adalah bentuk isoform IR yang memiliki 12 asam amino pada gugus karboksil terminal pada sub-unit  $\alpha$ , sedangkan IR-A tidak. IR-B lebih banyak terdapat di hepar, otot, dan adiposa. Reseptor insulin merupakan tirosin kinase yang mengkatalisa fosforilasi sejumlah substrat intraselular termasuk *insulin receptor substrate* (IRS) yang memiliki empat anggota keluarga, yaitu IRS 1-4.<sup>20</sup> IRS-1 merupakan salah satu substrat utama reseptor insulin. IRS-1 memiliki domain untuk pengikatan dengan IR yang telah mengalami fosforilasi. Ikatan antara IR dan IRS-1 akan menyebabkan fosforilasi pada residu-residu tirosin dari IRS-1. Residu tirosin yang telah terfosforilasi pada IRS-1 berperan sebagai situs *docking* untuk berbagai protein yang mengandung domain *src-homology-2* (SH2), antara lain *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K). IRS memperantarai dua jalur transduksi utama insulin. Jalur yang pertama adalah jalur PI3K- *protein kinase B* (Akt) yang bertanggung jawab terutama terhadap aksi insulin dalam *uptake* glukosa dan aksi metabolik lainnya. Pada jalur PI3K-Akt terjadi aktivasi PI3K. PI3K yang telah teraktifasi akan mengubah *phosphatidylinositol 3,4 biphosphate* [PI(3,4)P<sub>2</sub>] menjadi *phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate* [PI(3,4,5)P<sub>3</sub>]. [PI(3,4,5)P<sub>3</sub>] akan berikatan dengan *phosphoinositide-dependent kinase-1* (PDK-1). Hal ini menyebabkan akitfasi Akt. Akt memperantari berbagai aktifitas metabolik insulin, antara lain pada promosi sintesis glikogen, lipid, dan protein, serta pada inhibisi glukoneogenesis. Selain itu, aktivasi Akt akan menyebabkan translokasi GLUT-4 ke membran sel. Jalur kedua adalah jalur *Ras-mitogen activated protein kinase* (MAPK) yang memperantarai ekspresi gen serta berinteraksi dengan jalur PI3K-Akt untuk mengontrol pertumbuhan dan diferensiasi sel.<sup>21,28</sup>



Gambar 2.1. Jalur signal transduksi insulin<sup>28</sup>

### 2.1.3. Resistensi insulin

Individu tertentu dikatakan mengalami resistensi insulin bila individu tersebut memiliki kadar insulin yang normal atau tinggi yang disertai penurunan respon biologis jaringan target insulin terhadap insulin. Pada kondisi prediabetes, resistensi insulin terutama terjadi pada otot skelet dan jaringan lemak. Resistensi insulin pada kedua organ ini dikenal sebagai resistensi insulin perifer. Pada awalnya resistensi insulin ditandai dengan adanya hiperinsulinemia tanpa disertai hiperglikemia. Hal ini terjadi karena adanya usaha dari tubuh untuk mempertahankan kadar glukosa darah yang normal dengan meningkatkan sekresi insulin. Pada saat peningkatan sekresi insulin tidak dapat lagi mempertahankan kadar glukosa darah yang normal, maka akan terjadi hiperglikemia. Apabila hiperglikemia terus berlanjut, akan terjadi kerusakan sel salah satunya adalah sel beta pankreas yang berperan dalam sekresi insulin. Hal ini akan mengakibatkan terjadinya penurunan sekresi insulin. Mekanisme terjadinya resistensi insulin ada beberapa macam, antara lain akumulasi lipid ektopek, stress retikulum endoplasmik, aktivasi *unfolded protein response*, dan inflamasi sistemik.<sup>29</sup>

Akumulasi lemak di semua jaringan yang bukan merupakan jaringan adiposa adalah akumulasi lemak ektopek. Akumulasi ektopek lemak pada otot

skelet memberikan peranan penting dalam terjadinya resistensi insulin. Penimbunan lemak ektopik, yaitu trigliserid dan lemak *intermediate* (asam linoleat, seramid, dan diasilgliserol) terjadi akibat peningkatan kadar asam lemak bebas yang melebihi kapasitas metabolismenya. Lemak ektopik ini kemudian akan mengaktifkan protein kinase C (PKC) isoform teta ( $\Theta$ ). Aktifasi PKC  $\Theta$  menyebabkan aktivasi *inhibitor of  $\kappa$ B kinase* (IKK) dan *jun N-terminal kinase* (JNK). Hal ini akan mengakibatkan fosforilasi serin 307(312) dari IRS-1. Fosforilasi alternatif ini mengakibatkan gangguan interaksi antara reseptor insulin dengan IRS-1 dan degradasi IRS-1 sehingga terjadi gangguan jalur signal insulin.<sup>28</sup>

Mekanisme yang kedua, yaitu stress pada retikulum endoplasma menyebabkan resistensi insulin melalui gangguan pelipatan terhadap protein yang normal dan aktivasi *unfolded protein response* (UPR). UPR akan menginduksi jalur JNK yang berperan dalam fosforilasi residu serin pada IRS-1 dan akhirnya berakibat pada munculnya resistensi insulin.<sup>22</sup>

Inflamasi sistemik, seperti yang terjadi pada individu dengan obesitas juga menyebabkan terjadinya resistensi insulin. Asupan kalori berlebih menyebabkan hipertrofi sel adiposit yang akan membangkitkan sinyal untuk *recruitment*, proliferasi dan diferensiasi sel adiposit baru. Apabila penyimpanan kelebihan lemak ini tidak dapat diimbangi dengan adipogenesis, maka sel lemak akan mengalami hipertrofi berlebih. Hal ini akan mengakibatkan disfungsi adiposit, adiposit yang patologis, yang disertai dengan munculnya respon endokrin dan imunologis. Pada jaringan adiposa dari individu dengan obesitas ditemukan adanya inflamasi dan infiltrasi progresif oleh makrofag. Pada mulanya sel adiposit yang hipertrofi mensekresikan *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dalam jumlah sedikit. TNF- $\alpha$  ini kemudian akan menstimulasi preadiposit dan sel endotel untuk menghasilkan *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) yang berperan dalam menarik makrofag ke jaringan adiposa. Makrofag tersebut juga akan mensekresikan MCP-1 yang akan menyebabkan semakin banyak makrofag yang tertarik ke jaringan adiposa. Selain itu, makrofag-makrofag tersebut akan mensekresikan sitokin pro-inflamasi seperti *interleukin-6* (IL-6), *interleukin-1 $\beta$*  (IL-1 $\beta$ ), dan TNF- $\alpha$  yang akan mengaktifkan *inhibitor of  $\kappa$ B kinase* (IKK) melalui

jalur *nuclear factor kappa B* (NF $\kappa$ B) dan *jun N-terminal kinase* (JNK) melalui jalur *jun N-terminal kinase/activator protein-1* (JNK/AP-1). IKK dan JNK akan memfosforilasi residu serin 312 pada IRS-1 sehingga menyebabkan gangguan pada sinyal transduksi insulin. Selain itu, pada proses inflamasi juga dapat terjadi induksi protein *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) dan *nitric oxide* (NO) yang dapat mempromosikan degradasi IRS-1. NO juga dapat mengurangi aktifitas PI3K/Akt melalui proses s-nitrosilasi residu serin spesifik dari Akt.<sup>22,28,29</sup>

## 2.2. Fruktosa

### 2.2.1. Metabolisme fruktosa

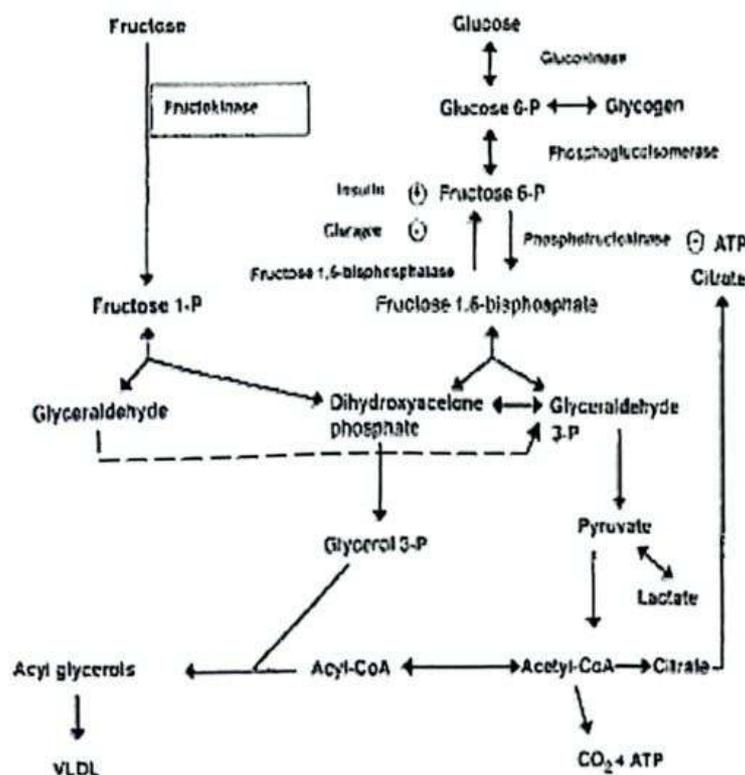
Fruktosa adalah heksosa yang memiliki rumus kimia yang identik dengan glukosa, yaitu C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> dan berbeda dengan glukosa pada posisi atom carbon yang kedua. Pada fruktosa terdapat gugus keton sedangkan pada glukosa terdapat gugus aldehyd. Sumber fruktosa antara lain fruktosa murni atau sirup jagung tinggi fruktosa atau berasal dari sukrosa.<sup>7</sup>

Fruktosa masuk ke enterosit melalui perantaraan GLUT5 dan kemudian keluar dari enterosit melalui GLUT2 untuk selanjutnya berdifusi ke dalam pembuluh darah. Sebagian kecil fruktosa yang masuk enterosit diubah menjadi glukosa dengan bantuan glukosa-6-fosfatase dan menyebabkan sedikit peningkatan kadar glukosa darah.<sup>7</sup>

Fruktosa yang sampai ke hati melalui pembuluh darah porta dengan cepat dimetabolisme. Fruktosa sama seperti glukosa masuk ke hepatosit dengan bantuan GLUT2. Di hepatosit kedua heksosa ini akan diubah menjadi asetil KoA namun melalui jalur yang berbeda. Perbedaan ini terletak pada enzim yang terlibat dalam metabolisme fruktosa dan glukosa. Proses glikolisis glukosa di hati dikontrol oleh enzim glukokinase. Kerja enzim ini dipengaruhi oleh konsentrasi glukosa di dalam sirkulasi porta. Selain glukokinase juga terdapat enzim fosfofruktokinase yang merubah glukosa-6-fosfat menjadi fruktosa-6-fosfat dan kemudian menjadi fruktosa-1,6-difosfat. Fosfofruktokinase diinhibisi oleh ATP dan sitrat. Proses glikolisis glukosa juga diregulasi oleh insulin melalui stimulasi ekspresi gen glukokinase dan meningkatkan aktifitas enzim glikolisis. Ketiga mekanisme inilah

yang menyebabkan proses glikolisis yaitu pemecahan glukosa menjadi piruvat terkontrol.<sup>5,7</sup>

Fruktosa dikonversi menjadi triose fosfat dengan bantuan enzim fruktokinase yang memiliki  $K_m$  (konsentrasi substrat yang diperlukan laju reaksi setengah dari maksimal) yang rendah sehingga proses konversi ini berlangsung cepat. Selain itu, tidak ada regulasi dari insulin dan inhibisi oleh ATP maupun sitrat. Fruktosa, sama seperti glukosa, akan diubah menjadi asetil KoA yang kemudian akan diubah menjadi asam lemak yang digunakan untuk sintesis trigliserida. Akan tetapi, karena metabolisme fruktosa tidak memiliki mekanisme regulasi seperti glukosa, maka konsumsi fruktosa kadar tinggi dapat menyebabkan peningkatan kadar trigliserida yang lebih tinggi dibandingkan dengan glukosa.<sup>5,7</sup>



Gambar.2.2. Metabolisme fruktosa di hati.<sup>7</sup>

### 2.2.2. Fruktosa dan resistensi insulin

Fruktosa tidak menstimulasi sekresi insulin dari sel beta pankreas. Hal ini mungkin disebabkan oleh tidak adanya GLUT5 di sel beta pankreas.<sup>30</sup> Akibat dari

hal ini adalah kadar insulin postprandial yang lebih rendah setelah konsumsi fruktosa dibandingkan dengan glukosa.

Fruktosa bersifat sangat lipogenik karena dapat meningkatkan *de novo* lipogenesis di hati sehingga menyebabkan peningkatan sekresi *very low density-triglycerides* (VLDL-TG) dari hati, penurunan klirens VLDL-TG di jaringan adiposa, dan penurunan oksidasi lemak di otot skelet. Lipogenesis yang meningkat ini disebabkan selain karena ketersediaan bahan baku yang tinggi, yaitu asam lemak, juga disebabkan oleh peningkatan ekspresi gen lipogenesis yang terjadi pada diit tinggi fruktosa kronik. Hal ini disebabkan oleh peningkatan ekspresi *sterol regulatory element-binding protein-1c* (SREBP-1c) dan *carbohydrate regulatory element-binding protein* (ChREBP). Peningkatan ekspresi faktor transkripsi SREBP-1c ini tidak dipengaruhi oleh insulin.<sup>5-8</sup>

Konsumsi fruktosa kadar tinggi dalam waktu dua minggu sudah bisa menyebabkan peningkatan ekspresi gen lipogenesis. Hal ini akan menyebabkan peningkatan deposit lemak di jaringan adiposa dan penimbunan lemak ektopik di jaringan lainnya, seperti di otot. Pada kedua jaringan tersebut, diit fruktosa kadar tinggi akan menyebabkan aktivasi jalur inflamasi yang berperan dalam mengganggu jalur sinyal insulin.<sup>6</sup>

### 2.2.3. Induksi resistensi insulin dengan diit tinggi fruktosa pada hewan coba

Induksi resistensi insulin pada berbagai macam hewan coba dengan menggunakan fruktosa kadar tinggi telah banyak dilakukan. Konsentrasi, cara dan lama pemberian fruktosa pada penelitian-penelitian tersebut bervariasi. Pada penelitian yang dilakukan oleh Sil dkk<sup>31</sup> pada tahun 2013, dengan menggunakan tikus Spraque Dawley yang diinduksi dengan diit tinggi fruktosa 60% selama 6 minggu, sudah berhasil meningkatkan kadar glukosa, insulin, dan trigliserida, serta nilai HOMA-IR dibandingkan dengan kelompok yang tidak mendapatkan fruktosa.<sup>31</sup> Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Jalal dkk<sup>32</sup> pada tahun 2007 dengan menggunakan fruktosa 10% sebagai air minum, ditemukan adanya peningkatan kadar trigliserida puasa dan nilai *fasting insulin resistance index* (FIRI).<sup>32</sup>

### 2.3. GLUT4 dan resistensi insulin

GLUT4 adalah transporter yang berperan dalam memasukan glukosa ke dalam sel. GLUT4 terdapat dalam jumlah yang tinggi pada otot skelet dan jaringan adiposa. Pada keadaan tidak terstimulasi hanya 5-10% dari jumlah keseluruhan GLUT4 intrasel yang diekspresikan pada permukaan sel adiposit dan otot skelet. Sebagian besar GLUT4 tersimpan di dalam vesikel yang terdapat di sitosol. Insulin menyebabkan perubahan jumlah GLUT4 yang berada di permukaan sel menjadi 20-50% dari total GLUT4 intrasel. Hal ini terjadi akibat pengaruh insulin terhadap translokasi GLUT4 dari sitosol ke membran sel. Selain itu, aktivasi reseptor insulin setelah berikatan dengan insulin juga menyebabkan penurunan endositosis GLUT4.<sup>33-35</sup>

Jumlah ekspresi gen GLUT4 dapat dipengaruhi oleh kondisi patologis. Pada tikus yang diinduksi menjadi diabetes dengan streptozosin ditemukan adanya penurunan jumlah ekspresi mRNA GLUT4. Penurunan ekspresi mRNA GLUT4 tergantung pada organ yang diteliti. Perubahan ini terjadi lebih awal dan nyata pada jaringan lemak dibandingkan dengan otot skelet. Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Garvey dkk,<sup>36</sup> yang meneliti mengenai perubahan ekspresi mRNA GLUT4 dan jumlah protein GLUT4 pada otot skelet (*vastus lateralis*) ditemukan bahwa tidak ada perbedaan antara individu dengan berat badan normal dengan individu yang mengalami obesitas dengan resistensi insulin, individu dengan gangguan toleransi glukosa, dan individu dengan diabetes tipe 2. Hal ini berbeda penelitian yang dilakukan oleh Kampmann dkk<sup>37</sup> pada tahun 2011, yang meneliti mengenai ekspresi mRNA dan protein GLUT4 pada subjek manusia dengan resistensi insulin yang parah menemukan adanya penurunan ekspresi mRNA dan protein GLUT4. Pada individu dengan resistensi insulin, gangguan *uptake* glukosa di otot skelet disebabkan oleh gangguan redistribusi GLUT4 ke membran sel.<sup>33</sup> Pada jaringan adiposa, hasil penelitian yang diperoleh mengenai penurunan ekspresi mRNA dan protein GLUT4 pada subjek dengan resistensi insulin ditemukan pada berbagai penelitian. Penurunan ekspresi ini mulai terjadi sejak awal adanya resistensi insulin.<sup>38</sup>

Pada tikus dengan sindrom metabolik ditemukan adanya penurunan jumlah GLUT4 yang terdapat pada semua jaringan sensitif insulin.<sup>39</sup> Carvalho dkk<sup>40</sup> pada tahun 2005 melakukan penelitian menggunakan mencit dan menemukan bahwa ekspresi berlebihan GLUT4 secara selektif pada jaringan adiposa dapat memperbaiki resistensi insulin. Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Atkinson dkk<sup>41</sup> ditemukan bahwa ekspresi berlebihan GLUT4 pada otot skeletal mencit meningkatkan sensitifitas insulin. Penemuan-penemuan inilah yang menyebabkan GLUT4 menjadi target terapi untuk individu dengan resistensi insulin dan diabetes melitus.

#### 2.4. Protein kinase c alfa (PKC $\alpha$ ) dan resistensi insulin

Protein kinase C (PKC) merupakan kinase yang memiliki peranan penting pada berbagai jalur signaling sel. PKC terdiri atas tiga kelompok, yaitu konvensional/klasik, novel, dan atipikal. Perbedaan antara ketiga kelompok ini terletak pada struktur *N-terminal regulatory domains*. Pada domain tersebut terdapat domain C1 dan C2 yang merupakan tempat ikatan dengan diasilgliserol (DAG) dan Ca<sup>2+</sup>. PKC tipe klasik (cPKC) dan novel (nPKC) memiliki kedua domain tersebut, meskipun nPKC tidak memiliki domain C2 yang sebanyak cPKC. PKC tipe atipikal (aPKC) tidak memiliki kedua domain tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa cPKC untuk menjadi aktif memerlukan DAG dan Ca<sup>2+</sup>, nPKC hanya memerlukan DAG, dan aPKC tidak memerlukan keduanya. Domain C1 yang terdapat pada cPKC dan nPKC berikatan dengan DAG di membran sehingga dapat dikatakan bahwa cPKC dan nPKC yang dalam keadaan aktif berada di membran sel.<sup>42</sup>

PKC alfa (PKC $\alpha$ ) termasuk dalam protein kinase C tipe klasik dan berperan dalam jalur sinyal transduksi insulin. Insulin dapat mengaktifasi PKC $\alpha$  dan begitu pula PKC $\alpha$  dapat memodulasi signal insulin. Regulasi signal insulin dilakukan oleh PKC $\alpha$  melalui regulasi protein IR dan IRS. PKC $\alpha$  secara konstitutif berada dalam keadaan berasosiasi dengan IRS-1. Stimulasi insulin menyebabkan disosiasi kedua protein dalam waktu 5 menit. Oriente dkk menunjukkan bahwa pemberian inhibitor selektif PKC $\alpha$  menyebabkan peningkatan fosforilasi IR dan IRS-1 dan penurunan degradasi insulin.<sup>10</sup> Penemuan ini juga

didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Cipok dkk.<sup>9</sup> Pada penelitian tersebut ditemukan bahwa inhibisi yang dilakukan terhadap PKC $\alpha$  meningkatkan efek insulin dalam menurunkan kadar glukosa darah.

PKC tipe konvensional (cPKC) juga diduga memiliki peranan dalam resistensi insulin. Hal ini didasarkan pada adanya peningkatan kadar Ca<sup>2+</sup> intraselular pada penderita resistensi insulin sehingga peningkatan aktivitas cPKC di otot skelet dan jaringan adiposa menyebabkan *down-regulation* stimulasi transpor glukosa oleh insulin.<sup>42</sup> Selain itu, pada penelitian lain yang dilakukan oleh Avignon dkk<sup>43</sup> ditemukan bahwa pada tikus dengan resistensi insulin terdapat peningkatan kadar dan aktivasi PKC $\alpha$  di membran sel yang disertai dengan penurunan kadar dan aktivasi PKC $\alpha$  di sitosol. Hal ini menunjukkan peranan aktivasi PKC $\alpha$  dalam terjadinya resistensi insulin.

### 2.5. *Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance (HOMA-IR)*

*Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance (HOMA-IR)* adalah suatu model penilaian resistensi insulin yang telah secara luas digunakan untuk menilai resistensi insulin pada berbagai penelitian. Nilai HOMA-IR dihitung dengan mengalikan kadar insulin puasa (mU/L) dengan kadar glukosa puasa (mmol/L) dan membaginya dengan faktor pembagi, yaitu 22,5. Penilaian resistensi insulin dengan menggunakan nilai HOMA-IR lebih mudah dan praktis dibandingkan dengan menggunakan metode *hiperinsulinemic-euglycemic clamp*, yang merupakan *gold standard* dalam menentukan resistensi insulin.<sup>44</sup> HOMA-IR dapat digunakan sebagai pelengkap atau tambahan dalam mendiagnosa resistensi insulin karena memiliki korelasi yang bermakna dengan indeks resistensi yang dihitung dengan menggunakan metode *hiperinsulinemic-euglycemic clamp* ( $r = -0,625$ ;  $p < 0,0001$ ). Selain itu, HOMA-IR juga dapat digunakan untuk pemantauan keberhasilan terapi. Hal ini terlihat dari adanya korelasi yang bermakna dengan hasil yang diperoleh dari *hiperinsulinemic-euglycemic clamp* ( $r = -0,726$ ;  $p < 0,0001$ ).<sup>45</sup> Penelitian epidemiologi yang dilakukan untuk menentukan *cut-off* dari nilai HOMA-IR dari berbagai populasi telah banyak dilakukan dan memberikan nilai-nilai yang berbeda. Pada studi epidemiologi yang dilakukan pada populasi Spanyol ditemukan bahwa nilai *cut-off* HOMA-IR adalah 1,85 pada

pria dan 2,07 pada wanita usia 50 tahun untuk diagnosis resistensi insulin dengan peningkatan risiko kardiometabolik.<sup>46</sup> Pada penelitian lain yang dilakukan pada populasi Meksiko-Amerika ditemukan nilai *cut off* HOMA-IR adalah sebesar 3,8 pada individu dengan usia lebih dari 18 tahun.<sup>44</sup>

## 2.6. Terapi resistensi insulin

### 2.6.1 Tiazolidinedion

#### 2.6.1.1 Mekanisme kerja

Tiazolidinedion (TZD) adalah suatu agonis *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ). PPAR $\gamma$  adalah anggota keluarga reseptor nukleus yang terutama diekspresikan di jaringan adiposa, dan di hati dalam jumlah yang lebih sedikit. Aktifasi transkripsi gen oleh heterodimer ini dapat diperantarai oleh ikatan agonis pada *ligand binding domain* (LBD) ataupun tanpa dipengaruhi ikatan agonis-reseptor tersebut. Pada keadaan tidak berikatan dengan ligan, PPAR $\gamma$  berada dalam bentuk heterodimer dengan *retinoid X receptor* (RXR) melekat pada *peroxisome proliferator response element* (PPRE) yang terdapat pada DNA. Heterodimer ini berasosiasi dengan kompleks korepresor yang memiliki aktifitas histon deasetilase sehingga menekan proses transkripsi. Ikatan antara agonis PPAR $\gamma$  dengan LBD yang terdapat pada reseptor akan menyebabkan perubahan konformasi PPAR $\gamma$  yang memungkinkan *recruitment* kompleks protein koaktifator dan kemudian mengaktifkan berbagai gen targetnya.<sup>47,48</sup>

Gen GLUT4 merupakan salah satu gen target PPAR $\gamma$ . Pada jaringan adiposa, PPAR $\gamma$  melekat pada promotor gen GLUT4 dan merepresi transkripsi gen tersebut. Hal ini dipengaruhi oleh adanya situs fosforilasi *mitogen activated protein kinase* (MAPK) pada Ser112 dari PPAR $\gamma$  yang intak. Ligan sintetik PPAR $\gamma$ , seperti rosiglitazon dan TZD lainnya, bila berikatan dengan LBD pada PPAR $\gamma$  akan menyebabkan hilangnya represi transkripsi gen GLUT4. Hal ini akan menyebabkan peningkatan ekspresi gen GLUT4 yang kemudian akan meningkatkan respon jaringan terhadap insulin.<sup>47</sup> Hal ini merupakan salah satu

alasan penggunaan TZD sebagai terapi untuk mengatasi resistensi insulin pada pasien diabetes tipe 2.

TZD selain merupakan agonis PPAR $\gamma$ , juga dapat mengaktifkan *AMP-activated protein kinase* (AMPK). AMPK memiliki peranan penting dalam meregulasi metabolisme glukosa dan lipid. Pemberian TZD meningkatkan adiponektin yang akan mengakibatkan peningkatan sirtuin 1 dan menurunkan membran potensial mitokondria yang mengakibatkan peningkatan rasio AMP:ATP. Kedua hal inilah yang menstimulasi terjadinya aktivasi AMPK. Efek AMPK pada metabolisme glukosa yang menguntungkan terlihat pada meningkatnya sintesis glikogen dan translokasi GLUT4 dari sitosol ke membran sel. Peningkatan sintesis glikogen terjadi akibat stimulasi AMPK langsung terhadap enzim glikogen sintase sedangkan stimulasi translokasi GLUT4 terjadi akibat efek langsung dari AMPK terhadap TBC1D1 yang merupakan keluarga dari protein Rab-GTPase. Pada metabolisme lipid, aktivasi AMPK menyebabkan stimulasi oksidasi beta asam lemak di mitokondria serta menghambat sintesis kolesterol dan trigliserid. Peningkatan oksidasi asam lemak terjadi akibat peningkatan fosforilasi enzim *acetyl-CoA carboxylase* (ACC) sehingga enzim ini menjadi inaktif. ACC mengkatalisa sintesis *malonyl CoA* yang merupakan inhibitor penting *carnitine palmitoyltransferase* (CPT1). CPT1 merupakan enzim yang berperan dalam oksidasi asam lemak. Inaktivasi ACC menyebabkan peningkatan oksidasi asam lemak karena penurunan inhibisi CPT1 oleh *malonyl CoA*. Inhibisi sintesis kolesterol di hati terjadi akibat inhibisi terhadap aktifitas enzim *HMG-CoA reductase* sedangkan inhibi sintesis trigliserida terjadi melalui inhibisi terhadap aktifitas *liver X receptor- $\alpha$*  (LXR $\alpha$ ) di hati.<sup>49</sup>

TZD meningkatkan sensitifitas insulin serta menurunkan kadar lipid intraselular di hati dan otot, dan memperbaiki sinyal transduksi insulin pada penderita diabetes tipe 2.<sup>49</sup> Pioglitazon adalah salah satu obat golongan TZD. Penggunaan pioglitazon terutama ditujukan untuk pengontrolan kadar glukosa darah dan perbaikan sensitifitas insulin

#### 2.6.1.2 Efek samping

Trozigitazon, rosiglitazon, dan pioglitazon adalah obat-obat golongan TZD. Troziglitazon sudah ditarik dari peredaran karena efek toksiknya pada hati. Rosiglitazon digunakan secara terbatas di berbagai negara karena efek sampingnya yang cukup serius, yaitu meningkatkan risiko terjadinya infark miokardium dan kematian. Di Indonesia, semua obat yang mengandung rosiglitazon dibekukan surat izin edarnya.<sup>50</sup> Pioglitazon merupakan obat golongan TZD yang paling baru dan memiliki efek samping yang kurang lebih sama dengan rosiglitazon tetapi dengan risiko gagal jantung dan kematian yang lebih rendah.<sup>51</sup> Efek samping pioglitazon antara lain edema, peningkatan berat badan dan kehilangan massa tulang.<sup>12,13</sup>

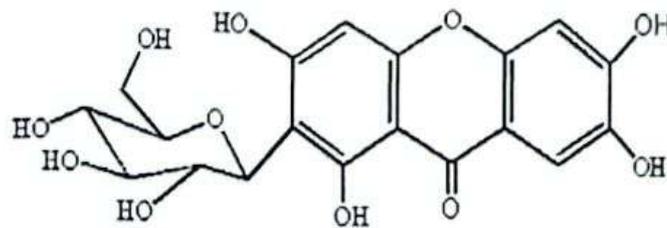
PPAR $\gamma$  berperan dalam formasi, reabsorpsi, dan *remodelling* tulang. Hal ini berhubungan dengan fungsi PPAR $\gamma$  sebagai faktor transkripsi yang diperlukan untuk diferensiasi adiposit. Diferensiasi adiposit di sumsum tulang juga dipengaruhi oleh agonis ini. PPAR $\gamma$  berperan dalam menstimulasi diferensiasi sel punca mesenkim menjadi adiposit dan tidak berdiferensiasi menjadi osteoblas serta menstimulasi diferensiasi sel punca homeopoetik menjadi osteoklas. Selain itu, PPAR $\gamma$  juga meningkatkan regulasi ekspresi *receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand* (RANKL), suatu ligan *receptor activator of nuclear factor-kappaB* (RANK), yang bila keduanya akan menyebabkan terjadinya osteoklastogenesis. Pada osteoklas, PPAR $\gamma$  juga mengontrol ekspresi protein c-fos yang berperan penting dalam perkembangan osteoklas dan aktifitas signal RANK.<sup>52,53</sup>

Edema perifer yang terjadi akibat pemberian PPAR $\gamma$  berhubungan dengan retensi sodium sehingga terjadi penurunan ekskresi sodium dan volume urin serta berhubungan dengan peningkatan permeabilitas vaskular. Edema perifer yang terjadi dapat menyebabkan peningkatan berat badan, edema paru, dan gagal jantung kongestif.<sup>54</sup>

### 2.6.3 Mangiferin

Mangiferin adalah suatu glukosida xanton yang terdapat pada berbagai tanaman, antara lain: *Mangifera indica*, *Salacia oblonga*, *Hypericum aucheri*,

dan lainnya. Penelitian mengenai efek terapeutik dari senyawa ini telah banyak dilakukan, diantaranya adalah efek anti hiperglikemik dan anti hiperlipidemik.<sup>14-16</sup>



Gambar 2.3. Struktur kimia mangiferin<sup>55</sup>

### 2.6.3.1 Efek terapeutik

Salah satu penelitian mengenai efek ini telah dilakukan oleh Muruganadan dkk pada tahun 2004. Muruganadan dkk<sup>15</sup> melakukan penelitian dengan menggunakan tikus Wistar yang diinduksi menjadi diabetik dengan streptozotisin. Pada penelitian ini, tikus dengan diabetes tipe 2 yang mendapatkan mangiferin yang diisolasi dari *Mangifera indica* sebanyak 10 dan 20 mg/kgBB yang diberikan secara intraperitoneal satu kali sehari selama 14 hari. Pada hari terakhir, pada tikus-tikus tersebut dilakukan tes toleransi glukosa oral dengan memberikan glukosa 2 g/kg pada 4 mL/kg dalam NaCl 0,9%. Mangiferin diberikan 30 menit sebelum dilakukan uji tersebut. Pada penelitian ini ditemukan bahwa mangiferin memiliki efek hipoglikemik dan hipolipidemik. Efek hipoglikemik ini mungkin berhubungan dengan efek ekstrapankreatik mangiferin yaitu berupa peningkatan proses glikolisis dan glikogenesis yang disertai dengan penurunan glukoneogenesis dan glikogenolisis. Selain itu, efek hipoglikemik ini juga terjadi akibat efek hambatan mangiferin terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase yg terdapat di usus sehingga pemecahan karbohidrat dan absorpsi glukosa terhambat.<sup>15</sup>

Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Giron dkk<sup>16</sup> pada tahun 2008, digunakan ekstrak *Salacia oblonga* yang kemudian difraksinasi untuk memperoleh mangiferin. Penelitian ini bertujuan untuk melihat efek mangiferin dari ekstrak ini pada kultur sel L6 myotube tikus terhadap *uptake* glukosa. Hasil yang diperoleh dari penelitian ini adalah peningkatan bermakna *2-deoxy-glucose* (2-DG) *uptake* pada kultur sel yang diinkubasi dengan ekstrak selama 18 jam. Efek ini diperantarai oleh peningkatan jumlah total transporter GLUT4. Selain itu,

juga ditemukan mangiferin dapat memfosforilasi 5'-AMPK dengan kekuatan yang sama dengan AMPK aktifator *aminoimidazole carboxamide ribonucleotide* (AICAR), yaitu sebesar 1,5 kali. Efek mangiferin terhadap *uptake* glukosa juga dipengaruhi oleh inhibitor PPAR. Pemberian inhibitor ini menyebabkan penurunan *uptake* glukosa pada kultur sel.<sup>16</sup>

Efek anti hiperlipidemik dari mangiferin juga berhubungan dengan aktivasi AMPK. Penelitian mengenai hal ini sudah dilakukan oleh beberapa peneliti. Salah satunya adalah penelitian yang dilakukan oleh Niu dkk<sup>14</sup> yang meneliti efek anti hiperlipidemik mangiferin pada tikus yang diberikan diet tinggi lemak. Pada penelitian ini dosis mangiferin yang diberikan pada tikus adalah 50, 100, dan 150 mg/kgBB selama 6 minggu secara oral. Pemberian mangiferin 50, 100 dan 150 mg/kgBB dapat menurunkan kadar asam lemak bebas plasma dan pemberian mangiferin 100 dan 150 mg/kgBB dapat menurunkan kadar trigliserida plasma secara bermakna dibandingkan dengan tikus yang tidak mendapatkan mangiferin. Niu dkk<sup>14</sup> mengemukakan bahwa efek ini berhubungan dengan aktivasi AMPK di hati yang menyebabkan penurunan kadar asam lemak bebas. Aktivasi AMPK akan menyebabkan peningkatan aktifitas ekspresi protein CPT-1 dan inhibisi aktifitas ACC.<sup>14</sup>

Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Mahali dan Manna<sup>17</sup> pada tahun 2012 ditemukan mangiferin mempengaruhi PPAR $\gamma$  melalui dua mekanisme, yaitu sebagai ligan dan bukan ligan. Mangiferin sebagai agonis PPAR $\gamma$  terbukti dengan ditemukannya ikatan hidrogen antara mangiferin dengan His44p, Tyr473, Cys285, dan Ser282 dari PPAR $\gamma$ . Tempat ikatan antara mangiferin dengan PPAR $\gamma$  berbeda dari tempat ikatan troziglitazone dengan PPAR $\gamma$ . Pengaruh mangiferin terhadap PPAR $\gamma$  juga terlihat dari inhibisi terhadap aktivasi nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B). Inhibisi terhadap NF- $\kappa$ B menyebabkan aktivasi PPAR $\gamma$ . Selain itu, mangiferin juga dapat mempengaruhi PPAR $\gamma$  dengan menghambat jalur *Mitogen-activated protein kinases/Extracellular signal-regulated* (MAPK/ERK), yaitu dengan menghambat fosforilasi ERK. Hal ini menyebabkan fosforilasi PPAR $\gamma$  oleh ERK menurun sehingga aktifitas transkripsi PPAR $\gamma$  meningkat dan traslokasi PPAR $\gamma$  ke sitoplasma terhambat.<sup>17</sup>

### 2.6.3.2 Absorpsi dan toksisitas mangiferin pada pemberian oral

Penelitian mengenai farmakokinetik dan toksisitas mangiferin telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Dimitrov dkk<sup>18</sup> pada tahun 2011 meneliti mengenai toksisitas akut mangiferin yang diisolasi dari *Hypericum aucheri* yang diberikan secara oral dan intra peritoneal pada mencit. Pada penelitian tersebut ditemukan LD50 pada pemberian oral adalah 4984 mg/kgBB dan pada pemberian intra peritoneal adalah 490 mg/kgBB. Selain itu, juga dilakukan penilaian terhadap indeks absorpsi dengan melakukan perbandingan LD50 i.p dengan LD50 p.o. Hasil yang diperoleh adalah 0,1 (10%) yang menunjukkan absorpsi mangiferin yang kurang baik pada pemberian secara oral.<sup>18</sup> Peneliti lain, yang melakukan uji toksisitas mangiferin pada pemberian oral dengan menggunakan dosis 0, 100, 200, dan 400 mg/kgBB dengan menggunakan tikus tidak ditemukan tanda-tanda toksisitas seperti penurunan berat badan, peningkatan kadar serum transaminase, maupun peningkatan kadar urea dan kreatinin darah. Sitotoksitas baru muncul setelah 24 jam pemberian mangiferin, saat kadar mangiferin dalam darah mencapai 400  $\mu\text{mol/L}$ .<sup>14</sup>

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Rancangan penelitian

Studi ini merupakan studi eksperimental yang dilakukan pada tikus dengan menggunakan kontrol positif (pioglitazon) dan negatif (CMC).

#### 3.2. Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Departemen Farmakologi Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI) dan berlangsung selama 6 bulan.

#### 3.3. Bahan dan alat penelitian

##### 3.3.1 Bahan penelitian dan hewan coba

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut:

1. Tikus jantan galur Spraque-Dawley dari Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional (PPOMN)
2. Makanan tikus
3. Fruktosa dari Merck<sup>®</sup>
4. Pioglitazon (Actos<sup>®</sup>) dari Takeda
5. Mangiferin dalam bentuk bahan aktif yang diisolasi dari *Mangifera indica* dengan kemurnian 95,8% dan dibeli dari *Plamed Science Technology Inc.*
6. *Carboxymethylcellulose* (CMC)
7. Kit untuk pemeriksaan kolorimetri glukosa, trigliserid, dan kolesterol total dari DiaSys<sup>®</sup>.
8. Kit ELISA untuk pemeriksaan insulin dari ALPCO<sup>®</sup>
9. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) 1 X dari Bio Basic Canada Inc.
10. *Protease Inhibitor Coctail* (P8340-1mL) dari Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
11. *Dimethyl Sulfoxide* (D8418-50mL) dari Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
12. Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit Thermo-Scientific<sup>®</sup>
13. *Bovine serum albumin* (BSA) dari Thermo-Scientific<sup>®</sup>
14. Tripure<sup>®</sup> untuk isolasi RNA

15. Kit untuk sintesis cDNA dari Roche<sup>®</sup>
16. Kit untuk RT-PCR dari Roche<sup>®</sup>
17. Alkohol absolut, isopropanol, kloroform untuk isolasi RNA

### 3.3.2. Alat penelitian

Alat-alat yang dipakai untuk penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Sentrifus berpendingin TOMMY<sup>®</sup>
2. Tissue homogenizer Ultra turax
3. Spektrofotometer PerkinElmer<sup>®</sup> Lambda 25
4. ELISA reader dari BioRad<sup>®</sup>
5. Light Nano Cycler dari Roche<sup>®</sup>
6. Neraca analitik
7. Alat-alat gelas (Pyrex<sup>®</sup>)
8. Sonde
9. Perlengkapan bedah hewan (gunting, pisau bedah, pinset)

### 3.4. Prosedur penelitian

Pada penelitian ini digunakan tikus jantan galur Spraque Dawley usia 12-16 minggu dengan berat 150-200 gram. Selama penelitian semua hewan percobaan ditempatkan di dalam ruangan dengan suhu 25<sup>o</sup>C yang diatur siklus terang gelapnya. Makanan yang diberikan adalah makanan tikus standar dan minum diberikan secara *ad libitum*.

Jumlah hewan coba dalam tiap kelompok yang akan digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus Federer.

$$\text{Jumlah hewan per kelompok: } (n-1)(t-1) > 15$$

t = jumlah kelompok

n = jumlah sampel tiap kelompok

$$\text{Hasil perhitungan: } (n-1)(t-1) > 15$$

$$4n - 4 > 15$$

$$n > 4,75 \rightarrow n = 5$$

Berdasarkan hasil perhitungan diatas, maka pada setiap kelompok digunakan 5 ekor tikus sehingga jumlah keseluruhan tikus yang digunakan adalah 25 ekor. Akan tetapi, pada pemeriksaan kadar insulin puasa minggu ke-10 salah satu tikus memiliki nilai yang jauh diatas nilai tikus yang lainnya sehingga tikus tersebut dikeluarkan dari penelitian sehingga jumlah sampel keseluruhan menjadi 24 ekor tikus.

- Kelompok normal (N): tidak diinduksi dengan fruktosa dan tidak diberikan perlakuan.
- Kelompok perlakuan: diinduksi dengan fruktosa dan diberikan perlakuan

Induksi fruktosa dilakukan dengan menggunakan larutan fruktosa 60% yang diberikan dengan menggunakan sonde sebanyak dua kali sehari dan larutan fruktosa 10% yang dicampur dengan air minum dan diberikan secara *ad libitum*.<sup>31,32</sup>

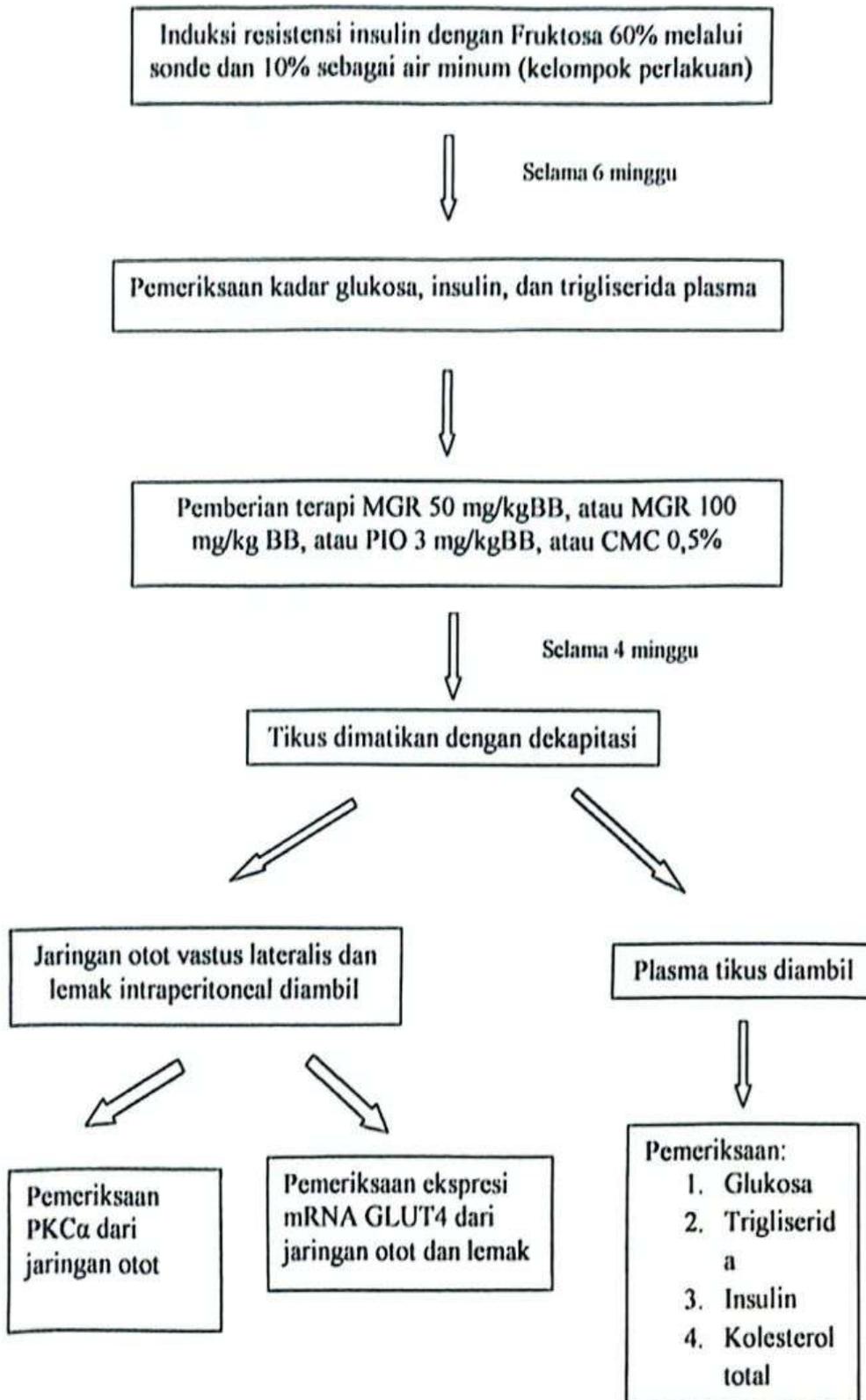
Kelompok perlakuan setelah diinduksi fruktosa saja selama 6 minggu diberikan perlakuan dan dibagi secara random menjadi 4 kelompok, yaitu:

- Kelompok 1: *carboxyl-methyl-cellulose* (CMC) 0,5% secara oral
- Kelompok 2: mangiferin 50 mg/kg dalam CMC 0,5% secara oral
- Kelompok 3: mangiferin 100 mg/kg dalam CMC 0,5% secara oral
- Kelompok 4: pioglitazon 3 mg/kg dalam CMC 0,5% secara oral

Pada keempat kelompok ini induksi fruktosa terus dilakukan sampai minggu ke-10 dihitung dari awal induksi. Kadar fruktosa yang diberikan untuk induksi serta dosis mangiferin dan pioglitazon yang digunakan sesuai dengan penelitian-penelitian sebelumnya.

### 3.5. Protokol penelitian

### 3.5.1. Bagan kerja penelitian



### 3.5.2. Cara kerja

Sebelum penelitian ini dimulai, terlebih dahulu dilakukan permohonan persetujuan etik kepada komisi etik FKUI. Setelah persetujuan diperoleh, seluruh hewan coba diaklimatisasi selama 2 minggu. Setelah aklimatisasi selesai dilakukan pengambilan darah *baseline* dari vena ekor sebanyak  $\pm 1$  mL. Sebelum diambil darahnya tikus dipuasakan selama  $\pm 14$  jam. Darah tersebut ditampung dalam tabung berlapis EDTA dan kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dengan suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Plasma yang terkumpul akan digunakan untuk pemeriksaan kadar glukosa dan trigliserida. Tikus-tikus tersebut kemudian dibagi dalam dua kelompok, yaitu kelompok normal/tanpa perlakuan dan kelompok induksi fruktosa/perlakuan. Tikus yang termasuk dalam kelompok normal diberikan makanan standar dan minum air *ad libitum* sedangkan tikus yang masuk dalam kelompok perlakuan selain diberikan makanan standar juga diberikan larutan fruktosa 60% melalui sonde dan minum larutan fruktosa 10% *ad libitum*. Hal ini terus dilakukan selama 10 minggu sampai penelitian selesai.

Pada hari pertama minggu ke-7, dilakukan pengambilan darah kedua, yang juga dilakukan dalam keadaan puasa. Darah tersebut diambil dari vena ekor sebanyak 1-1,5 ml dan akan diproses dengan cara yang sama sehingga diperoleh plasma yang akan digunakan untuk pemeriksaan kadar glukosa, trigliserid, dan insulin. Setelah pengambilan darah selesai tikus kelompok induksi kembali diberikan fruktosa dan dimulai pemberian CMC, mangiferin atau pioglitazon, yang terus diberikan selama 4 minggu. Pembagian kelompok dilakukan sebelumnya secara acak.

Setelah 10 minggu masa penelitian dihitung dari mulai dilakukannya induksi fruktosa, semua tikus di terminasi dengan cara dekapitasi. Darah yang diambil digunakan untuk pemeriksaan kadar glukosa, trigliserid, insulin, dan kolesterol total. Selain itu, dari semua tikus tersebut diambil otot (*vastus lateralis*) dan lemak intraperitoneal. Otot dan lemak tersebut akan dibuat homogenatnya dan digunakan untuk pemeriksaan mRNA GLUT4.

Selama 10 minggu penelitian, semua tikus ditimbang berat badannya setiap hari dan dimonitor tingkah laku dan kejadian diare.

### 3.5.3. Pembuatan larutan fruktosa

Pada penelitian ini digunakan dua kadar larutan fruktosa, yaitu larutan fruktosa 60% dan 10%. Fruktosa yang digunakan adalah *D-fructose for biochemistry* dari Merck<sup>®</sup>. Kedua larutan tersebut dibuat dengan melarutkan fruktosa dalam akuades.

### 3.5.4. Penetapan kadar glukosa, trigliserid, dan kolesterol total

Kadar glukosa, trigliserid, dan kolesterol total diperiksa dengan menggunakan metode kolorimetri dengan kit dari DiaSys<sup>®</sup>. Pada pemeriksaan ini digunakan spektrofotometer. Sampel sebanyak 10 µL ditambah dengan reagen dari kit tersebut sebanyak 1000 µL. Akuades yang ditambahkan reagen digunakan sebagai blako sedangkan larutan standar yang ditambahkan reagen digunakan sebagai standar. Setelah semua bahan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, vorteks digunakan agar semua bahan tercampur dengan baik. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 10 menit. Semua larutan diperiksa dengan menggunakan kuvet kuarsa 1 mL dan dibaca pada panjang gelombang 546 nm. Pembacaan absorbansi dilakukan mulai dari blanko, standar, dan kemudian sampel. Semua pengerjaan dilakukan secara duplo. Kadar glukosa, trigliserid, dan kolesterol total masing-masing dihitung dengan menggunakan rumus dibawah ini:

$$\text{Kadar glukosa (mg/dL)} = \frac{(\text{Absorbansi sampel-absorbansi blanko})}{(\text{Absorbansi standar-absorbansi blanko})} \times 100$$

$$\text{Kadar trigliserid (mg/dL)} = \frac{(\text{Absorbansi sampel-absorbansi blanko})}{(\text{Absorbansi standar-absorbansi blanko})} \times 200$$

$$\text{Kadar kolesterol total (mg/dL)} = \frac{(\text{Absorbansi sampel-absorbansi blanko})}{(\text{Absorbansi standar-absorbansi blanko})} \times 200$$

### 3.5.5. Penetapan kadar insulin

Kadar insulin diukur dengan menggunakan metode ELISA dengan kit dari ALPCO<sup>®</sup>. Pada pemeriksaan ini digunakan sampel sebanyak 10 µL. Standar yang digunakan berasal dari kit. Kurva standar dibuat dengan menggunakan program

Microsoft Excel<sup>®</sup>. Absorbansi standar dan sampel dikoreksi dengan menggunakan absorbansi standar zero. Setelah itu, kadar sampel dihitung dengan menggunakan persamaan kurva standar yang ada.

### 3.5.6. Pembuatan homogenat dan pemeriksaan kadar protein kinase C alfa (PKC $\alpha$ )

Kadar protein kinase C alfa (PKC $\alpha$ ) diukur dengan terlebih dahulu membuat homogenat dari otot. Homogenat dibuat dengan menghancurkan 100 mg jaringan otot dalam 1 mL *phosphate buffer saline* (PBS) yang sudah dicampur dengan 0,5  $\mu$ L protease inhibitor dari Sigma<sup>®</sup>. Protease inhibitor tersebut dibuat dengan melarutkannya ke dalam 1 mL DMSO. Kemudian homogenat tersebut disimpan di dalam lemari es suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama satu malam. Setelah itu, homogenat di *freeze-thaw* sebanyak dua kali untuk memecah membran sel. Hal ini kemudian dilanjutkan dengan melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 5000 g selama 5 menit pada suhu  $-8^{\circ}\text{C}$ . Supernatan dari hasil sentrifugasi tersebut disimpan di dalam lemari es dengan suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Supernatan ini kemudian akan digunakan untuk pemeriksaan kadar PKC $\alpha$  dengan menggunakan metode *sandwich* ELISA dengan kit dari CUSABIO<sup>®</sup>. Pada pemeriksaan dengan ELISA, dilakukan pengenceran sebanyak 20 kali.

### 3.5.7. Pemeriksaan kadar protein total otot

Pemeriksaan kadar protein total otot dilakukan dengan menggunakan supernatan dari homogenat yang sama dengan yang digunakan pada pemeriksaan kadar PKC $\alpha$ . Sebelum menambahkan sampel ke dalam *microplate* dilakukan pengenceran sampel sebanyak 25 kali. Standar BSA dan sampel yang digunakan sebanyak 10  $\mu$ L dan kemudian ditambahkan dengan 300  $\mu$ L reagen Bradford. Setelah itu dilakukan inkubasi selama 10 menit pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$ . Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 595 nm dengan menggunakan *microplate reader*. Kadar protein total yang diukur pada pemeriksaan ini akan digunakan untuk menghitung kadar PKC $\alpha$  dalam ng/mg protein.

### 3.5.8. Pembuatan homogenat dan isolasi RNA

Homogenat otot dan lemak dibuat dengan menggunakan 100 mg jaringan tersebut dalam 1 mL Tripure. Setelah itu, homogenat diinkubasi selama 5 menit

pada suhu 15-25<sup>o</sup>C dan kemudian ditambahkan kloroform 0,2 mL lalu divorteks selama 15 detik dan diinkubasi kembali pada suhu yang sama selama 15 menit. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g selama 15 menit pada suhu 2<sup>o</sup>C dan diambil lapisan pertama dari tiga lapisan yang terbentuk. Lapisan tersebut kemudian dipresipitasi dengan isopropanolol sebanyak 0,5 mL per 1 mL Tripure dan dicampur dengan inversi. Setelah itu, diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang dan kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000g selama 10 menit pada suhu 2<sup>o</sup>C. Pelet kemudian dicuci dengan etanol 75% sebanyak 1 mL dan divorteks selama 1 menit. Setelah itu dilakukan sentrifugasi dengan 7500 g selama 5 menit dengan suhu 2<sup>o</sup>C dan supernatan yang ada dibuang. Pelet kemudian diletakan pada *dry bath* dengan suhu 45<sup>o</sup>C sampai kering. Kemudian pellet diresuspensi dengan RNA free water sebanyak 20  $\mu$ L dan diinkubasi di *dry bath* selama 15 menit dengan suhu 56<sup>o</sup>C.

### 3.5.9. Sintesis cDNA

RNA yang sudah diisolasi diubah menjadi cDNA dengan menggunakan kit dari Roche® yaitu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit. cDNA kemudian disimpan di dalam lemari es dengan suhu -20<sup>o</sup>C

### 3.5.10. Real-time PCR

PCR dilakukan dengan menggunakan kit dari Roche®, yaitu FastStart Essential DNA Green Master. Alat yang digunakan adalah LightCycler Nano dari Roche®

### 3.5.11. Perhitungan ekspresi gen GLUT4

Ekspresi mRNA GLUT4 pada otot dan lemak dihitung dengan menggunakan metode  $2^{-\Delta\Delta ct}$  dari Livak Schmittgen. Ekspresi mRNA GLUT4 dinormalisasi terhadap ekspresi mRNA beta aktin.

### 3.5.12. Perhitungan *Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance* (HOMA-IR)

Resistensi insulin dapat dinilai dari HOMA-IR. Perhitungan HOMA-IR memerlukan kadar insulin dan glukosa puasa. Rumus yang digunakan untuk menghitung HOMA-IR adalah sebagai berikut:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{[\text{kadar insulin puasa (mU/L)} \times \text{kadar glukosa puasa (mmol/L)}]}{22,5}$$

### 3.5.13. Pengolahan dan analisa data

Semua data pada penelitian ini disajikan dalam bentuk  $\text{mean} \pm \text{SD}$ . Setiap data di dalam penelitian ini diuji normalitas distribusi dan homogenitas variansnya. Uji normalitas dilakukan dengan menggunakan uji Shapiro Wilk, sedangkan uji homogenitas dilakukan dengan uji Levenne. Kedua uji ini dilakukan untuk menentukan jenis uji yang akan digunakan untuk analisa data penelitian. Semua data yang memenuhi syarat untuk uji parametrik akan diuji dengan menggunakan uji ANOVA sedangkan yang tidak memenuhi syarat akan diuji dengan menggunakan uji Kruskal Wallis. Perbedaan bermakna yang ditemukan pada uji ANOVA akan dilanjutkan dengan uji LSD sedangkan untuk uji Kruskal Wallis akan dilanjutkan dengan uji Mann Whitney. Batas kemaknaan yang digunakan pada penelitian ini adalah 0,05.

## BAB IV HASIL PENELITIAN

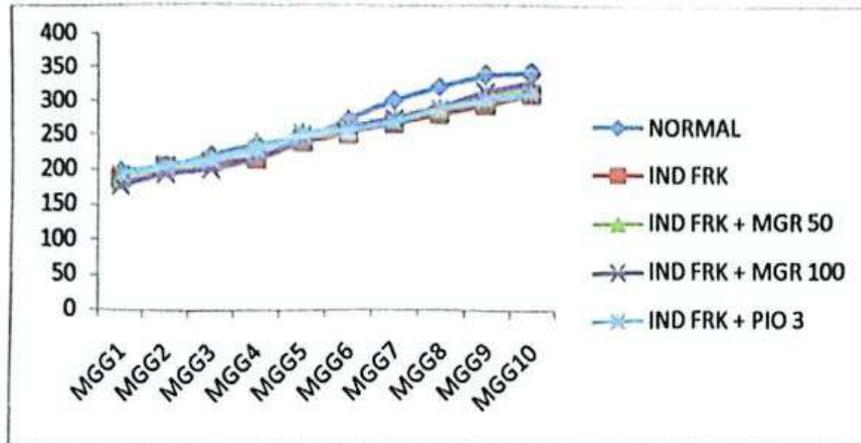
### 4.1. Pemantauan perubahan berat badan tikus selama 10 minggu

Tikus ditimbang dengan menggunakan timbangan analog. Hasil pengukuran berat badan setiap tikus dicatat setiap hari. Berat badan masing-masing tikus dalam satu kelompok dirata-rata setiap minggunya selama 10 minggu. Pada setiap kelompok terdapat peningkatan berat badan saat akhir penelitian bila dibandingkan dengan awal penelitian.

Tabel 4.1. Berat badan awal dan akhir, berat otot *vastus lateralis*, dan berat lemak intraperitoneal

Kelompok	BB awal (g)	BB akhir (g)	$\Delta$ BB (g)	Berat otot (g)	Berat Lemak (g)
Normal	196,65±14,05	343,33±71,39	146,68	0,94±0,21	0,36±0,08
IND FRK	186,85±10,66	311,29±49,01	124,44	0,91±0,13	0,29±0,06
IND FRK + MGR 50	183,35±14,20	321,49±47,19	138,14	0,96±0,19	0,3±0,03
IND FRK + MGR 100	176,5±8,05	327,88±26,65	151,38	0,95±0,09	0,43±0,20
IND FRK + PIO 3	193,2±23,09	312,44±54,63	119,24	0,84±0,08	0,38±0,12

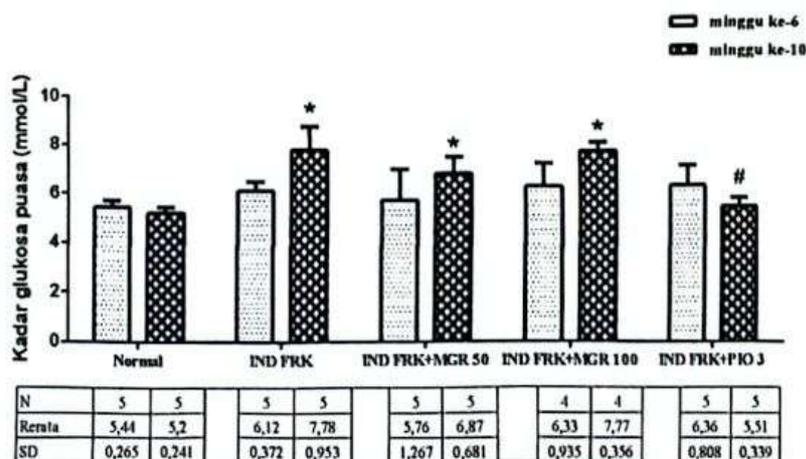
Keterangan: data yang disajikan adalah mean ± SD. IND FRK: Induksi fruktosa tanpa terapi, IND FRK+MGR50: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 50 mg/kgBB/hari, IND FRK+MGR100: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 100 mg/kgBB/hari, IND FRK+PIO3: Induksi fruktosa dengan terapi pioglitazon 3 mg/kgBB/hari.



Gambar 4.1. Berat badan rata-rata tiap kelompok selama 10 minggu. IND FRK: Induksi fruktosa tanpa terapi, IND FRK+MGR50: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 50 mg/kgBB/hari, IND FRK+MGR100: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 100 mg/kgBB/hari, IND FRK+PIO3: Induksi fruktosa dengan terapi pioglitazon 3 mg/kgBB/hari.

#### 4.2. Pemeriksaan Kadar Glukosa Plasma

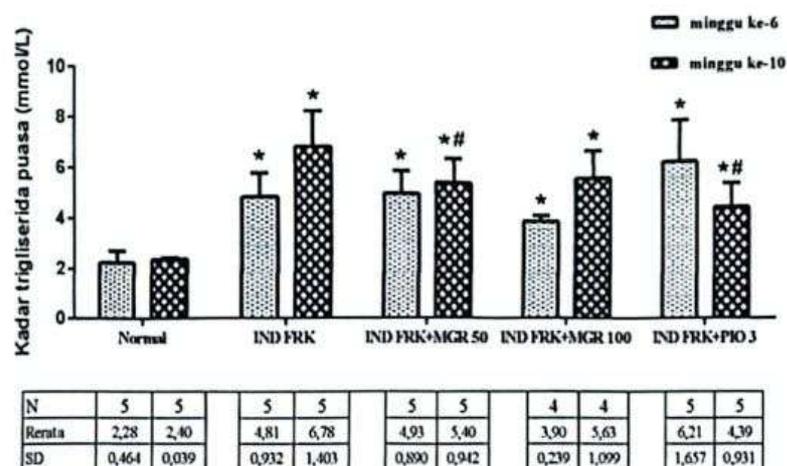
Pada Gambar 4.2 dibawah terlihat belum adanya perbedaan bermakna kadar glukosa minggu ke-6 antara kelompok normal dengan kelompok lainnya. Pada minggu ke-10, terlihat adanya peningkatan kadar glukosa dibandingkan pada minggu ke-6. Perbedaan bermakna dapat dilihat pada kadar glukosa minggu ke-10 antara kelompok IND FRK dengan kelompok normal dan kelompok IND FRK dengan kelompok IND FRK + PIO 3.



Gambar 4.2. Kadar glukosa plasma puasa minggu ke-6 dan minggu ke-10. Data disajikan sebagai nilai rerata ± SD. \*) p < 0.05 vs kelompok Normal; #) p < 0.05 vs kelompok IND FRK. IND FRK: Induksi fruktosa tanpa terapi, IND FRK+MGR50: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 50 mg/kgBB/hari, IND FRK+MGR100: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 100 mg/kgBB/hari, IND FRK+PIO3: Induksi fruktosa dengan terapi pioglitazon 3 mg/kgBB/hari.

### 4.3. Pemeriksaan Kadar Trigliserida Plasma

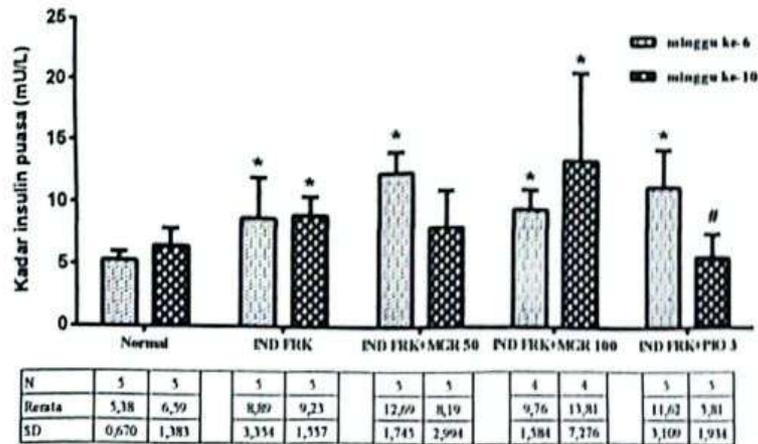
Pada gambar 4.3 telah dapat dilihat adanya perbedaan yang bermakna antara kadar trigliserida kelompok normal dengan kelompok lainnya. Pada bagian yang menunjukkan kadar trigliserida minggu ke-10, dapat dilihat adanya perbedaan bermakna antara kelompok IND FRK dengan kelompok IND FRK + PIO 3 dan kelompok IND FRK + MGR 50 serta kelompok normal. Akan tetapi, tidak terlihat adanya perbedaan bermakna antara kelompok IND FRK dengan dan IND FRK + MGR 100, meskipun kadar pada kelompok tersebut lebih rendah dibandingkan dengan kelompok IND FRK.



**Gambar 4.3.** Kadar trigliserida plasma puasa minggu ke-6 dan minggu ke-10. Data disajikan sebagai nilai rerata  $\pm$  SD. \*)  $p < 0.05$  vs kelompok Normal; #)  $p < 0.05$  vs kelompok IND FRK. IND FRK: Induksi fruktosa tanpa terapi, IND FRK+MGR50: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 50 mg/kgBB/hari, IND FRK+MGR100: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 100 mg/kgBB/hari, IND FRK+PIO3: Induksi fruktosa dengan terapi pioglitazon 3 mg/kgBB/hari.

### 4.4. Periksaan kadar insulin plasma

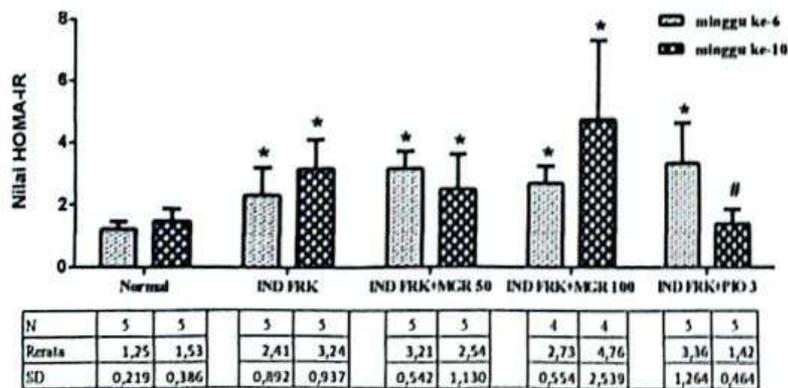
Hasil pemeriksaan kadar insulin plasma minggu ke-6 dan minggu ke-10 disajikan pada Gambar 4.4. Pada gambar tersebut dapat dilihat sudah adanya perbedaan bermakna antara kadar insulin minggu ke-6 kelompok normal dengan kelompok lainnya. Perbedaan bermakna antara kadar insulin minggu ke-10 terlihat pada kelompok normal dengan kelompok IND FRK dan antara kelompok IND FRK +PIO 3 dengan kelompok IND FRK.



**Gambar 4.4.** Kadar insulin plasma puasa minggu ke-6 dan minggu ke-10. Data disajikan sebagai nilai rerata  $\pm$  SD. \*)  $p < 0,05$  vs kelompok Normal; #)  $p < 0,05$  vs kelompok IND FRK. IND FRK: Induksi fruktosa tanpa terapi, IND FRK+MGR50: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 50 mg/kgBB/hari, IND FRK+MGR100: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 100 mg/kgBB/hari, IND FRK+PIO3: Induksi fruktosa dengan terapi pioglitazon 3 mg/kgBB/hari.

#### 4.5. Perhitungan HOMA-IR

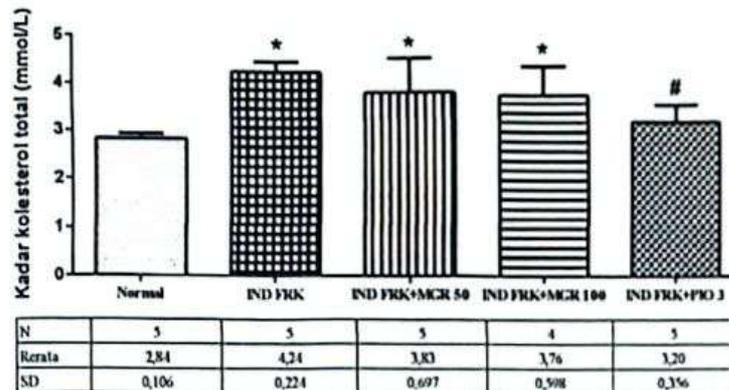
Nilai HOMA-IR dibandingkan antara tiap kelompok pada minggu ke-6 dan minggu ke-10. Nilai tersebut ditampilkan pada Gambar 4.5. Pada gambar tersebut dapat dilihat adanya perbedaan bermakna nilai HOMA-IR minggu ke-6 antara kelompok normal dengan kelompok lainnya. Selain itu, gambar tersebut juga menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara HOMA-IR minggu ke-10 kelompok normal dengan kelompok IND FRK dan kelompok IND FRK + PIO 3 dengan kelompok IND FRK.



**Gambar 4.5.** Nilai HOMA-IR minggu ke-6 dan minggu ke-10. Data disajikan sebagai nilai rerata  $\pm$  SD. \*)  $p < 0,05$  vs kelompok Normal; #)  $p < 0,05$  vs kelompok IND FRK. IND FRK: Induksi fruktosa tanpa terapi, IND FRK+MGR50: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 50 mg/kgBB/hari, IND FRK+MGR100: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 100 mg/kgBB/hari, IND FRK+PIO3: Induksi fruktosa dengan terapi pioglitazon 3 mg/kgBB/hari.

#### 4.6 Pemeriksaan kadar kolesterol total plasma

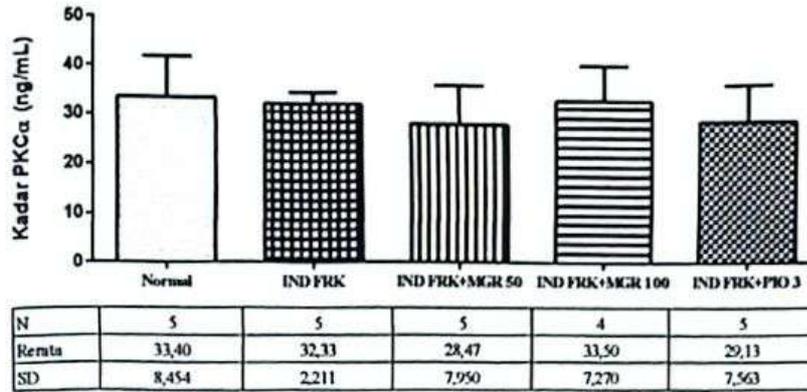
Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan kadar kolesterol total pada minggu ke-10. Kadar kolesterol total dibandingkan antara kelompok normal dengan kelompok perlakuan. Pada Gambar 4.6. dapat dilihat adanya perbedaan bermakna antara kelompok normal dengan kelompok IND FRK dan kelompok IND FRK dengan kelompok PIO 3



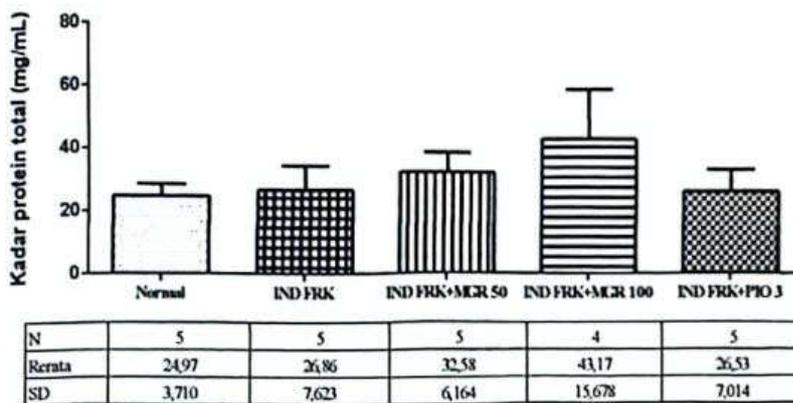
Gambar 4.6. Kadar kolesterol total puasa minggu ke-10. Data disajikan sebagai nilai rerata  $\pm$  SD. \*)  $p < 0,05$  vs kelompok Normal; #)  $p < 0,05$  vs kelompok IND FRK. IND FRK: Induksi fruktosa tanpa terapi, IND FRK+MGR50: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 50 mg/kgBB/hari, IND FRK+MGR100: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 100 mg/kgBB/hari, IND FRK+PIO3: Induksi fruktosa dengan terapi pioglitazon 3 mg/kgBB/hari.

#### 4.7. Kadar protein kinase C alfa pada otot

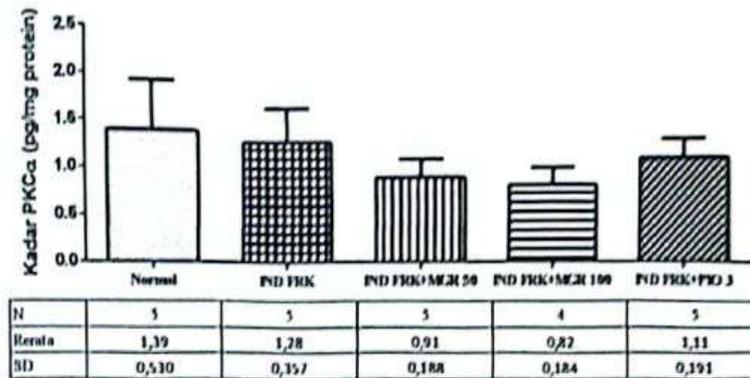
Kadar protein kinase C alfa (PKC $\alpha$ ) dalam pg/mL pada jaringan otot diukur pada akhir minggu ke-10. Perhitungan kadar protein jaringan otot dilakukan dengan menggunakan homogenat yang sama untuk memperoleh kadar PKC $\alpha$  dalam pg/mg protein. Pada setiap kelompok penelitian tidak ditemukan adanya perbedaan yang bermakna.



**Gambar 4.7.1.** Kadar PKC $\alpha$  otot minggu ke-10 (ng/mL). Data disajikan sebagai nilai rerata  $\pm$  SD. IND FRK: Induksi fruktosa tanpa terapi, IND FRK+MGR50: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 50 mg/kgBB/hari, IND FRK+MGR100: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 100 mg/kgBB/hari, IND FRK+PIO3: Induksi fruktosa dengan terapi pioglitazon 3 mg/kgBB/hari.



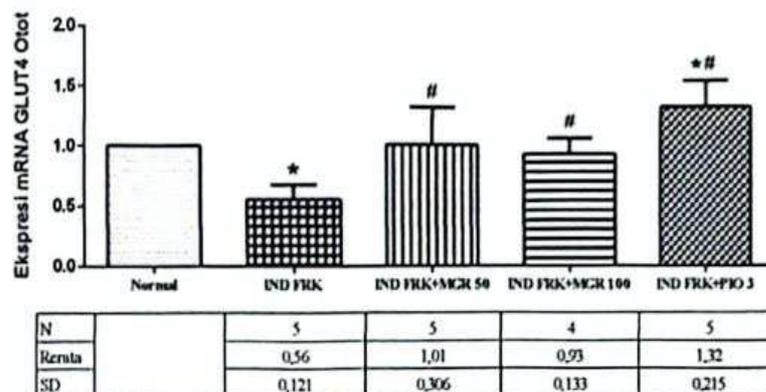
**Gambar 4.7.2.** Kadar protein total otot minggu ke-10 (mg/mL). Data disajikan sebagai nilai rerata  $\pm$  SD. N: jumlah sampel. IND FRK: Induksi fruktosa tanpa terapi, IND FRK+MGR50: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 50 mg/kgBB/hari, IND FRK+MGR100: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 100 mg/kgBB/hari, IND FRK+PIO3: Induksi fruktosa dengan terapi pioglitazon 3 mg/kgBB/hari.



**Gambar 4.7.3.** Kadar PKCa otot minggu ke-10 (pg/mg protein). Data disajikan sebagai nilai rerata  $\pm$  SD. IND FRK: Induksi fruktosa tanpa terapi, IND FRK+MGR50: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 50 mg/kgBB/hari, IND FRK+MGR100: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 100 mg/kgBB/hari, IND FRK+PIO3: Induksi fruktosa dengan terapi pioglitazon 3 mg/kgBB/hari.

#### 4.8. Ekspresi mRNA GLUT4 pada otot *vastus lateralis*

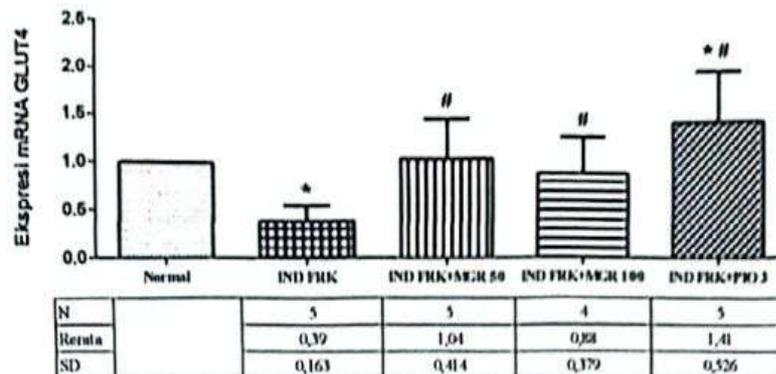
Perbandingan ekspresi mRNA GLUT4 antara kelompok perlakuan dilakukan setelah nilai ct masing-masing sampel dinormalisasi dengan nilai ct rata-rata kelompok normal. Pada Gambar 4.8 dapat dilihat adanya perbedaan bermakna antara kelompok normal dengan kelompok IND FRK dan antara kelompok IND FRK dengan kelompok perlakuan lainnya.



**Gambar 4.8.** Ekspresi mRNA GLUT4 pada otot *vastus lateralis*. Data disajikan sebagai nilai rerata  $\pm$  SD. \*)  $p < 0,05$  vs kelompok Normal; #)  $p < 0,05$  vs kelompok IND FRK. IND FRK: Induksi fruktosa tanpa terapi, IND FRK+MGR50: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 50 mg/kgBB/hari, IND FRK+MGR100: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 100 mg/kgBB/hari, IND FRK+PIO3: Induksi fruktosa dengan terapi pioglitazon 3 mg/kgBB/hari.

#### 4.9. Ekspresi mRNA GLUT4 pada lemak intraperitoneal

Perbandingan ekspresi mRNA GLUT4 antara kelompok perlakuan dilakukan setelah nilai ct masing-masing sampel dinormalisasi dengan nilai ct rata-rata kelompok normal. Pada Gambar 4.9 dapat dilihat adanya perbedaan bermakna antara kelompok normal dengan kelompok IND FRK dan antara kelompok IND FRK dengan kelompok perlakuan lainnya.



**Gambar 4.8.** Ekspresi mRNA GLUT4 pada lemak intraperitoneal. Data disajikan sebagai nilai rerata  $\pm$  SD. \*)  $p < 0.05$  vs kelompok Normal; #)  $p < 0.05$  vs kelompok IND FRK. IND FRK: Induksi fruktosa tanpa terapi, IND FRK+MGR50: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 50 mg/kgBB/hari, IND FRK+MGR100: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 100 mg/kgBB/hari, IND FRK+PIO3: Induksi fruktosa dengan terapi pioglitazon 3 mg/kgBB/hari.

## BAB V PEMBAHASAN

Pada penelitian ini digunakan fruktosa kadar tinggi untuk menginduksi resistensi insulin pada hewan coba. Metode induksi ini dipilih karena menggambarkan kondisi saat ini, yaitu semakin banyaknya minuman berkemasan yang menggunakan fruktosa sebagai pemanis yang beredar dan dikonsumsi dalam jumlah yang cukup banyak oleh masyarakat dan berakibat pada peningkatan kejadian obesitas dan resistensi insulin. Penelitian ini secara garis besar terdiri dari dua tahap. Tahap pertama adalah induksi dengan fruktosa 60% melalui sonde dan fruktosa 10% yang dicampur dengan air minum sehingga terjadi resistensi insulin. Tahap pertama berlangsung selama 6 minggu. Setelah dipastikan tikus telah menderita resistensi insulin, penelitian dilanjutkan ke tahap berikutnya.

Pada penelitian ini, resistensi insulin ditentukan dengan membandingkan nilai HOMA-IR kelompok normal dengan kelompok lainnya. HOMA-IR dihitung dengan menggunakan nilai glukosa dan insulin puasa. Pada penelitian ini, dapat dilihat adanya perbedaan bermakna pada nilai HOMA-IR minggu ke-6 dan kadar insulin plasma puasa minggu ke-6 antara kelompok normal dan kelompok induksi. Akan tetapi, kadar glukosa plasma puasa minggu ke-6 antara tiap kelompok penelitian tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna, meskipun kadar glukosa pada kelompok perlakuan cenderung lebih tinggi dibandingkan kelompok normal. Hal ini mungkin dikarenakan resistensi insulin yang terjadi pada akhir minggu ke-6 masih berupa peningkatan kadar insulin saja dan belum disertai dengan peningkatan kadar glukosa plasma puasa. Peningkatan kadar insulin ini merupakan respon tubuh untuk mempertahankan kadar glukosa dalam batas yang normal.<sup>56</sup>

Pada akhir minggu ke-6, juga dilakukan pemeriksaan kadar trigliserida plasma puasa. Perbedaan bermakna dapat dilihat pada kadar trigliserida puasa antara kelompok normal dengan kelompok induksi. Peningkatan kadar trigliserida ini terjadi karena adanya peningkatan *lipogenesis de novo* di hati yang merupakan akibat dari pemberian fruktosa konsentrasi tinggi. Hipertrigliserida inilah yang akhirnya menyebabkan terjadinya resistensi insulin yang terlihat pada peningkatan

kelompok IND FRK, meskipun dapat dilihat adanya penurunan nilai HOMA-IR minggu ke-10 bila dibandingkan dengan nilai HOMA-IR minggu ke-6 pada tikus yang memperoleh mangiferin 50 mg/kgBB (Gambar 4.5). Salah satu pemikiran mengenai penyebab dari perbedaan hasil pada penelitian ini dengan penelitian-penelitian sebelumnya adalah adanya perbedaan metode yang digunakan pada penelitian ini dengan yang digunakan oleh penelitian terdahulu. Pada penelitian tersebut mangiferin dilarutkan di dalam akuades dan diberikan pada tikus yang diinduksi menjadi diabetik dengan streptozotisin.<sup>59</sup> Selain itu, sifat farmakokinetik dari mangiferin, yaitu absorpsi yang kurang baik pada pemberian oral,<sup>18</sup> mungkin juga ikut berperan sehingga kadar mangiferin di dalam plasma masih belum cukup untuk memberikan efek anti hiperglikemik dan anti hipertrigliseridemia seperti yang ditemukan pada penelitian terdahulu. Pada penelitian ini juga diperiksa kadar kolesterol total plasma setelah pemberian mangiferin dan pioglitazon. Pada kelompok mangiferin tidak ditemukan adanya perbedaan kadar kolesterol total dengan kelompok IND FRK. Hal ini sama seperti yang ditemukan pada penelitian yang dilakukan oleh Niu dkk.<sup>14</sup>

Pada penelitian ini juga dilakukan pemeriksaan terhadap kadar PKC $\alpha$ . PKC $\alpha$  merupakan salah satu isoform dari PKC konvensional yang diaktifkan oleh diasilgliserol (DAG).<sup>42</sup> Peningkatan kadar DAG pada otot dapat disebabkan oleh peningkatan kadar asam lemak bebas yang melebihi kapasitas metabolismenya. Hal ini menyebabkan peningkatan kadar dan aktivasi PKC konvensional, salah satunya adalah PKC $\alpha$ . Pada hasil pemeriksaan kadar PKC alfa (sitosol) pada jaringan otot yang diukur pada minggu ke-10 ditemukan tidak adanya perbedaan bermakna antara kelompok penelitian. Hasil tersebut berbeda dengan hasil dari penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Avignon dkk.<sup>10</sup> Pada penelitian tersebut ditemukan adanya penurunan kadar PKC $\alpha$  di sitosol sel otot tikus dengan resistensi insulin. Penurunan ini disebabkan oleh lebih banyaknya PKC $\alpha$  yang teraktivasi oleh DAG sehingga kadar PKC $\alpha$  pada membran lebih tinggi.<sup>10</sup> Perbedaan ini mungkin disebabkan oleh perbedaan metode dan hewan coba yang digunakan. Pada penelitian tersebut digunakan metode *western blot* dan tikus Goto-Kakizaki (GK). Pada penelitian ini digunakan metode ELISA dan kemudian membagi kadar PKC $\alpha$  dengan kadar protein total. Hal ini ditujukan untuk

mencegah bias dari hasil yang diperoleh pada pemeriksaan ELISA. Kadar PKC $\alpha$  yang tinggi bisa disebabkan karena kadar protein total jaringan yang tinggi dan sebaliknya, sehingga untuk mengeliminasi faktor tersebut perlu dilakukan koreksi, yaitu dengan membagi kadar PKC $\alpha$  dari pemeriksaan ELISA dengan kadar protein total jaringan.

Pada penelitian ini juga dilakukan pemeriksaan ekspresi mRNA GLUT4 di jaringan otot. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini adalah penurunan ekspresi mRNA GLUT4 pada kelompok IND FRK. Hal ini sesuai dengan yang ditemukan oleh Kampmann dkk,<sup>37</sup> yaitu terdapat penurunan ekspresi mRNA GLUT4 pada kondisi resistensi insulin yang berat seperti yang terdapat pada pasien DM tipe 2. Akan tetapi, penurunan ekspresi yang diperoleh pada penelitian ini sedikit lebih besar dibandingkan dengan penelitian tersebut. Hal ini mungkin disebabkan oleh perbedaan asal sampel maupun subjek penelitian yang digunakan. Selain itu, penelitian ini juga menunjukkan adanya peningkatan ekspresi mRNA GLUT4 pada tikus yang memperoleh mangiferin 50 mg/kgBB dan 100 mg/kgBB. Peningkatan ekspresi ini sebanding dengan ekspresi mRNA GLUT4 yang normal. Hal yang sama juga ditemukan pada kelompok tikus yang mendapatkan pioglitazon. Namun, peningkatan ekspresi pada kelompok pioglitazon ini lebih tinggi dibanding kelompok mangiferin. Selain itu, juga dilakukan pemeriksaan ekspresi mRNA GLUT4 pada jaringan lemak intraperitoneal. Pada penelitian ini, hasil yang diperoleh pada jaringan lemak intraperitoneal sejalan dengan hasil pada pemeriksaan ekspresi mRNA GLUT4 pada jaringan otot. Penurunan ekspresi mRNA GLUT4 pada jaringan lemak yang ditemukan pada penelitian ini sama seperti yang ditemukan oleh Saravanan dkk<sup>60</sup> dan Gayet dkk.<sup>61</sup> Saravanan dkk<sup>60</sup> melakukan penelitian dengan menggunakan tikus Wistar jantan yang diberi diet dengan komposisi asam lemak trans yang dapat menginduksi terjadinya resistensi insulin. Hal ini didasarkan pada penelitian sebelumnya oleh Ibrahim dkk pada tahun 2005. Pada penelitian yang dilakukan oleh Saravanan dkk<sup>60</sup> ditemukan adanya penurunan ekspresi mRNA GLUT4 lemak (epididimis) pada tikus yang memperoleh diet tersebut. Penurunan ekspresi mRNA GLUT4 pada penelitian tersebut lebih kecil (~40%) dibandingkan penelitian ini (~60%).<sup>60</sup> Pada penelitian yang dilakukan oleh Gayet dkk,<sup>61</sup> juga ditemukan adanya penurunan ekspresi

mRNA GLUT4 jaringan lemak (visceral) pada anjing *beagles* betina yang diberikan diet tinggi lemak untuk menginduksi terjadinya resistensi insulin. Pada penelitian tersebut penurunan ekspresi yang diperoleh adalah sebesar 2 kali kelompok kontrol. Hal yang sama juga ditemukan pada jaringan otot skelet.<sup>61</sup> Peningkatan ekspresi mRNA GLUT4 pada jaringan otot skelet berhubungan dengan perbaikan resistensi insulin, seperti yang dikemukakan oleh Tsao dkk.<sup>62</sup> Tsao dkk menemukan bahwa pada mencit transgenik dengan overekspresi mRNA GLUT4 terdapat peningkatan ekspresi protein GLUT4 yang disertai dengan peningkatan *uptake 2-deoxyglucose* (2,5 kali normal) setelah stimulasi insulin. Peningkatan ekspresi mRNA GLUT4 pada jaringan lemak juga berhubungan dengan perbaikan resistensi insulin. Pada penelitian yang dilakukan oleh Atkinson dkk ditemukan bahwa peningkatan moderat ekspresi mRNA GLUT4 pada jaringan lemak (2-3 kali) dapat meningkatkan sensitifitas insulin pada mencit transgenik yang diberikan diet tinggi lemak.<sup>41</sup> Pada penelitian ini adanya peningkatan ekspresi mRNA GLUT4 pada kelompok yang mendapatkan mangiferin tidak sesuai dengan hasil yang diperoleh pada pemeriksaan kadar glukosa darah. Salah satu hal yang mungkin menyebabkan ketidaksesuaian hasil tersebut adalah adanya gangguan pada proses translasi atau translokasi protein GLUT4 sehingga meskipun terdapat peningkatan ekspresi pada tingkat gen, tidak ditemukan adanya perbaikan kadar glukosa darah.

Pada penelitian ini dapat dilihat adanya suatu pola, yaitu perbaikan resistensi insulin yang lebih nyata pada kelompok yang mendapatkan mangiferin dosis yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok yang mendapatkan dosis yang lebih tinggi. Hasil yang ditemukan ini merupakan akibat dari farmakokinetik mangiferin yang tidak linear,<sup>63</sup> sehingga penambahan dosis akan menyebabkan penurunan efek. Hal ini mungkin berhubungan dengan sifat mangiferin sebagai antioksidan, yang pada kadar yang tinggi akan berperan sebagai prooksidan. Mangiferin sebagai antioksidan dan sekaligus juga sebagai aktivator PPAR $\gamma$  bekerja dengan menghambat NF- $\kappa$ B. Radikal bebas yang dihasilkan akibat pemberian mangiferin dengan dosis yang lebih tinggi dapat menyebabkan aktivasi NF- $\kappa$ B. Hal ini akan menyebabkan penurunan aktivitas PPAR $\gamma$  sehingga terjadi penurunan transkripsi gen GLUT4 yang berakibat pada penurunan ekspresi

mRNA GLUT4. Penurunan ini akan berakibat menurunnya jumlah protein GLUT4 yang tersedia untuk *uptake* glukosa ke dalam sel.

Pada penelitian ini juga diobservasi perubahan dan perbandingan antara berat badan kelompok tikus yang diinduksi fruktosa dengan kelompok normal. Setelah 10 minggu pemberian fruktosa kadar tinggi tidak ditemukan adanya perbedaan bermakna berat badan antara kelompok induksi dan kelompok normal. Fruktosa kadar tinggi, seperti yang terdapat pada minuman yang mengandung *high fructose corn syrup*, pada beberapa penelitian ditemukan dapat menyebabkan peningkatan berat badan. Meskipun demikian, juga terdapat beberapa penelitian yang tidak mendukung hubungan antara pemberian fruktosa kadar tinggi dengan peningkatan berat badan. Salah satu penelitian yang menunjukkan hubungan antara fruktosa kadar tinggi dan peningkatan berat badan adalah penelitian yang dilakukan oleh Bocarsly dkk.<sup>64</sup> Pada penelitian tersebut ditemukan bahwa tikus yang mendapatkan akses larutan fruktosa 8% selama 12 jam per hari ditambah dengan makanan standar dengan total masa perlakuan selama 21 hari mengalami peningkatan berat badan yang bermakna dibandingkan dengan kelompok yang hanya mendapatkan makanan standar.<sup>64</sup> Penelitian lain oleh Saphiro dkk,<sup>65</sup> yang melakukan pemberian fruktosa kadar tinggi (60,4 %) dalam diit selama 6 bulan pada tikus, tidak tampak peningkatan berat badan pada tikus tersebut dibandingkan kontrol. Pemberian diit tinggi lemak setelah diit tinggi fruktosa pada tikus tersebut menyebabkan peningkatan berat badan.<sup>65</sup> Hal ini dikarenakan adanya penurunan respons terhadap leptin sehingga terjadi peningkatan nafsu makan. Pada penelitian ini tidak ditemukan adanya perbedaan bermakna berat badan antara kelompok induksi fruktosa dengan kelompok normal. Hal ini mungkin disebabkan karena masa perlakuan yang lebih singkat (10 minggu vs 6 bulan) sehingga belum terjadi resistensi leptin. Selain itu, perbedaan komposisi diit standar yang digunakan pada penelitian ini dengan penelitian yang dilakukan oleh Bocarsly dkk<sup>64</sup> juga mungkin mempengaruhi peningkatan berat badan.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

Pada penelitian ini dapat disimpulkan:

1. Pada kelompok hewan coba yang mendapatkan mangiferin 50 mg/kgBB/hr dan mangiferin 100 mg/kgBB/hari terdapat kecenderungan penurunan kadar trigliserida puasa dan kolesterol total puasa, sedangkan kecenderungan penurunan kadar glukosa puasa, perbaikan hiperinsulinemia, dan penurunan nilai HOMA-IR hanya terlihat pada kelompok yang mendapatkan mangiferin 50 mg/kgBB/hari. Akan tetapi, penurunan dan perbaikan yang dicapai tersebut masih belum setara dengan kelompok yang mendapatkan pioglitazon.
2. Pada kelompok hewan coba yang mendapatkan mangiferin 50 mg/kgBB/hr dan 100 mg/kgBB/hari terdapat peningkatan ekspresi mRNA GLUT4 pada otot dan jaringan adiposa, dan peningkatan tersebut hampir menyamai kelompok yang mendapatkan pioglitazon.
3. Pada penelitian ini tidak ditemukan adanya perbedaan kadar PKC $\alpha$  otot pada semua kelompok penelitian sehingga dapat disimpulkan bahwa resistensi insulin tidak dipengaruhi oleh kadar PKC $\alpha$ .

#### 6.2. Saran

Pada penelitian ini terdapat kekurangan sehingga untuk penelitian selanjutnya disarankan:

1. Memperpanjang masa induksi resistensi insulin agar diperoleh tingkat resistensi insulin yang maksimal.
2. Melakukan analisa terhadap jumlah protein GLUT4 dan translokasinya ke membran sel.

3. Melakukan pemeriksaan jumlah dan aktivitas protein kinase C isoform lain yang memiliki peranan dalam *uptake* glukosa ke dalam sel, antara lain protein kinase C isoform zeta (PKC $\zeta$ ).
4. Melakukan pemeriksaan aktivasi PPAR $\gamma$  dan AMPK sehingga dapat dianalisa dengan jelas mekanisme kerja mangiferin dalam memperbaiki resistensi insulin.
5. Melakukan penyesuaian dosis mangiferin yang dapat memberikan perbaikan resistensi insulin yang optimal.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C, editors. Definition of metabolic syndrome: report of the national heart, lung, and bloodinstitute/american heart association conference on scientific issues related to definition. NHLBI/AHA Conference Proceedings. 2003 Nov 14. Dallas: American Heart Association; 2004.
2. World Health Organization [Internet]. [updated 2012; cited 2013 Apr 24]. Available from: [http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2012/world\\_health\\_statistics\\_20120516/en/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2012/world_health_statistics_20120516/en/).
3. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia [Internet]. [cited 2014 Jun 9]. Available from: <http://www.depkes.go.id/downloads/Profil2011-v3.pdf>.
4. Departemen Kesehatan [Internet]. [updated 2012; cited 2013 Apr 24]. Available from: <http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/2053-kemitraan-pemerintah-dan-swasta-dalam-pengendalian-diabetes-melitus-di-indonesia- html>.
5. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome [special article]. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:911–22.
6. Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and metabolic syndrome [review]. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;299:E685-94.
7. Tappy L, Le KA, Tran C, Paquot N. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions [review]. *Nutrition.* 2010;26:1044-9.
8. Tappy L, Lee KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev.* 2010;90:23-46.
9. Cipok M, Mirzrachi SA, Bak A, Feurstein T, Steinhart R, Brodie C, et al. Protein kinase C $\alpha$  regulates insulin receptor signaling in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;345:817-24.
10. Oriente F, Andreozzi F, Romano C, Perruolo G, Perfetti A, Fiory F, et al. Protein kinase C- $\alpha$  regulates insulin action and degradation by interacting

- with insulin receptor substrate-1 and 14-3-3 $\epsilon$ . *J. Biol. Chem.* 2005;280:40642-9.
11. Avignon A, Yamada K, Zhou X, Spencer B, Cardona O, Saba-Siddique S. Chronic activation of protein kinase C in soleus muscles and other tissues of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki (GK), obese/aged, and obese/zucker rats. *Diabetes.* 1996;45:1396-404.
  12. Schwartz Av. TZDs and bone: a review of the recent clinical evidence [review]. *PPAR Res.* 2008: 1-6.
  13. Singh S, Loke YK, Furberg CD. Long-term risk of cardiovascular events with rosiglitazone: a meta-analysis. *JAMA.* 2007;298:1189-95.
  14. Niu Y, Li S, Na L, Feng R, Liu L, Li Y, et al. Mangiferin decreases plasma free fatty acids through promoting its catabolism in liver by activation of AMPK. *Plos One.* 2012;7:e3078-82.
  15. Muragunandan S, Srinivasan K, Gupta SS, Gupta PK, Lal J. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2005;97:497-501.
  16. Giron MD, Sevillano N, Salto R, Haidour A, Manzano M, Jimenez ML, et al. *Salacia oblonga* extract increases glucose transporter 4-mediated glucose uptake in L6 rat myotubes: role of mangiferin. *Clin Nutr.* 2009;28:565-74.
  17. Mahali SK, Manna SK. Beta-D-glucoside protects against advanced glycation end products (AGEs)-mediated diabetic responses by suppressing ERK and inducing PPAR gamma DNA binding. *Biochem Pharmacol.* 2012;84:1681-90.
  18. Dimitrov M, Nikolova I, Benbasat N, Kitanov G, Danchev N. Acute toxicity, antidepressive and MAO inhibitory activity of mangiferin isolated from *Hypericum aucheri*. *Biotechnol. & Biothenol.* 2011;25:2668-71.
  19. Chou CL, Lai YH, Lin TY, Lee TJF, Fang TC. Aliskiren prevents and ameliorates metabolic syndrome in fructose-fed rats. *Arch Med Sci.* 2011;882-8.

20. Xu X, Zhao CX, Wang L, Tu L, Fang X, Zheng C, et al. Increased *CYP2J3* expression reduces insulin resistance in fructose-treated rats and *db/db* mice. *Diabetes*. 2010;59:997–1005.
21. Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol*. 2002;12:67-71.
22. Luca C, Olefsky JM. Minireview: inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett*. 2008;582:97-105.
23. Drucker DJ. The biology of incretin hormones [review]. *Cell Metab*. 2006;3:153-65.
24. Meier JJ. The contribution of incretin hormones to the pathogenesis of type 2 diabetes. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab*. 2009;23:433-41.
25. Brim T, Roche E, Jeannot FA, Corkey BE, Kim KH, Prentki M. Evidence for an anaplerotic/malonyl-coa pathway in pancreatic p-cell nutrient signaling. *Diabetes*, 1996;45:190-8.
26. Thams P, Anwar MR, Capito K. Glucose triggers protein kinase A-dependent insulin secretion in mouse pancreatic islets through activation of the K<sup>+</sup> ATP channel-dependent pathway. *Eur J Endocrinol*. 2005;152:671–7.
27. Yabe D, Seino Y. Two incretin hormones GLP-1 and GIP: comparison of their actions in insulin secretion and  $\beta$  cell preservation [review]. *Prog Biophys Mol Biol*. 2011;107:248-56.
28. Capurso C, Capurso A. Review: from excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *Vasc Pharmacol*. 2012;57:91-7.
29. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*. 2012;148:852-71.
30. Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J. Biomed. Biotechnol*. 2011:1-14.
31. Sil R, Ray D, Chakraborti AS. Glycyrrhizin ameliorates insulin resistance, hyperglycemia, dyslipidemia, and oxidative stress in fructose-induced metabolic syndrome-X in rat model. *Indian J Exp Biol*. 2013;51:129-38.

32. Jalal R, Bagheri SM, Moghimi A, Rasuli MB. Hypoglycemic effect of aqueous shallot and garlic extracts in rats with fructose-induced insulin resistance. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2007;41:218–23.
33. Olson AL. Regulation of GLUT4 and Insulin-Dependent Glucose Flux. *ISRN Mol Biol.* 2012:1-12.
34. Pessin JE, Thurmond DC, Elmendorf JS, Coker KJ, Okada S. Molecular basis of insulin stimulated GLUT4 vesicle trafficking. *J. Biol. Chem.* 1999;274:2593–6.
35. Antonescu CN, Foti M, Sauvonnet N, Klip A. Ready, set, internalize: mechanisms and regulation of GLUT4 endocytosis. *Biosci. Rep.* 2009;29:1–11.
36. Garvey Wt, Maianu L, Hancock Ja, Golichowski Am, Baron A. Gene expression of GLUT4 in skeletal muscle from insulin-resistant patients with obesity, IGT, GDM, and NIDDM. *Diabetes.* 1992;41:465-75.
37. Kampmann U, Christensen B, Nielsen TS, Pedersen SB, Orskov L, Lund S. GLUT4 and UBC9 Protein Expression Is Reduced in Muscle from Type 2 Diabetic Patients with Severe Insulin Resistance. *Plos One.* 2011;6:1-7.
38. Charron MJ, Katz EB, Olson AL. *GLUT4* Gene Regulation and Manipulation. *Biol Chem.* 1999;274:3253-6.
39. Leguisamo NM, Lehnen AM, Machado UF, Okamoto MM, Markoski MM, Pinto GH. GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol.* 2012.11:1-10.
40. Carvalho E, Kotani K, Peroni OD, Kahn BB. Adipose-specific overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;289:E551–61.
41. Atkinson BJ, Griesel BA, King CD, Josey MA, Olson AL. Moderate GLUT4 Overexpression Improves Insulin Sensitivity and Fasting Triglyceridemia in High-Fat Diet–Fed Transgenic Mice. *Diabetes.* 2013;62:2249–58.

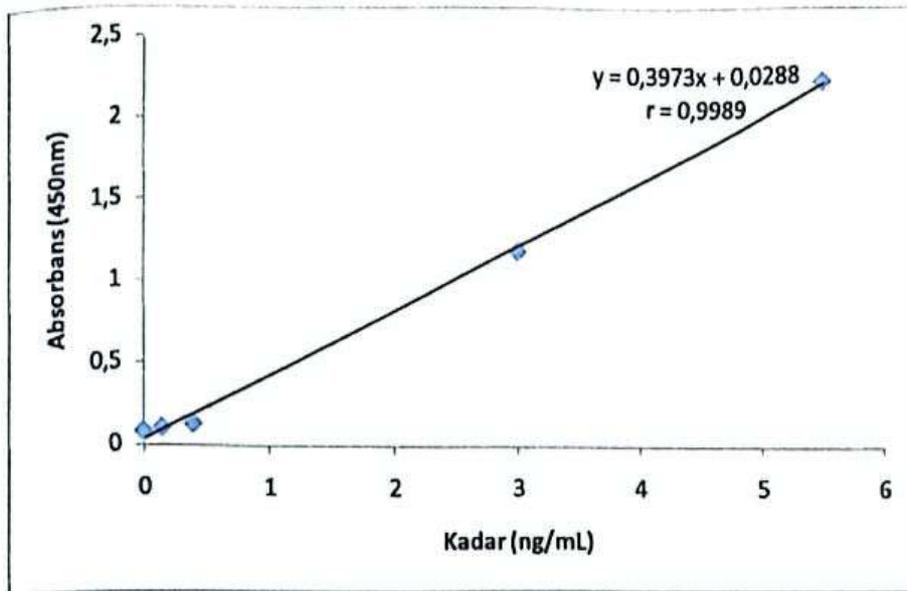
42. Sampson SR, Cooper DR. Specific protein kinase C isoform as transducers and modulators of insulin signaling. *Mol Genet Metab*. 2006;89:32-47.
43. Avignon A, Standert ML, Yamada K, Mischak H, Spencer B, Farese RV. Insulin increases mRNA levels of protein kinase C- $\alpha$  and - $\beta$  in rat adipocytes and protein kinase C- $\alpha$ , - $\beta$  and - $\theta$  in rat skeletal muscle. *Biochem J*. 1995;306:181-7.
44. Qu HQ, Li QQ, McCormirc JB. The definition of insulin resistance using HOMA-IR for americans of mexicans descent using machine learning. *Plos One*. 2011;6:1-18.
45. Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Furuta M, Sasaki RA, et al. Homeostasis model assessment is a reliable indicator of insulin resistance during follow-up of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001;24:362-5.
46. Diz PG, González AO, Alvarez MXR, Gude F, Garcia F, Francisco AD. Insulin resistance (HOMA-IR) cut-off values and the metabolic syndrome in a general adult population: effect of gender and age: EPIRCE cross-sectional study. *BMC Endocr Disord*. 2013;13:1-10.
47. Poulsen LC, Siersbaek M, Mandrup S. PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. *Semin Cell Dev Biol*. 2012;23:631-9.
48. Armoni M, Harel C, Karnieli E. Transcriptional regulation of the *GLUT4* gene: from PPAR- $\gamma$  and FOXO1 to FFA and inflammation. *TRENDS Endocrin Met*. 2007;18:100-7.
49. Lee WH, Kim SG. AMPK-dependent metabolic regulation by PPAR agonist. *PPAR Research*. 2010:1-10.
50. Badan Pengawas Obat dan Makanan [Internet]. [updated 2010; cited 2014 Apr 20]. Available from: <http://www.pom.go.id/new/index.php/view/pers/80/Pembekuan-Izin-Edar-Avandia--Avandaryl--dan-Avandamet.html>
51. Juurlink DN, Gomes T, Lipscombe LL, Austin PC, Hux JE, Mamdani MM. Adverse cardiovascular events during treatment with pioglitazone and rosiglitazone: population based cohort study. *BMJ* 2009;339:1-6.

52. Czernik BL. PPAR $\gamma$ , an essential regulator of bone mass: metabolic and molecular cues. *IBMS Bonekey*. 2010;7:171-81.
53. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(Suppl 1).
54. Yang T, Soodvilai S. Renal and Vascular Mechanisms of Thiazolidinedione-Induced Fluid Retention. *PPAR Research*. 2008:1-8.
55. Luo F, Lv Q, Zhao Y, Hu G, Huang G, Zhang, et al. Quantification and purification of mangiferin from chinese mango (*Mangifera indica* L.) cultivars and its protective effect on human umbilical vein endothelial cells under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced stress. *Int J Mol Sci*. 2012;13:11260-74.
56. Hu FB, Stampfer MJ. Insulin resistance and hypertension: the chicken-egg question revisited. *Circulation*. 2005;112:1678-80.
57. Verma S, Bhanot S, Hicke A, McNeill JH. Chronic T-type Ca<sub>2</sub>q channel blockade with mibefradil in hyperinsulinemic, insulin-resistant and hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 1997;34:121-8.
58. Maiztegui M, Borelli MI, Raschia MA, Zotto HD, Gagliardino JJ. Islet adaptive changes to fructose-induced insulin resistance: b-cell mass, glucokinase, glucose metabolism, and insulin secretion. *J Endocrinol*. 2009;200:139-49.
59. Sellamuthu PS, Arulselvan P, Kamalraj S, Fakurazi S, Kandasamy M. Protective nature of mangiferin on oxidative stress and antioxidant status in tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. *ISRN Pharmacol*. 2013:1-10.
60. Saravanan N, Haseeb A, Ehtesham NZ, Ghafoorunissa. Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue. *Eur J Endocrinol*. 2005;153:159-65.
61. Gayet C, Leray V, Saito M, Siliart B, Nguyen P. The effects of obesity-associated insulin resistance on mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor-g target genes, in dogs. *Br J Nutr*. 2007;98:497-503.

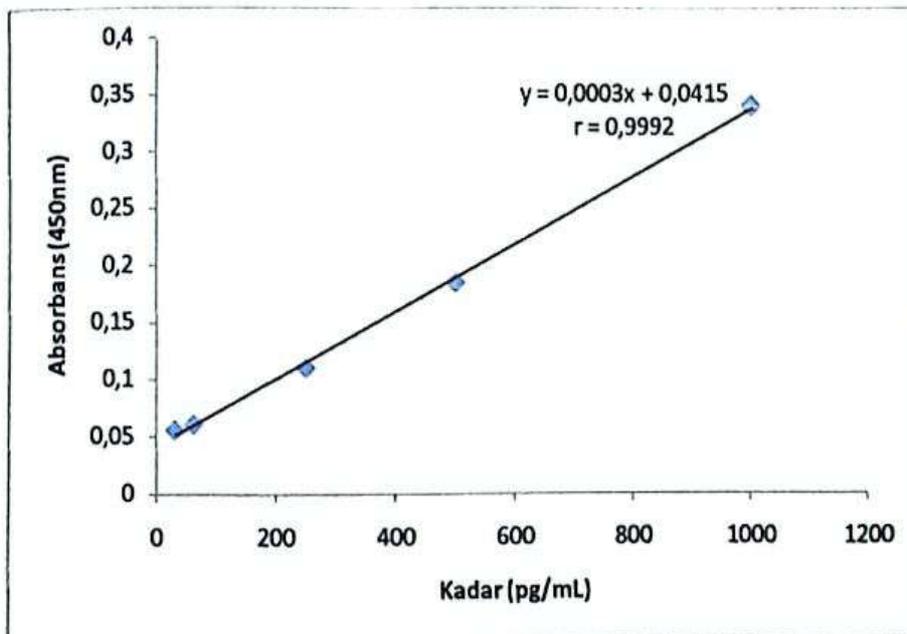
62. Tsao TS, Burcelin R, Katz EB, Huang L, Charron MJ. Enhanced insulin action due to targeted glut4 overexpression exclusively in muscle. *Diabetes*. 1996;45:28-36.
63. Liu Y, Xu F, Zeng X, Yang L, Deng Y, Wu Z, et al. Application of liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to pharmacokinetic study of mangiferin in rats. *J Chromatogr B*. 2010;878:3345-50.
64. Bocarsly ME, Powell ES, Avena NM, Hoebel BG. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacol Biochem Be*. 2010;97:101-6.
65. Saphiro A, Mu W, Roncal C, Cheng KY, Johnson RJ, Scarpace PJ. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295:R1370-5.

LAMPIRAN 1  
CONTOH DATA KURVA STANDAR

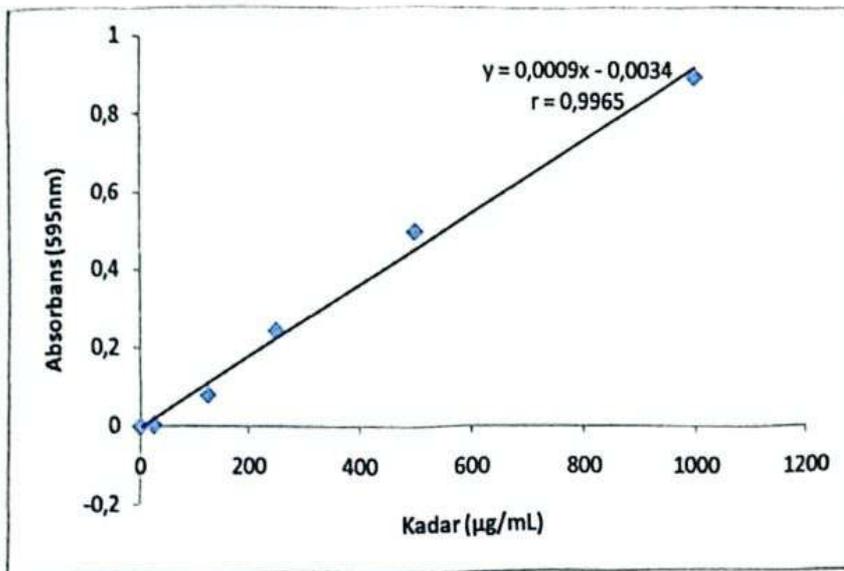
1. Kurva standar ELISA Insulin



2. Kurva standar ELISA PKC alfa



### 3. Kurva standar protein total



**Lampiran 2**  
**Data Berat Badan**

<b>Kelompok</b>	<b>BB mgg ke-1 (g)</b>	<b>BB mgg ke-3 (g)</b>	<b>BB mgg ke-6 (g)</b>	<b>BB mgg ke-10 (g)</b>
Normal	196,65±14,05	221,25±37,85	273,95±55,13	343,33±71,39
IND FRK	186,85±10,66	210,63±25,96	256,1±33,79	311,29±49,01
IND FRK + MGR 50	183,35±14,20	214,55±30,88	258,98±40,95	321,49±47,19
IND FRK + MGR 100	176,5±8,05	201,06±27,42	261,63±20,07	327,88±26,65
IND FRK + PIO 3	193,2±23,09	214,98±37,34	258,35±51,54	312,44±54,63

## Lampiran 3

## Data Pemeriksaan Parameter Plasma Minggu ke-6

Kelompok		Glukosa (mmol/L)	Trigliserida (mg/dL)	Insulin (mg/dL)	HOMA-IR
<b>Normal</b>					
	1	5,63	37,25	6,01	1,50
	2	4,90	40,30	4,46	0,97
	3	5,02	54,59	4,88	1,09
	4	5,03	32,07	5,79	1,30
	5	5,45	41,34	5,74	1,39
	<b>Mean±SD</b>	<b>5,44±0,265</b>	<b>41,11±8,351</b>	<b>5,38±0,670</b>	<b>1,24±0,219</b>
<b>IND FRK</b>					
	1	5,77	74,33	7,50	1,92
	2	5,80	69,79	6,92	1,78
	3	6,47	74,51	6,87	1,97
	4	6,01	115,16	14,79	3,95
	5	6,56	82,86	8,36	2,44
	<b>Mean±SD</b>	<b>6,12±0,372</b>	<b>86,6±16,784</b>	<b>8,89±3,354</b>	<b>2,41±0,892</b>
<b>IND FRK + MGR 50</b>					
	1	7,95	86,57	10,53	3,72
	2	5,67	91,02	14,74	3,71
	3	4,82	67,88	12,76	2,74
	4	5,31	71,62	13,99	3,30
	5	5,04	65,05	11,42	2,55
	<b>Mean±SD</b>	<b>5,76±1,267</b>	<b>88,89±16,031</b>	<b>12,69±1,744</b>	<b>3,21±0,542</b>
<b>IND FRK + MGR 100</b>					
	1	6,52	74,93	8,08	2,34
	2	5,12	72,65	11,37	2,59
	3	7,39	68,11	10,81	3,55
	4	6,30	65,40	8,76	2,45
	<b>Mean±SD</b>	<b>6,33±0,934</b>	<b>70,27±4,311</b>	<b>9,76±1,584</b>	<b>2,73±0,554</b>
<b>IND FRK + PIO 3</b>					
	1	5,16	79,40	8,53	1,96
	2	6,81	118,02	13,72	4,15
	3	6,22	82,21	11,99	3,31
	4	6,27	135,20	8,45	2,35
	5	7,33	144,30	15,43	5,03
	<b>Mean±SD</b>	<b>6,36±0,81</b>	<b>111,83±29,865</b>	<b>11,62±3,109</b>	<b>3,36±1,264</b>

**Lampiran 4**  
**Data Pemeriksaan Parameter Plasma Minggu ke-10**

Kelompok	Glukosa (mmol/L)	Trigliserida (mg/dL)	Insulin (mU/L)	Kolesterol Total (mg/dL)	HOMA-IR
<b>Normal</b>					
1	5,49	43,77	8,58	52,11	2,09
2	4,97	42,76	6,22	49,38	1,38
3	5,21	43,33	6,54	53,94	1,52
4	4,94	44,01	4,72	49,68	1,04
5	5,38	43,41	6,87	50,37	1,64
<b>Mean±SD</b>	<b>5,20±0,241</b>	<b>43,25±0,700</b>	<b>6,59±1,383</b>	<b>51,09±1,909</b>	<b>1,53±0,386</b>
<b>IND FRK</b>					
1	8,66	165,01	11,04	78,85	4,25
2	7,09	119,11	8,40	73,38	2,62
3	7,04	119,52	7,44	71,43	2,33
4	8,97	102,09	10,68	81,30	4,26
5	7,13	104,77	8,58	77,44	2,72
<b>Mean±SD</b>	<b>7,78±0,953</b>	<b>122,10±25,286</b>	<b>9,23±1,557</b>	<b>76,48±4,028</b>	<b>3,24±0,937</b>
<b>IND FRK +MGR 50</b>					
1	5,76	93,50	7,24	63,46	1,85
2	6,97	96,68	7,06	81,33	2,15
3	7,38	88,68	8,25	59,65	2,58
4	7,61	126,01	13,17	56,94	4,46
5	7,07	81,85	5,22	83,66	1,64
<b>Mean±SD</b>	<b>6,87±0,681</b>	<b>97,34±16,973</b>	<b>8,19±2,994</b>	<b>69,01±12,552</b>	<b>2,53±1,130</b>
<b>IND FRK +MGR 100</b>					
1	7,44	95,33	8,70	68,65	2,88
2	8,21	99,34	7,19	53,58	2,63
3	7,90	81,95	22,85	79,84	8,02
4	7,54	128,89	16,50	63,67	5,53
<b>Mean±SD</b>	<b>7,77±0,356</b>	<b>101,38±22,482</b>	<b>13,81±7,276</b>	<b>67,69±10,78</b>	<b>4,76±2,539</b>
<b>IND FRK +PIO 3</b>					
1	4,97	70,33	5,04	59,50	1,11
2	5,56	65,04	4,74	51,98	1,17
3	5,44	66,02	9,26	50,08	2,24
4	5,69	92,201	5,22	64,611	1,32
5	5,87	101,67	4,80	62,51	1,25
<b>Mean±SD</b>	<b>5,505±0,339</b>	<b>79,05±16,783</b>	<b>5,81±1,934</b>	<b>57,73±6,421</b>	<b>1,42±0,464</b>

## Lampiran 5

## Data Tingkat Ekspresi mRNA GLUT4 pada Otot

Kelompok		ct $\beta$ -aktin	ct GLUT4	delta ct	$\Delta\Delta$ ct	$2^{-(\Delta\Delta$ ct)}
<b>Normal</b>						
	1	27,395	27,046	-0,349		
	2	26,56	26,084	-0,476		
	3	28,3895	28,044	-0,346		
	4	26,1035	25,447	-0,657		
	5	27,1235	26,604	-0,520		
<b>Rata-rata</b>				<b>-0,469</b>		
<b>IND FRK</b>						
	1	28,426	28,992	0,566	1,035	0,488
	2	25,127	25,1585	0,032	0,501	0,707
	3	27,8825	28,669	0,787	1,256	0,419
	4	28,3585	28,6725	0,314	0,783	0,581
	5	24,386	24,8715	0,486	0,955	0,516
<b>Rata-rata<math>\pm</math>SD</b>						<b>0,556<math>\pm</math>0,1208</b>
<b>IND FRK + MGR50</b>						
	1	29,2935	28,814	-0,4795	-0,0105	1,007
	2	26,0225	26,0935	0,071	0,54	0,688
	3	24,25	24,164	-0,086	0,383	0,767
	4	26,2285	25,2195	-1,009	-0,54	1,454
	5	26,817	26,1685	-0,6485	-0,1795	1,132
<b>Rata-rata<math>\pm</math>SD</b>						<b>1,010<math>\pm</math>0,3062</b>
<b>IND FRK +MGR100</b>						
	1	26,635	26,127	-0,508	-0,039	1,027
	2	26,895	26,714	-0,181	0,288	0,819
	3	28,267	28,1135	-0,1535	0,3155	0,804
	4	29,6	29,0555	-0,5445	-0,0755	1,054
<b>Rata-rata<math>\pm</math>SD</b>						<b>0,926<math>\pm</math>0,1329</b>
<b>IND FRK + PIO3</b>						
	1	28,595	27,8655	-0,7295	-0,2605	1,198
	2	26,353	25,7085	-0,6445	-0,1755	1,129
	3	29,258	28,531	-0,727	-0,258	1,196
	4	28,208	27,0305	-1,1775	-0,7085	1,634
	5	27,958	26,9455	-1,0125	-0,5435	1,458
<b>Rata-rata<math>\pm</math>SD</b>						<b>1,323<math>\pm</math>0,2146</b>

**Lampiran 6**  
**Data Tingkat Ekspresi mRNA GLUT4 pada Lemak**

Kelompok	ct $\beta$ -aktin	ct GLUT4	$\Delta$ ct	$\Delta\Delta$ ct	$2^{-(\Delta\Delta ct)}$
<b>Normal</b>					
1	35,398	32,264	-3,134		
2	29,049	21,112	-7,937		
3	34,542	30,7815	-3,7605		
4	35,691	29,2345	-6,4565		
5	36,7705	29,753	-7,0175		
<b>Rata-rata</b>			<b>-5,6611</b>		
<b>IND FRK</b>					
1	37,957	33,197	-4,76	0,9011	0,535
2	33,973	29,633	-4,34	1,3211	0,400
3	35,0045	30,6345	-4,37	1,2911	0,409
4	36,6615	31,9935	-4,668	0,9931	0,502
5	29,185	26,574	-2,611	3,0501	0,121
<b>Rata-rata<math>\pm</math>SD</b>					<b>0,393<math>\pm</math>0,1633</b>
<b>IND FRK + MGR 50</b>					
1	35,924	29,605	-6,319	-0,6579	1,578
2	37,287	31,4655	-5,8215	-0,1604	1,118
3	37,864	33,1925	-4,6715	0,9896	0,504
4	37,057	31,1055	-5,9515	-0,2904	1,223
5	34,34	29,043	-5,297	0,3641	0,777
<b>Rata-rata<math>\pm</math>SD</b>					<b>1,040<math>\pm</math>0,4140</b>
<b>IND FRK + MGR 100</b>					
1	35,447	29,5085	-5,9385	-0,2774	1,212
2	36,7	31,614	-5,086	0,5751	0,671
3	34,1635	29,634	-4,5295	1,1316	0,456
4	36,8895	30,975	-5,9145	-0,2534	1,192
<b>Rata-rata<math>\pm</math>SD</b>					<b>0,883<math>\pm</math>0,3788</b>
<b>IND FRK + PIO 3</b>					
1	36,376	30,534	-5,842	-0,1809	1,134
2	37,028	31,2375	-5,7905	-0,1294	1,094
3	32,147	25,9485	-6,1985	-0,5374	1,451
4	35,53	28,6645	-6,8655	-1,2044	2,304
5	33,275	27,542	-5,733	-0,0719	1,051
<b>Rata-rata<math>\pm</math>SD</b>					<b>1,407<math>\pm</math>0,5260</b>

**Lampiran 7**  
**Data Pemeriksaan Protein Kinase C Alfa**

<b>Kelompok</b>		<b>PKCa (ng/mL)</b>	<b>Protein total otot (mg/mL)</b>	<b>PKCa (ng/mg protein)</b>
<b>Normal</b>				
	1	37,67	27,75	1,35
	2	25,67	28,44	0,90
	3	23,00	26,64	0,86
	4	41,67	20,25	2,06
	5	39,00	21,78	1,79
	<b>Mean±SD</b>	<b>33,40±8,454</b>	<b>24,97±3,710</b>	<b>1,39±0,530</b>
<b>IND FRK</b>				
	1	29,00	20,11	1,44
	2	34,33	19,69	1,74
	3	34,33	24,97	1,37
	4	31,67	36,64	0,86
	5	32,33	32,89	0,98
	<b>Mean±SD</b>	<b>32,33±2,211</b>	<b>26,86±7,623</b>	<b>1,28±0,357</b>
<b>IND FRK + MGR 50</b>				
	1	29,67	28,03	1,06
	2	37,00	29,56	1,12
	3	21,67	37,47	0,73
	4	35,00	40,81	0,93
	5	19,00	27,06	0,70
	<b>Mean±SD</b>	<b>28,47±7,95</b>	<b>32,58±6,164</b>	<b>0,91±0,188</b>
<b>IND FRK + MGR 100</b>				
	1	34,33	46,78	0,73
	2	43,00	61,36	0,70
	3	31,00	41,08	0,75
	4	25,67	23,44	1,09
	<b>Mean±SD</b>	<b>33,50±7,270</b>	<b>43,17±15,678</b>	<b>0,82±0,184</b>
<b>IND FRK + PIO 3</b>				
	1	39,67	38,17	1,04
	2	23,67	20,67	1,15
	3	32,33	23,72	1,36
	4	20,33	22,33	0,91
	5	29,67	27,75	1,07
	<b>Mean±SD</b>	<b>29,13±7,563</b>	<b>26,528±7,014</b>	<b>1,11±0,191</b>



Komite Etik Penelitian Kesehatan  
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia  
Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo

Health Research Ethics Committee  
Faculty of Medicine Universitas Indonesia  
Cipto Mangunkusumo Hospital



Jalan Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat 10430, Telp. 021-3157008. E-mail ec\_fku@yahoo.com

Nomor : 288 /H2.F1/ETIK/2013

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:

*The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research protocol entitled:*

**"Efek Terapi Mangiferin Terhadap Resistensi Insulin pada Model Hewan Coba yang Diinduksi dengan Diet Tinggi Fruktosa".**

Peneliti Utama : dr. Anggi Gayatri, SpFK  
*Principal Investigators*

Nama Institusi : Farmakologi Fakultas Kedokteran UI  
*Name of the Institution*

dan telah menyetujui protokol tersebut di atas.  
*and approved the above-mentioned protocol*



13 MAY 2013

Ketua  
Chairman

Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy, SpFK

\*Ethical approval berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan

\*\*Peneliti berkewajiban

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian
2. Memberitahukan status penelitian apabila
  - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical clearance* harus diperpanjang
  - b. Penelitian berhenti di tengah jalan
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*)
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*

## Efek Pemberian Mangiferin Dibandingkan dengan Pioglitazon terhadap Resistensi Insulin pada Tikus yang Diinduksi dengan Diit Tinggi Fruktosa

Kurniasari<sup>1</sup>, Wawaimuli Arozal<sup>1</sup>, Anzji Gayatri<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Magister Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Farmakologi dan Terapeutik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

E-mail: [by\\_niana@yahoo.com](mailto:by_niana@yahoo.com)

### ABSTRAK

**Latar Belakang:** Mangiferin (MGR) adalah glikosida xanton yang pertama kali diisolasi dari *Mangifera indica*. Efek anti hiperglikemik dan anti hiperlipidemik MGR merupakan akibat dari aktivasi *peroxisome proliferator activated gamma* (PPAR $\gamma$ ) dan *AMP-activated protein kinase* (AMPK). Aktivasi PPAR $\gamma$  menyebabkan peningkatan transkripsi gen *glucose transporter 4* (GLUT4) sedangkan aktivasi AMPK menyebabkan stimulasi translokasi GLUT4 ke membran sel serta peningkatan oksidasi asam lemak. Mekanisme tersebut sama dengan tiazolidinedion (TZD), yaitu obat yang digunakan untuk pengobatan resistensi insulin.

**Metode:** Tikus Spraque Dawley jantan diinduksi resistensi insulin selama 6 minggu dengan memberikan larutan fruktosa 60% melalui sonde dan fruktosa 10% sebagai air minum. Setelah induksi resistensi insulin selesai dilakukan terapi dengan MGR 50 mg/kgBB/hari atau MGR 100 mg/kgBB/hari atau pioglitazon (PIO) 3 mg/kgBB/hari diberikan selama 4 minggu dan selama itu induksi fruktosa tetap dilakukan. Pemeriksaan kadar glukosa, trigliserida, insulin, dan perhitungan nilai HOMA-IR dilakukan pada akhir minggu ke-6 sedangkan kadar kolesterol total plasma puasa, kadar protein kinase C alfa otot, serta tingkat ekspresi mRNA GLUT4 otot dan lemak diperiksa pada akhir minggu ke-10.

**Hasil:** Pada tikus dengan resistensi insulin yang mendapatkan MGR 50 mg/kgBB/hari dan MGR 100 mg/kgBB/hari terdapat kecenderungan penurunan kadar trigliserida dan kolesterol total puasa, sedangkan kecenderungan penurunan kadar glukosa dan insulin puasa serta nilai HOMA-IR ditemukan pada kelompok yang mendapatkan MGR 50 mg/kgBB/hari bila dibandingkan dengan kelompok yang tidak mendapatkan terapi (IND FRK). Pada kelompok yang mendapatkan PIO 3 mg/kgBB/hari terdapat penurunan kadar glukosa, trigliserida, insulin, kolesterol total puasa, dan nilai HOMA-IR yang berbeda bermakna dengan kelompok IND FRK. Peningkatan ekspresi mRNA GLUT4 pada jaringan otot dan lemak terlihat pada kelompok yang mendapatkan MGR dan PIO, dan peningkatan ekspresi tersebut sedikit lebih besar pada kelompok yang mendapatkan PIO. Pada pemeriksaan kadar PKC $\alpha$  tidak ditemukan adanya perbedaan yang bermakna di semua kelompok.

**Kesimpulan:** Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian MGR 50 mg/kgBB memiliki potensi untuk memperbaiki resistensi insulin meskipun perbaikan tersebut masih belum optimal dibandingkan dengan kelompok yang mendapatkan PIO 3 mg/kgBB/hari.

**Kata kunci:** mangiferin, resistensi insulin, HOMA-IR, mRNA GLUT4, fruktosa

### ABSTRACT

**Background:** Mangiferin (MGR) is a glucoside xanthone that is first isolated from *Mangifera indica*. Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effect of mangiferin related to activation of *peroxisome proliferator activated gamma* (PPAR $\gamma$ ) and *AMP-activated protein kinase* (AMPK). Mangiferin act as PPAR $\gamma$  agonist and activate glucose transporter 4 (GLUT4) gene transcription while activation of AMPK leads to GLUT4 translocation to cell

membrane and fatty acids oxidation. This mechanism are same as thiazolidinedion (TZD), which is one of medicine used for insulin resistance treatment.

**Method:** Male Spraque-Dawley rats are fed with high fructose concentration (60% on direct oral and 10% in drinking water) for 6 weeks (IND FRK) to induced insulin resistance. Treatment with MGR 50 mg/kgBW/day or 100 mg/kgBW/day or pioglitazone (PIO) 3 mg/kgBW/day is given for 4 weeks after insulin resistance induction. Fasting plasma glucose, triglyceride, insulin, and HOMA-IR value are measured in the end of sixth and tenth week. Fasting plasma total cholesterol, muscle protein kinase C (PKC $\alpha$ ) level, and mRNA GLUT4 expression level in muscle and white adipose tissue are measured in the end of tenth week.

**Result:** In this study we found that MGR 50 mg/kgBW and MGR 100 mg/kgBW had tendention to decreased fasting plasma triglyceride and total cholesterol, while MGR 50 mg/kgBW/day also had tendention to decreased fasting plasma glucose and insulin, and HOMA-IR value. In PIO treated rats, there were significant decrease of fasting plasma glucose, triglyceride, insulin, and total cholesterol, and HOMA-IR value compared with untreated rats. Increase expression level of mRNA GLUT4 in muscle and adipose tissue were observed in rats given MGR 50 and 100 mg/kgBW/day and PIO 3 mg/kgBW/day. Expression level of muscle and adipose mRNA GLUT4 in PIO treated rats were higher than in MGR treated rats. In all study groups there were no significant difference of muscle PKC $\alpha$  level.

**Conclusion:** MGR 50 mg/kgBW/day has potentition to improve insulin resistance even though this effect less than PIO 3 mg/kgBW/day.

**Key Words:** mangiferin, insulin resistance, HOMA-IR, mRNA GLUT4, fructose

## PENDAHULUAN

Resistensi insulin seringkali ditemukan pada individu dengan obesitas sentral. Prevalensi obesitas sentral di Indonesia pada individu dewasa usia > 18 tahun meningkat dari 18,8% pada tahun 2007 menjadi 26,6% pada tahun 2013.<sup>1</sup> Peningkatan ini berhubungan erat dengan pola dan gaya hidup masyarakat Indonesia sekarang ini, yaitu *intake* makanan berlebih yang disertai dengan kurangnya aktivitas. Salah satu pengobatan resistensi insulin adalah dengan thiazolidinedion (TZD), yaitu pioglitazon. Akan tetapi, penggunaan pioglitazon sebagai peningkat sensitifitas insulin dibatasi oleh efek samping yang cukup serius, yaitu edema dan penurunan massa tulang.<sup>2,3</sup> Mangiferin adalah glukosida xanton yang banyak terdapat pada berbagai tanaman, salah satunya adalah *Mangifera indica* (mangga).<sup>4</sup> Mangiferin memiliki LD<sub>50</sub> sebesar 4984 mg/kgBB/oral. Efek anti diabetik dan anti hiperlipidemik dari mangiferin telah dibuktikan pada berbagai penelitian.<sup>4,5</sup> Mangiferin dapat berikatan dengan *ligand binding domain* PPAR $\gamma$  sehingga meningkatkan kemampuan PPAR $\gamma$  untuk berikatan dengan DNA.<sup>6</sup> Selain itu, ditemukan bahwa mangiferin menurunkan kadar FFA melalui aktivasi AMPK. Hal ini penting karena kadar FFA yang tinggi dapat menyebabkan terjadinya resistensi insulin.<sup>5</sup> Pada penelitian yang lain juga ditemukan bahwa mangiferin dapat menstimulasi *uptake* glukosa pada sel otot rangka L6 dan sel adiposit 3T3 melalui peningkatan translokasi GLUT4 ke membran plasma dan stimulasi ekspresi

protein GLUT4.<sup>7</sup> Semua studi tersebut mendukung mangiferin sebagai kandidat terapi untuk resistensi insulin.

## METODE PENELITIAN

Studi ini merupakan studi eksperimental yang dilakukan pada tikus dengan rancangan berpembandingan positif (Pioglitazon) dan negatif (CMC 0,5%). Penelitian ini dilakukan di Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Tikus yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus jantan strain Spraque Dawley usia 12-16 minggu dengan berat badan 150-200 gram. Tikus yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional (PPOMN). Jumlah sampel pada tiap kelompok adalah 5 ekor tikus.

Penelitian terdiri dari dua tahap, yaitu tahap induksi resistensi insulin dan tahap terapi. Pada tahap I tikus dibagi dalam 2 kelompok. (A) kelompok normal yang tidak diinduksi dan tidak mendapatkan perlakuan. (B) kelompok perlakuan mendapatkan fruktosa Tahap I berlangsung selama 6 minggu. Pada tahap II penelitian tikus pada kelompok (B) dibagi menjadi 4 kelompok. (I) kelompok yang mendapatkan fruktosa tanpa mendapatkan terapi. (II) kelompok yang mendapatkan fruktosa dan mangiferin 50 mg/kgBB/hari. (III) kelompok yang mendapatkan fruktosa dan mangiferin 100 mg/kgBB/hari. (IV) kelompok yang mendapatkan

fruktosa dan pioglitazon 3 mg/kgBB/hari. Fruktosa yang diberikan pada tahap ke I dan ke II adalah fruktosa 60% melalui sonde dan fruktosa 10% yang ditampur dengan air minum secara *ad libitum*.<sup>9</sup> Mangiferin yang digunakan adalah bahan aktif yang diekstraksi dari *Mangifera indica* dengan kemurnian 95,8% dan dibeli dari Plamed Science Technology Inc.

Pengambilan darah puasa dilakukan pada akhir minggu ke-6 dan akhir minggu ke-10. Puasa dilakukan selama 14-16 jam. Pada akhir minggu ke-6 darah diambil dari vena ekor. Plasma yang telah dipisahkan dari darah akan digunakan untuk pemeriksaan kadar glukosa, trigliserida, dan insulin puasa. Pada akhir minggu ke-10 dilakukan nekropsis pada seluruh hewan coba. Darah dan jaringan otot serta jaringan adiposa diambil untuk pemeriksaan selanjutnya. Plasma yang diperoleh dari darah tersebut digunakan untuk pemeriksaan kadar glukosa, trigliserida, insulin dan kolesterol total puasa. Otot yang digunakan adalah *vastus lateralis*, sedangkan lemak yang digunakan adalah lemak intraperitoneal. Pada otot akan dilakukan pemeriksaan kadar protein kinase C alfa (PKC $\alpha$ ) dan tingkat ekspresi mRNA GLUT4, sedangkan pada lemak akan diperiksa tingkat ekspresi mRNA GLUT4. Pada akhir minggu ke-6 dan ke-10 akan dihitung nilai HOMA-IR [glukosa puasa (mmol/L) X insulin puasa (mU/L)] / 22,5. Nilai HOMA-IR pada akhir minggu ke-6 digunakan sebagai penentu keberhasilan induksi.

Pemeriksaan kadar glukosa, trigliserida, dan kolesterol total plasma puasa dilakukan dengan menggunakan kit dari Diasys<sup>®</sup> secara enzimatik kolorimetri. Kadar insulin plasma puasa akan diperiksa dengan menggunakan kit ELISA dari ALPCO<sup>®</sup>. Pemeriksaan kadar PKC $\alpha$  dilakukan dengan menggunakan kit ELISA dari CUSABIO<sup>®</sup>. Tingkat ekspresi mRNA GLUT4 akan diperiksa dengan menggunakan metode RT-PCR. Primer GLUT4 yang akan digunakan pada penelitian ini:  $\beta$ -aktin sense: TCACCCACACTGTGCCCATCTACG, antisense: CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATG; GLUT4 sense: AGCGTAGGTAACACTTTCT, antisense: CCGCCCTTAGTTGGTCAGAAG. Pada penelitian ini amplifikasi terhadap gen GLUT4 dan  $\beta$ -aktin dilakukan dengan menggunakan 3-step amplification (denaturasi: 94°C selama 30 detik; annealing: 56°C selama 30 detik; elongasi: 72°C selama 60 detik).

## HASIL

Pemberian fruktosa 60% melalui sonde dan 10% dalam air minum meningkatkan secara bermakna kadar trigliserida dan insulin plasma puasa serta nilai HOMA-IR, namun kadar glukosa plasma puasa belum meningkat bermakna dibandingkan kelompok normal. (Tabel 2)

Pemberian mangiferin 50 mg/kgBB/hari mampu menurunkan kadar glukosa, insulin, kolesterol total, dan nilai HOMA-IR dibandingkan kelompok yang tidak mendapatkan terapi, namun masih belum bermakna. Pada dosis tersebut, mangiferin sudah menurunkan kadar trigliserida plasma puasa secara bermakna dibandingkan dengan kelompok yang tidak mendapatkan terapi. (Tabel 2)

Pemberian mangiferin 100 mg/kgBB/hari mampu menurunkan kadar trigliserida dan kolesterol total puasa. Namun, penurunan tersebut masih belum berbeda bermakna dengan kelompok yang tidak mendapatkan terapi. Mangiferin 100 mg/kgBB belum mampu menurunkan kadar glukosa dan insulin plasma puasa. (Tabel 2)

Pada pemeriksaan tingkat ekspresi mRNA GLUT4 pada jaringan otot dan adiposa ditemukan penurunan ekspresi pada kelompok yang tidak mendapatkan terapi sedangkan pada kelompok yang mendapatkan terapi terdapat peningkatan ekspresi yang bermakna dibandingkan kelompok yang tidak mendapatkan terapi. Pada kelompok yang mendapatkan pioglitazon 3 mg/kgBB/hari peningkatan ekspresi mRNA GLUT4 sedikit lebih tinggi dibandingkan kelompok yang mendapatkan mangiferin. (Gambar 1 dan Gambar 2)

Pada pemeriksaan kadar PKC $\alpha$  jaringan otot tidak ditemukan perbedaan bermakna pada setiap kelompok penelitian. (Gambar 3)

Pada penelitian ini dilakukan observasi terhadap perubahan berat badan dari awal sampai akhir penelitian dan membandingkan berat badan kelompok tikus mendapatkan fruktosa dengan kelompok normal. Peningkatan berat badan dapat dilihat pada semua kelompok penelitian. Berat badan akhir kelompok yang mendapatkan diit fruktosa kadar tinggi tidak berbeda bermakna dengan kelompok normal. (Tabel 1)

## PEMBAHASAN

Fruktosa kadar tinggi, seperti yang terdapat pada minuman yang mengandung *high fructose corn syrup*, pada beberapa penelitian ditemukan dapat menyebabkan peningkatan berat badan. Meskipun demikian, terdapat beberapa penelitian yang tidak menemukan hubungan antara pemberian fruktosa kadar tinggi dengan peningkatan berat badan. Salah satu penelitian yang menunjukkan hubungan antara fruktosa kadar tinggi dan peningkatan berat badan adalah penelitian yang dilakukan oleh Bocarsly dkk.<sup>10</sup> Pada penelitian tersebut ditemukan bahwa tikus yang mendapatkan akses larutan 8% sirup jagung tinggi fruktosa selama 12 jam per hari dan diberi makanan standar selama 21 hari mengalami

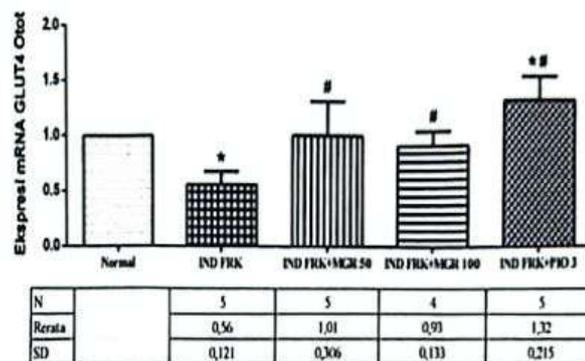
Tabel 1. Data berat badan hewan coba

Kelompok	BB mgg ke-1 (g)	BB mgg ke-3 (g)	BB mgg ke-6 (g)	BB mgg ke-10 (g)
Normal	196,65±14,05	221,25±37,85	273,95±55,13	343,33±71,39
IND FRK	186,85±10,66	210,63±25,96	256,1±33,79	311,29±49,01
IND FRK + MGR 50	183,35±14,20	214,55±30,88	258,98±40,95	321,49±47,19
IND FRK + MGR 100	176,5±8,05	201,06±27,42	261,63±20,07	327,88±26,65
IND FRK + PIO 3	193,2±23,09	214,98±37,34	258,35±51,54	312,44±54,63

Tabel 2. Hasil pemeriksaan parameter biokimia darah minggu ke-6 dan ke-10

Kelompok	Parameter yang diperiksa									
	Glukosa puasa (mmol/mL)		Insulin puasa (mU/L)		HOMA-IR		Trigliserida puasa (mmol/mL)		Kolesterol total puasa (mmol/mL)	
	Minggu ke-6	Minggu ke-10	Minggu ke-6	Minggu ke-10	Minggu ke-6	Minggu ke-10	Minggu ke-6	Minggu ke-10	Minggu ke-10	
Normal	5,4±0,26	5,2±0,24	5,4±0,67	6,6±1,38	1,2±0,22	1,5±0,39	2,3±0,46	2,4±0,04	2,8±0,11	
IND FRK	6,1±0,37	7,8±0,95*	8,9±3,35*	9,2±1,56*	2,4±0,89*	3,2±0,94*	4,8±0,93*	6,8±1,40*	4,2±0,22*	
IND FRK+MGR 50	5,8±1,27	6,9±0,68*	12,7±1,74*	8,2±2,99	3,2±0,54*	2,5±1,13*	4,9±0,89*	5,4±0,94*	3,8±0,70*	
IND FRK+MGR 100	6,3±0,93	7,8±0,36*	9,8±1,58*	13,8±7,28*	2,7±0,55*	4,8±2,54*	3,9±0,24*	5,6±1,10*	3,8±0,60*	
IND FRK+PIO3	6,4±0,81	5,5±0,34*	11,6±3,11*	5,8±1,93*	2,7±0,55*	1,4±0,46*	6,2±1,66*	4,4±0,93*	3,2±0,36*	

Ket: Data disajikan sebagai nilai rerata ± SD. (\*) p < 0,05 terhadap kelompok normal, (#) p < 0,05 terhadap kelompok IND FRK. IND FRK: Induksi fruktosa tanpa terapi, IND FRK+MGR50: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 50 mg/kgBB/hari, IND FRK+MGR100: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 100 mg/kgBB/hari, IND FRK+PIO3: Induksi fruktosa dengan terapi pioglitazon 3 mg/kgBB/hari



Gambar 1. Ekspresi mRNA GLUT4 pada otot *vastus lateralis*. Data disajikan sebagai nilai rerata ± SD. \*) p < 0,05 vs kelompok Normal; (#) p < 0,05 vs kelompok IND FRK. IND FRK: Induksi fruktosa tanpa terapi, IND FRK+MGR50: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 50 mg/kgBB/hari, IND FRK+MGR100: Induksi fruktosa dengan terapi mangiferin 100 mg/kgBB/hari, IND FRK+PIO3: Induksi fruktosa dengan terapi pioglitazon 3 mg/kgBB/hari.

sehingga terjadi peningkatan oksidasi asam lemak.<sup>11</sup> Peningkatan ini menyebabkan penurunan ketersediaan bahan baku yang diperlukan untuk sintesis TG di hati yang akan berakibat pada penurunan sekresi VLDL-TG.

Penurunan kadar trigliserida, pada kelompok yang mendapatkan mangiferin, juga diikuti dengan penurunan kadar kolesterol total, walaupun penurunan tersebut tidak cukup signifikan. Penurunan sekresi VLDL-TG umumnya diikuti dengan penurunan sintesis kolesterol *low density lipoprotein* (LDL) yang akan tampak pada penurunan kadar kolesterol total. Akan tetapi, pada kondisi terdapat penurunan kadar kolesterol LDL yang disertai dengan peningkatan kadar kolesterol *high density lipoprotein* (HDL), perubahan kadar kolesterol total mungkin tidak terlalu jelas.

Efek mangiferin terhadap perbaikan profil lipid diharapkan dapat memperbaiki resistensi insulin. Penurunan kadar glukosa dan insulin puasa pada kelompok yang mendapatkan mangiferin masih belum optimal. Hal ini tidak sesuai dengan yang ditemukan oleh Sellamuthu dkk<sup>14</sup> yang memberikan mangiferin 40 mg/kgBB/hari per oral dan mengamati penurunan kadar glukosa darah yang berbeda bermakna dengan kelompok yang tidak mendapatkan terapi. Perbedaan hasil yang ditemukan pada penelitian ini mungkin disebabkan oleh perbedaan metode dengan penelitian tersebut. Sellamuthu dkk<sup>14</sup> menggunakan akua sebagai pelarut mangiferin, sedangkan pada penelitian ini digunakan CMC. Penggunaan CMC sebagai pelarut pada penelitian ini sesuai dengan yang dilakukan oleh Niu dkk.<sup>3</sup> Selain itu, Sellamuthu dkk menggunakan streptozotisin untuk menginduksi diabetes pada tikus sedangkan pada penelitian ini digunakan diet tinggi fruktosa untuk menginduksi resistensi insulin.

Nilai HOMA-IR merupakan nilai yang menggambarkan resistensi insulin yang tergantung dari kadar glukosa dan insulin puasa. HOMA-IR bisa digunakan untuk follow-up terapi resistensi insulin karena memiliki korelasi yang signifikan dengan nilai *hyperinsulinemic-euglycemic clamp* yang merupakan *gold standar* dalam menentukan resistensi insulin.<sup>15</sup> Pada penelitian ini ditemukan penurunan nilai HOMA-IR pada kelompok yang mendapatkan mangiferin 50 mg/kgBB/hari dan pioglitazon 3 mg/kgBB/hari. Penurunan ini menunjukkan perbaikan resistensi insulin pada kedua kelompok tersebut, meskipun perbaikan tersebut masih belum optimal pada kelompok yang mendapatkan mangiferin.

Pada penelitian ini, terlihat adanya kecenderungan perbaikan pada seluruh parameter biokimia darah pada kelompok tikus yang mendapatkan mangiferin 50 mg/kgBB/hari. Hasil terapi yang belum optimal ini mungkin disebabkan oleh absorpsi mangiferin

yang kurang baik pada pemberian per oral seperti yang telah dikemukakan oleh Dimitrov dkk.<sup>16</sup> Pada penelitian tersebut, dilakukan pemulaian indeks absorpsi mangiferin yang diberikan per oral dan dibandingkan dengan yang diberikan secara intra peritoneal dan ditemukan indeks absorpsi mangiferin per oral adalah 10%.<sup>16</sup> Meskipun telah diketahui bahwa indeks absorpsi per oral mangiferin rendah, penelitian ini tetap memberikan mangiferin secara oral karena rencana penggunaan mangiferin sebagai obat yang diberikan secara oral. Selain itu, hal ini juga didasarkan pada penelitian yang dilakukan Sellamuthu dkk<sup>14</sup> yang juga menggunakan jalur pemberian yang sama.

GLUT4 merupakan transporter glukosa yang memasukan glukosa dari luar ke dalam sel.<sup>17</sup> Pada resistensi insulin terdapat penurunan ekspresi mRNA GLUT4, seperti yang ditemukan oleh Kampmann dkk<sup>18</sup>, Saravanan dkk<sup>19</sup>, dan Gayet dkk.<sup>20</sup> Penurunan ini mungkin diakibatkan oleh peningkatan sitokin proinflamasi, seperti *tumor necrosis factor alpha* (TNF $\alpha$ ) pada resistensi insulin,<sup>21</sup> yang dapat mengaktifkan jalur *nuclear factor kappa B* (NF $\kappa$ B). Aktifasi jalur NF $\kappa$ B akan berakibat pada penurunan aktivitas transkripsi PPAR $\gamma$ ,<sup>6</sup> sehingga transkripsi gen yang dikontrol oleh PPAR $\gamma$  akan menurun, antara lain gen GLUT4.<sup>22</sup> Hal ini menyebabkan penurunan ekspresi mRNA GLUT4 pada resistensi insulin. Pada kelompok yang mendapatkan mangiferin dan pioglitazon dapat diamati peningkatan ekspresi mRNA GLUT4. Peningkatan ini disebabkan oleh peningkatan aktivitas transkripsi PPAR $\gamma$ . Mangiferin dan pioglitazon bekerja sebagai agonis PPAR $\gamma$  dan mengaktifkan transkripsi gen GLUT4.<sup>6</sup> Selain itu, mangiferin juga menghambat NF $\kappa$ B sehingga mencegah penurunan aktivitas PPAR $\gamma$ .<sup>6</sup> Pemberian mangiferin dan pioglitazon meningkatkan ekspresi mRNA GLUT4 pada jaringan otot dan jaringan lemak. Tingkat ekspresi pada otot dan lemak hampir sama. Akan tetapi, penurunan ekspresi pada jaringan adiposa lebih besar dibandingkan dengan jaringan otot, sehingga secara keseluruhan dapat dikatakan peningkatan ekspresi mRNA GLUT4 di jaringan adiposa lebih besar dibandingkan di jaringan otot. Hal ini mungkin disebabkan oleh ekspresi PPAR $\gamma$  yang lebih tinggi pada jaringan adiposa.

Peningkatan ekspresi mRNA GLUT4 di jaringan otot dan jaringan adiposa akibat pemberian mangiferin tidak disertai dengan perbaikan parameter biokimia darah, seperti penurunan kadar glukosa dan insulin plasma yang optimal. Hal ini berbeda dengan yang dikemukakan oleh Tsao dkk<sup>23</sup> dan Atkinson dkk.<sup>24</sup> Tsao dkk<sup>23</sup> menemukan peningkatan uptake *2-deoxyglucose* setelah stimulasi dengan insulin pada otot tikus transgenik dengan overekspresi mRNA GLUT4. Hal yang serupa ditemukan oleh Atkinson dkk<sup>24</sup> pada

jaringan adiposa mencit transgenik dengan overekspresi mRNA GLUT4 yang diberikan diit tinggi lemak, yaitu peningkatan sensitivitas insulin pada jaringan lemak tersebut. Perbedaan ini mungkin terjadi akibat adanya gangguan pada proses translasi atau translokasi GLUT4 sehingga perbaikan pada tingkat gen tidak disertai dengan perbaikan kadar glukosa dan insulin plasma.

PKC $\alpha$  merupakan salah satu protein yang berperan dalam jalur transduksi sinyal insulin. Diasilgliserol (DAG) dapat mengaktifasi PKC $\alpha$  dan menyebabkan translokasi protein ini ke membran.<sup>25</sup> Pada resistensi insulin terdapat peningkatan DAG di jaringan, antara lain otot skelet, yang dapat mengganggu sinyal transduksi insulin. Pada penelitian yang dilakukan oleh Avignon dkk,<sup>26</sup> ditemukan peningkatan kadar PKC $\alpha$  di membran dan penurunan kadar PKC $\alpha$  di sitosol sel otot skelet tikus Goto-Kakizaki (GK) dibandingkan dengan tikus kelompok normal. Tikus GK memiliki fenotip, antara lain resistensi insulin yang terlihat dari adanya hiperinsulinemia. Perbedaan hasil yang ditemukan pada penelitian ini dengan penelitian terdahulu tersebut mungkin disebabkan oleh perbedaan metode pemeriksaan. Pada penelitian yang dilakukan oleh Avignon dkk<sup>26</sup> digunakan Western Blot untuk menentukan kadar PKC $\alpha$  di membran dan sitosol sel, sedangkan pada penelitian ini digunakan ELISA. Selain itu, Avignon dkk menggunakan tikus GK yang memiliki karakteristik yang hampir sama antar individu sedangkan pada penelitian tikus Sprague Dawley yang memiliki karakteristik yang lebih variatif antar individu.

Pada penelitian ini juga dapat dilihat suatu pola, yaitu perbaikan resistensi insulin yang lebih nyata pada kelompok tikus yang mendapatkan mangiferin 50 mg/kgBB/hari dibandingkan kelompok tikus yang mendapatkan dosis mangiferin yang lebih besar, yaitu 100 mg/kgBB/hari. Hal ini disebabkan oleh kinetika mangiferin yang tidak linear,<sup>27</sup> sehingga pada penambahan dosis terjadi penurunan efek. Selain itu, perlu diingat bahwa mangiferin memiliki sifat antioksidan.<sup>14</sup> Pada umumnya, antioksidan pada kadar yang tinggi dapat bersifat prooksidan. Hal ini mungkin juga menyebabkan pada dosis yang lebih tinggi efek yang dimunculkan kurang baik dibandingkan dosis yang lebih tinggi. Adanya prooksidan akan menyebabkan munculnya radikal bebas yang dapat mengaktifasi NF $\kappa$ B. Aktifasi NF $\kappa$ B menyebabkan penurunan aktivitas PPAR $\gamma$  sehingga menurunkan ekspresi GLUT4. Hal ini akan berakibat pada penurunan efek perbaikan resistensi insulin.

#### KESIMPULAN

Pada penelitian ini dapat disimpulkan pemberian mangiferin dengan dosis 50 mg/kgBB/hari berpotensi untuk memperbaiki resistensi insulin meskipun hasil yang diberikan masih belum

optimal dibandingkan dengan pioglitazon 3 mg/kgBB/hari.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Penelitian ini didanai oleh RISBINKES.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Departemen Kesehatan Republik Indonesia [Internet]. [cited 2014 Jun 15]. Available from: <http://depkes.go.id/downloads/riskesda2013/Hasil%20Riskesda%202013.pdf>
2. Schwartz Av. TZDs and bone: a review of the recent clinical evidence [review]. PPAR Res. 2008; 1-6.
3. Singh S, Loke YK, Furberg CD. Long-term risk of cardiovascular events with rosiglitazone: a meta-analysis. JAMA. 2007;298:1189-95.
4. Muruganandan S, Srinivasan K, Gupta SS, Gupta PK, Lal J. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. J Ethnopharmacol. 2005;97:497-501.
5. Niu Y, Li S, Na L, Feng R, Liu L, Li Y, et al. Mangiferin decreases plasma free fatty acids through promoting its catabolism in liver by activation of AMPK. Plos One. 2012;7:e3078-82.
6. Mahali SK, Manna SK. Beta-D-glucoside protects against advanced glycation end products (AGEs)-mediated diabetic responses by suppressing ERK and inducing PPAR gamma DNA binding. Biochem Pharmacol. 2012;84:1681-90.
7. Giron MD, Sevillano N, Salto R, Haidour A, Manzano M, Jimenez ML, et al. *Salacia oblonga* extract increases glucose transporter 4-mediated glucose uptake in L6 rat myotubes: role of mangiferin. Clin Nutr. 2009;28:565-74.
8. Sil R, Ray D, Chakraborti AS. Glycyrrhizin ameliorates insulin resistance, hyperglycemia, dyslipidemia, and oxidative stress in fructose-induced metabolic syndrome-X in rat model. Indian J Exp Biol. 2013;51:129-38.
9. Jalal R, Bagheri SM, Moghimi A, Rasuli MB. Hypoglycemic effect of aqueous shallot and garlic extracts in rats with fructose-induced insulin resistance. J. Clin. Biochem. Nutr. 2007;41:218-23.
10. Bocarsly ME, Powell ES, Avena NM, Hoebel BG. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: increased body weight, body fat and triglyceride levels. Pharmacol Biochem Be. 2010;97:101-6.

11. Saphiro A, Mu W, Roncal C, Cheng KY, Johnson RJ, Scarpace PJ. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295:R1370-5.
12. Tappy L, Lee KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev*. 2010;90:23-46.
13. Leonardini A, Laviola L, Perrini S, Natalicchio A, Giorgino F. Cross-talk between PPAR $\gamma$  and insulin signaling and modulation of insulin sensitivity. *PPAR research*. 2009:1-12.
14. Sellamuthu PS, Arulselvan P, Kamalraj S, Fakurazi S, Kandasamy M. Protective nature of mangiferin on oxidative stress and antioxidant status in tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. *ISRN Pharmacol*. 2013:1-10.
15. Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Furuta M, Sasaki RA, et al. Homeostasis model assessment is a reliable indicator of insulin resistance during follow-up of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001;24:362-5.
16. Dimitrov M, Nikolova I, Benbasat N, Kitanov G, Danchev N. Acute toxicity, antidepressive and MAO inhibitory activity of mangiferin isolated from *Hypericum aucheri*. *Biotechnol. & Biochemol*. 2011;25:2668-71.
17. Olson AL. Regulation of GLUT4 and Insulin-Dependent Glucose Flux. *ISRN Mol Biol*. 2012:1-12.
18. Kampmann U, Christensen B, Nielsen TS, Pedersen SB, Orskov L, Lund S. GLUT4 and UBC9 Protein Expression Is Reduced in Muscle from Type 2 Diabetic Patients with Severe Insulin Resistance. *Plos One*. 2011;6:1-7.
19. Saravanan N, Haseeb A, Ehtesham NZ, Ghafoorunissa. Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue. *Eur J Endocrinol*. 2005;153:159-65.
20. Gayet C, Leray V, Saito M, Siliart B, Nguyen P. The effects of obesity-associated insulin resistance on mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  target genes, in dogs. *Br J Nutr*. 2007;98:497-503.
21. Luca C, Olefsky JM. Minireview: inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett*. 2008;582:97-105.
22. Armoni M, Harel C, Karnieli E. Transcriptional regulation of the *GLUT4* gene: from PPAR- $\gamma$  and FOXO1 to FFA and inflammation. *TRENDS Endocrin Met*. 2007;18:100-7.
23. Tsao TS, Burceclin R, Katz EB, Huang L, Charron MJ. Enhanced insulin action due to targeted *glut4* overexpression exclusively in muscle. *Diabetes*. 1996;45:28-36.
24. Atkinson BJ, Griesel BA, King CD, Josey MA, Olson AL. Moderate GLUT4 Overexpression Improves Insulin Sensitivity and Fasting Triglyceridemia in High-Fat Diet-Fed Transgenic Mice. *Diabetes*. 2013;62:2249-58.
25. Cipok M, Mirzazchi SA, Bak A, Feurstein T, Steinhart R, Brodie C, et al. Protein kinase C $\alpha$  regulates insulin receptor signaling in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2006;345:817-24.
26. Avignon A, Yamada K, Zhou X, Spencer B, Cardona O, Saba-Siddique S. Chronic activation of protein kinase C in soleus muscles and other tissues of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki (GK), obese/aged, and obese/zucker rats. *Diabetes*. 1996;45:1396-404.
27. Liu Y, Xu F, Zeng X, Yang L, Deng Y, Wu Z, et al. Application of liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to pharmacokinetic study of mangiferin in rats. *J Chromatogr B*. 2010;878:3345-50.

## RIWAYAT HIDUP



### Data Pribadi

Nama : dr. Kurniasari

Tempat/tanggal lahir : Jakarta/ 19 Maret 1983

Agama : Katholik

Alamat : Jl. Rawa Kupa II No.646, Tomang - Jakarta Barat

### Riwayat Pendidikan

1. 1997-2000 : SMUK St. Louis I, Surabaya

2. 2000-2004 : Sarjana Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti, Jakarta

3. 2004-2007 : Profesi Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti, Jakarta