

Uji Aktivitas Peningkatan Sensitivitas Insulin Ekstrak Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa*) melalui Pengukuran Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi Insulin Reseptor Substrat-1 (terhadap Tikus Wistar Model Diabetes Mellitus Tipe 2)

Fenny Kristanti Panggabean*, Efta Triastuti*, Ema Pristi Yunita*

ABSTRAK

Biji jintan hitam (*Nigella sativa*) merupakan tanaman herbal untuk terapi dan pencegahan diabetes mellitus (DM tipe 2). Salah satu penyebab DM tipe 2 adalah penurunan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS (*insulin receptor substrat*)-1 yang berefek pada peningkatan resistensi insulin. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas peningkatan sensitivitas insulin dari ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa*) pada kondisi resistensi insulin melalui pengukuran konsentrasi tirosin terfosforilasi pada IRS-1 dan hubungannya dengan konsentrasi glukosa darah puasa. Desain penelitian yang digunakan adalah *true experimental*, dengan sampel tikus wistar jantan berjumlah 24 ekor dalam 5 kelompok perlakuan dan 1 kontrol normal. Kelompok perlakuan diinduksi DM dengan diet fruktosa sebanyak 16 g yang diberikan melalui larutan fruktosa untuk penyondean dan campuran pakan tikus. Kelompok Pp mendapatkan metformin, Pn tanpa pemberian ekstrak, P1, P2, P3 mendapatkan ekstrak jintan hitam 24 mg/kgBB, 48 mg/kgBB, dan 96 mg/kgBB. Induksi DM dilakukan dengan diet tinggi fruktosa selama 6 minggu dan terapi dilakukan setelah induksi DM2 selama 30 hari. Ekstrak biji jintan hitam secara statistik tidak memiliki efek peningkatan sensitivitas insulin melalui peningkatan konsentrasi tirosin terfosforilasi pada IRS-1 yang berbeda antar kelompok dengan nilai $p > 0,05$ (0,151) dan nilai korelasi yang bervariasi antar kelompok. Ekstrak biji jintan hitam tidak meningkatkan sensitivitas insulin melalui peningkatan konsentrasi tirosin terfosforilasi pada IRS-1. Hal ini mungkin disebabkan oleh kegagalan induksi fruktosa untuk mengkondisikan tikus menjadi tikus model DM tipe 2.

Kata kunci : Diabetes Mellitus tipe 2 (DM tipe 2), Ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa*), Tirosin terfosforilasi IRS-1.

Activity Assay of Insulin sensitivity in black seed extract (*Nigella sativa*) by measuring the concentration of phosphorylated tyrosine on IRS-1 (in the Wistar Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus)

ABSTRACT

Black seed (*Nigella sativa*) is a herbal plant that uses as treatment and prevention of type 2 Diabetes Mellitus (DM2). One of the causes of type 2 diabetes mellitus is depletion of IRS concentration (insulin receptor substrate)-1 phosphorylated tyrosine which induce insulin resistance elevation. The purpose of this study was to investigate the activity of elevation insulin sensitivity by using black seed extract on insulin resistance condition. Elevation of insulin sensitivity was investigated by measuring the concentration of phosphorylated tyrosine on IRS-1 and its correlation with the concentration of fasting blood glucose. This study used a true experimental design, samples consisted of 24 male Wistar rats, divided by 5 treatment groups (Pp, Pn, P1, P2, P3) and 1 normal control group. Pp group administered by metformin, Pn group administered none, P1, P2, and P3 administered by black seed extract 24 mg/kgBW, 48 mg/kgBW, and 96 mg/kgBW. Diabetes induction was done by high-fructose diet for 6 weeks. The therapy performed after DM2 induction for 30 days. The results showed nonparametric Kruskal-Wallis value $p > 0.05$ (0.151) which means there was no significant differences in the concentration of phosphorylated tyrosine IRS-1 among treatment groups. The conclusion in this study was black seed extract had no significant elevation effect of insulin sensitivity through increased concentration of tyrosine phosphorylation in different IRS-1. Furthermore, it was probably caused by failure of fructose induction in order to make rat DM2 models.

Keywords: Black seed extract (*Nigella sativa*), IRS-1 phosphorylated tyrosine, Type 2 diabetes mellitus (DM2)

* Program Studi Farmasi, FKUB

PENDAHULUAN

Diabetes mellitus tipe 2 (*non-insulin-dependent*) merupakan kondisi saat tubuh tidak menggunakan insulin secara efektif.¹ Diabetes mellitus tipe 2 dialami oleh 90 % orang dari total keseluruhan penderita diabetes di seluruh dunia yang rata-rata diakibatkan oleh kelebihan berat badan dan kurangnya aktivitas fisik, selain faktor resiko lain yang berperan sebagai penyebab penyakit ini.

Insulin merupakan hormon yang diproduksi oleh pankreas yang berfungsi meregulasi gula darah di dalam tubuh. Insulin akan berikatan dengan reseptornya untuk dapat menjalankan fungsinya, yaitu meregulasi glukosa darah di dalam tubuh. Resistensi insulin merupakan faktor resiko terbesar DM 2 dan mengarah kepada kondisi ketika konsentrasi fisiologis insulin bekerja kurang efektif.²

Pemberian produk dengan kandungan *high-fructose diet* dapat mengubah tahapan awal transduksi sinyal insulin yang memiliki peran penting dalam penginduksian resistensi insulin.³ Pada penelitian ini, pengujian aktivitas perbaikan resistensi insulin dari ekstrak biji jintan hitam dilakukan dengan pengukuran konsentrasi tirosin terfosforilasi pada *insulin receptor substrat-1* (IRS-1) karena IRS-1 memiliki konsentrasi terbesar dari insulin receptor tirosin kinase dan terbukti dapat mengaktivasi *phosphatidylinositol* (PI)3-kinase dan mendukung translokasi GLUT-4.⁴ Penurunan ambilan glukosa memiliki hubungan yang signifikan dengan penurunan tirosin terfosforilasi pada IRS-1.⁵

Biji jintan hitam (*Nigella sativa*) merupakan tanaman herbal yang banyak digunakan sebagai terapi pencegahan atau pengobatan berbagai macam penyakit, salah satunya antidiabetes dan hiperglikemi yang telah dilaporkan pada beberapa studi ilmiah *in vivo* dan *in vitro*.⁶⁻¹⁴ Ekstrak biji jintan hitam memiliki berbagai macam kandungan, salah satunya thymoquinon (komponen *volatile oil* terbesar).¹⁵ Salah satu penelitian mengenai thymoquinon membuktikan bahwa terjadi penurunan serum glukosa dan peningkatan pada konsentrasi serum insulin yang rendah pada tikus yang diinduksi streptozocin untuk menghasilkan kondisi diabet.. Aktivitas ekstrak

tanaman herbal tersebut terhadap konsentrasi tirosin terfosforilasi pada IRS-1 yang juga berperan pada peristiwa pengikatan insulin terhadap reseptornya belum diketahui sehingga penelitian ini menekankan pada aktivitas ekstrak biji jintan hitam terhadap konsentrasi tirosin terfosforilasi pada IRS-1.

BAHAN DAN METODE

Metode penelitian ini telah mendapatkan surat keterangan kelaikan etik (*ethical clearance*) No. 236A / EC / KEPK / 05 / 2013 yang dikeluarkan pada tanggal 31 Mei 2013 oleh Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Komisi Etik Penelitian Kesehatan.

Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah *true experimental*, dengan sampel tikus Wistar jantan berjumlah 24 ekor. Sampel dibagi ke dalam 6 kelompok, yaitu 5 kelompok perlakuan (Pp, Pn, P1, P2, dan P3) dan 1 kontrol normal. Kelompok perlakuan diinduksi DM dengan diet fruktosa sebanyak 16 g yang diberikan melalui larutan fruktosa untuk penyondean dan campuran pakan tikus. Kelompok Pp mendapatkan metformin, Pn tanpa pemberian ekstrak, serta P1, P2, dan P3 mendapatkan ekstrak jintan hitam 24 mg/kgBB, 48 mg/kgBB, dan 96 mg/kgBB. Induksi DM dilakukan dengan diet tinggi fruktosa selama 6 minggu dan terapi dilakukan setelah induksi DM2 selama 30 hari.

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk perawatan dan perlakuan hewan coba. Pengujian konsentrasi tirosin terfosforilasi pada IRS-1 dengan ELISA dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pembuatan ekstrak biji jintan hitam dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Brawijaya. Waktu penelitian dimulai pada Februari 2013 setelah mendapatkan persetujuan etik dan berakhir pada Juni 2013. Biji jintan hitam (*Nigella sativa*) yang digunakan berbentuk serbuk simplisia yang berasal dari Badan Materia Medika.

Bahan dan Alat

Anti-phospho-IRS 1 (Tyr 1222) polyclonal antibody, anti-rabbit IgG biotin, simplisia biji jantan hitam, alat pengestrak dan ELISA reader.

Anestesi Hewan Coba

Digunakan Ketamin HCL secara intravena 0,2 mL di ad 0,5 mL dengan *water for injection* untuk semua tikus.

Analisis Data

Data hasil pengamatan dianalisis dengan SPSS 16.0 dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut: uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji Kruskal-Wallis, dan uji korelasi.

HASIL PENELITIAN

Hasil Pengukuran Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1

Konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 diukur dengan metode ELISA dan ditampilkan pada Tabel 1. Hasil uji normalitas data konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 menggunakan SPSS didapatkan nilai $p > 0,05$ untuk 5 kelompok perlakuan dan kelompok Pn dengan nilai $p < 0,05$ sehingga distribusi konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 adalah tidak normal. Transformasi dengan menggunakan \sqrt{x} dan $1/\sqrt{x}$ didapatkan nilai p

$< 0,05$ pada kelompok Pn tetap, yaitu 0,00. Hasil uji homogenitas data konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 didapatkan nilai $p = 0,063$ untuk seluruh kelompok dengan $p > 0,05$ menunjukkan data konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 adalah homogen. Hasil uji non parametrik Kruskal Wallis didapatkan $p = 0,151$, nilai $p > 0,05$ dimana tidak terdapat perbedaan yang signifikan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 antar kelompok perlakuan. Data hasil uji korelasi Pearson antara konsentrasi GDP dengan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 ditampilkan pada Tabel 3.

Hasil Delta Glukosa Darah Puasa

Hasil delta glukosa darah puasa sebelum dan setelah perlakuan ditampilkan pada Tabel 1. Uji normalitas delta glukosa darah puasa tikus didapatkan nilai $p > 0,05$ pada tiap kelompok perlakuan sehingga perubahan glukosa darah puasa dalam penelitian ini adalah normal. Uji homogenitas delta glukosa darah puasa tikus didapatkan nilai $p = 0,004$, dimana nilai $p < 0,05$ sehingga data delta glukosa darah puasa tikus tidak homogen. Kemudian dilakukan uji non parametrik Kruskal-Wallis didapatkan $p = 0,420$, dimana nilai $p > 0,05$ sehingga tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari data glukosa darah puasa tikus antar kelompok perlakuan.

Tabel 1. Konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 dan delta GDP sebelum dan setelah perlakuan

Kelompok Perlakuan	Nomor Tikus	Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1 ($\mu\text{g/mL}$)	Delta GDP
Pp	1	0,006	11
	2	0,009	8
	3	0,063	-27
Pn	4	0,014	15
	5	0,005	18
	6	0,014	-38
P1	7	0,020	36
	8	0,043	25
	9	0,029	50
P2	10	0,047	20
	11	0,023	53
	12	0,024	5
P3	13	0,053	34
	14	0,026	6
	15	0,026	-47
P0	16	0,113	-5
	17	0,020	-
	18	0,018	-
	19	0,036	-
	20	0,079	-

Keterangan: Pp = kelompok positif, Pn = kelompok negatif, P1 = kelompok perlakuan 1, P2 = kelompok perlakuan 2, P3 = kelompok perlakuan 3, P0 = kontrol normal, delta GDP = delta glukosa darah puasa.

Tabel 2. Hasil pengukuran delta GDP dan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1

Kelompok Perlakuan	Deskripsi	
	Delta GDP	Konst.Fosfo Tir IRS-1 ($\mu\text{g/mL}$)
Pp	-2,667+21,127	0,009 (0,006-0,063)
Pn	-1,667+31,501	0,014 (0,005-0,14)
P1	37+12,530	0,029 (0,020-0,043)
P2	28+20,445	0,036 (0,023-0,053)
P3	-15,333+27,970	0,052 (0,026-0,113)

Keterangan: Pp = kelompok positif, Pn = kelompok negatif, P1 = kelompok perlakuan 1, P2 = kelompok perlakuan 2, P3 = kelompok perlakuan 3, delta GDP = delta glukosa darah puasa, Konst. Fosfo Tir IRS-1 = konsentrasi tirosin terfosforilasi di IRS-1.

Tabel 3. Hasil uji korelasi Pearson konsentrasi GDP dengan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1

Kelompok	Jumlah Sampel (n)	Kekuatan Korelasi (r)	Signifikansi (p)
Pp	3	-1,000	>0,05
Pn	3	-0,541	>0,05
P1	3	0,573	>0,05
P2	4	0,128	>0,05
P3	3	0,994	>0,05

Keterangan: Pp = kelompok positif, Pn = kelompok negatif, P1 = kelompok perlakuan 1, P2 = kelompok perlakuan 2, P3 = Kelompok Perlakuan 3, delta GDP = delta glukosa darah puasa.

PEMBAHASAN

Hasil uji statistik dari penelitian ini didapatkan bahwa tidak terdapat perbedaan delta glukosa darah dan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 yang dapat menggambarkan efek biji jintan hitam (*Nigella sativa*), terutama kandungan thymoquinon sebagai penurun glukosa darah puasa tikus yang berdampak pada peningkatan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1.

Model DM 2 dicapai dengan menginduksi tikus dengan fruktosa selama 30 hari. Pemberian produk dengan kandungan *high-fructose diet* dapat mengubah tahapan awal transduksi sinyal insulin yang memiliki peran penting dalam penginduksian resistensi insulin sehingga diharapkan dengan pemberian fruktosa selama 6 minggu pada tikus dapat memberikan kondisi DM 2.³ Kelebihan konsumsi fruktosa dapat mengakibatkan resistensi insulin hepatic, penurunan oksidasi lipid, dan peningkatan trigliserida. Peningkatan trigliserida hepatic (lipid hepatic) dapat menginduksi resistensi insulin hepatic, kemungkinan melalui peningkatan kadar intrahepatik dari *diacylglycerol*, yang mengaktivasi novel-PKC.

Novel-PKC menurunkan tirosin terfosforilasi dari IRS-1, menyebabkan penurunan sensitivitas insulin, peningkatan produksi glukosa hepatic, dan peningkatan glukosa puasa dan konsentrasi insulin, serta gangguan toleransi glukosa.¹⁶

Pada umumnya, diketahui bahwa pemberian ekstrak biji jintan hitam akan menurunkan glukosa darah puasa dan kemudian akan meningkatkan konsentrasi tirosin terfosforilasi sebagai respon untuk meningkatkan sensitivitas insulin. Dari data di atas dapat disimpulkan bahwa biji jintan hitam dosis 96 mg/kgBB memiliki efek meningkatkan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS. Peningkatan konsentrasi tirosin terfosforilasi tertinggi pada tikus 16 (0,716 $\mu\text{g/dL}$) jika dibandingkan dengan kelompok normal yang berkisar 0,197-0,591 $\mu\text{g/dL}$. Namun pada nilai delta glukosa darah puasa tikus memberikan data minus pada tikus 15 dan 16. Data tersebut juga menunjukkan bahwa terdapat perbedaan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 di tiap kelompok dari nilai terendah hingga tertinggi, tetapi tidak signifikan. Penurunan ambilan glukosa dalam darah (hiperglikemi) memiliki hubungan erat dengan penurunan konsentrasi tirosin terfosforilasi

IRS-1 sehingga pada penelitian ini kemungkinan proses ambilan glukosa dalam darah pada tikus masih berlangsung normal.⁵ Proses ambilan glukosa darah pada tikus masih berlangsung normal kemungkinan disebabkan konsentrasi glukosa dalam darah belum mencapai kondisi hiperglikemi yang dipengaruhi oleh induksi fruktosa yang tidak maksimal, pengambilan glukosa darah puasa pada saat yang tidak bersamaan, dan tikus yang bergerak aktif.

Secara umum diketahui bahwa tingkat glukosa darah dipengaruhi oleh tingkat aktivitas, konsumsi makanan yang tidak seimbang, dan tingkat stres. Pada penelitian ini, ketiga hal tersebut memiliki peran penting dalam menentukan tingkat glukosa darah tikus dimana konsumsi makanan yang tidak seimbang diwakili dengan induksi fruktosa yang berlebih pada tikus. Peningkatan konsentrasi glukosa darah puasa tikus terjadi pada kelompok tikus P3, tetapi peningkatan tersebut masih dalam rentang normoglikemik, yaitu 85-132 mg/dL. Penurunan konsentrasi pada glukosa darah puasa tikus setelah perlakuan terjadi pada kelompok tikus P2. Hasil yang tidak merata ini kemungkinan disebabkan pengukuran insulin yang tidak bersamaan sehingga waktu puasa tikus satu dengan yang lain tidak sama yang diperburuk dengan jumlah sisa makanan yang cukup banyak. Ketika waktu puasa diperpanjang, proporsi dari proses glukoneogenesis akan meningkat dan setelah puasa *overnight*, tidak ada simpanan glukosa dan semua glukosa telah dipakai oleh jaringan untuk dioksidasi sempurna atau dikonversi menjadi laktat, yang secara sederhana dapat dinyatakan bahwa glukosa dalam darah akan menurun dengan dilakukannya puasa.¹⁷

Selain itu, aktivitas dari tikus yang cukup tinggi (salah satu penanda tikus sehat) kemungkinan menjadi penyebab penurunan glukosa darah puasa tikus. ADA (*American Diabetes Association*) menyatakan bahwa aktivitas dapat mempengaruhi penurunan glukosa darah melalui peningkatan sensitivitas insulin, sehingga sel dapat menggunakan insulin dengan lebih baik untuk ambilan glukosa selama dan setelah aktivitas untuk menghasilkan energi. Hal lain yang dapat menyebabkan fluktuasi glukosa darah puasa

tikus setelah induksi fruktosa adalah konsumsi makanan yang berbeda pada tiap tikus sehingga fruktosa yang masuk ke dalam tubuh tikus tidak mencapai 16 g seperti yang telah direncanakan semula. Sedangkan tujuan awal dari induksi fruktosa yaitu memberikan efek peningkatan glukosa yang berlebih atau hiperglikemi justru menurunkan sensitivitas insulin.

Sensitivitas insulin yang seharusnya dihambat oleh pemberian fruktosa secara berlebih tidak tercapai karena konsumsi fruktosa per harinya tidak mencapai 16 g sehingga dalam penelitian ini insulin masih bekerja dengan baik dan berdampak pada penurunan glukosa darah puasa setelah pemberian induksi fruktosa selama 6 minggu. Hal ini diperburuk dengan perlakuan pemberian ekstrak biji jintan hitam yang memiliki fungsi salah satunya sebagai terapi antidiabetes melalui mekanisme penurunan glukoneogenesis oleh zat thymoquinon yang terkandung dalam ekstrak biji jintan hitam. Selain itu, zat thymoquinon juga terbukti meningkatkan ambilan glukosa di jaringan perifer.

Fluktuasi data glukosa darah puasa juga dapat disebabkan gangguan yang terjadi pada alat pengukur glukosa darah tikus yang dalam penelitian ini digunakan glukosemeter digital. Beberapa faktor yang mungkin dapat mempengaruhi hasil dari pengukuran glukosa menggunakan *glucometer* pada penelitian ini menurut AADE (*American Association of Diabetes Educators*) tahun 2013, yaitu kualitas strip yang menurun yang berhubungan dengan masa kadaluarsa atau kualitas produksi dari strip tersebut, pengguna alat tidak mencuci tangan terlebih dahulu sebelum menggunakan alat, kadar hematokrit yang dipengaruhi oleh kondisi dehidrasi atau anemia, pengaruh temperatur dan kelembapan, penyimpanan dan perawatan alat yang tidak benar, dan alat yang tidak dikalibrasi dengan baik. Kalibrasi alat dengan larutan kontrol dilakukan sesuai dengan petunjuk yang ada pada alat untuk memastikan keakuratan alat pengukuran.

Secara normal, tubuh akan memberikan respon terhadap peningkatan glukosa darah dengan meningkatkan sekresi insulin. Sekresi insulin ini akan menstimulasi ambilan glukosa dan sintesis glikogen, serta inhibisi

glikogenolisis dan glukoneogenesis, sehingga dicapai kondisi normoglikemi. Pada penelitian ini, induksi fruktosa digunakan untuk meningkatkan glukosa darah tikus untuk mencapai model DM 2, yaitu resistensi insulin dan menggunakan ekstrak biji jintan hitam untuk menghambat proses resistensi insulin tersebut yang ditandai dengan peningkatan tirosin terfosforilasi IRS-1 pada jaringan otot tikus. Induksi fruktosa pada tikus yang tidak mencapai 16 g dan pemberian ekstrak biji jintan hitam serta faktor lainnya seperti telah dijelaskan sebelumnya, membuat kondisi resistensi insulin belum terjadi dan insulin bekerja secara normal pada tubuh tikus. Hal ini mengakibatkan fluktuasi data baik dari data glukosa darah setelah induksi fruktosa maupun data konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak biji jintan hitam secara statistik tidak memiliki efek peningkatan sensitivitas insulin melalui peningkatan konsentrasi tirosin terfosforilasi pada IRS-1 yang berbeda pada tiap perlakuan dengan nilai $p > 0,05$ (0,151). Adanya signifikansi korelasi dan kekuatan yang bervariasi pada tiap kelompok perlakuan. Kedua hasil tersebut kemungkinan disebabkan kegagalan induksi fruktosa untuk mengkondisikan tikus menjadi tikus model DM 2.

SARAN

Hendaknya dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek pemberian biji jintan hitam terhadap konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 dengan induksi DM 2 melalui diet tinggi fruktosa. Metode lain diperlukan untuk mengetahui efektivitas metode meliputi biaya serta waktu yang digunakan untuk menjalankan penelitian. Pemberian diet tinggi fruktosa untuk induksi DM 2 hendaknya dioptimasi meliputi cara pemberian, dosis, dan lama waktu yang diperlukan untuk mencapai kondisi DM 2.

DAFTAR PUSTAKA

1. [WHO] World Health Organization. Diabetes Fact and Sheet. No. 132. 2012. (online). <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>>. diakses tanggal 25 November 2012.
2. Han YK, Jung HW, Park YK. The Roots of *Atractylodes Japonica* Koidzumi Promote Adipogenic Differentiation Via Activation of the Insulin Signaling Pathway In 3T3-L1 Cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012; 12:154.
3. Qin B, Nagasaki M, Ren M, Bajotto G, Oshida Y, Sato Y. Cinnamon Extract Prevents the Insulin Resistance Induced by A High-Fructose Diet. *Horm Metab Res*. 2004; 36:119-125.
4. Ura K, Soyano K, Omoto N, Adachi S, Yamauchi K. Localization of Na⁺/K⁺-ATPase in Tissues of Rabbit and Teleosts Using an Antiserum Directed Against a Partial Sequence of the α -Subunit. *Zool Sci*. 1996; 13:219-227.
5. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI. Free Fatty Acid-Induced Insulin Resistance is Associated with Activation of Protein Kinase C Theta and Alterations in the Insulin Signaling Cascade. *Diabetes*. 1999; 48:1270-1274.
6. Meral I, Yener Z, Kahraman T, Mert N. Effect of *Nigella sativa* on Glucose Concentration, Lipid Peroxidation, Antioxidant Defence System and Liver Damage in Experimentally Induced Diabetic Rabbits. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2001; 48(10):593-599.
7. Al-Awadi FM, Gumaa KA. Studies on the Activity of Individual Plants of An Antidiabetic Plant Mixture. *Acta Diabetol*. 1987; 24(1):7-41.
8. Al-Hader AA, Aqel MB, Hasan ZA. Hypoglycemic Effects of The Volatile Oil of *Nigella sativa* Seeds. *Int J Pharmacogn*. 1993; 31:96-100.
9. Labhal A, Settaf A, Zalagh F, Cherrah Y, Hassar M, Slaoui A. Proprietes Anti-Diabetiques des Graines de *Nigella sativa* Chez le Merione Shawi Obese et Diabetique. *Esperance Medicale*. 1999; 47:72-74.

10. El-Dakhkhny M, Lambert MN, Ammon HP. The Hypoglycemic Effect of *Nigella sativa* Oil is Mediated by Extra Pancreatic Action. *Planta Med.* 2002; 68:465- 466.
11. Fararh KM, Atoji Y, Shimizu Y, Takewaki T. Insulinotropic Properties of *Nigella sativa* Oil in Streptozotocin Plus Nicotinamide Diabetic Hamster. *Res. Vet. Sci.* 2002; 73(3):279-282.
12. Kanter M, Meral I, Yener Z, Ozbek H, Demir H. Partial Regeneration/Proliferation of the Beta-Cells in the Islets of Langerhans by *Nigella sativa* L. in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Tohoku J Exp Med.* 2003; 201:213–219.
13. Rchid H, Chevassus H, Nmila R, Guiral C, Petit P, Chokairi M, Sauvaire Y. *Nigella sativa* Seed Extracts Enhance Glucose-Induced Insulin Release From Rat-Isolated Langerhans Islets. *Fundam Clin Pharmacol.* 2004; 18(5):525-529.
14. Le PM, Benhaddou-Andaloussi A, Elimadi A, Settaf A, Cherrah Y, Haddad PS. The Petroleum Ether Extract of *Nigella sativa* Exerts Lipidlowering and Insulin-Sensitizing Actions in The Rat. *J Ethnopharmacol.* 2004; 94:251–259.
15. El-Tahir KEH, Bakeet DM. The Black Seed *Nigella Sativa* Linn. - A Mine for Multi Cures: A Plea for Urgent Clinical Evaluation of Its Volatile Oil. *J T U Med Sc.* 2006; 1(1):1-19.
16. Stanhope KL, Havel PJ. Fructose Consumption: Recent Results and Their Potential Implications. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1190:15–24.
17. Poretsky L. *Principles of Diabetes Mellitus.* Springer Science+Business Media. 2010.