EFEK EKSTRAK ETANOL KULIT BATANG FALOAK (*Sterculia quadrifida* R.Br) TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH (*in vitro*) DAN AKTIVITAS ENZIM GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS DIABETES

Oleh:

Rambu Konda Anggung Praing
19133873A

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017

EFEK EKSTRAK ETANOL KULIT BATANG FALOAK (*Sterculia quadrifida* R.Br) TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH (*in vitro*) DAN AKTIVITAS ENZIM GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS DIABETES

SKRIPSI
Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai derajat Sarjana Farmasi (S. Farm)
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi

Oleh:

Rambu Konda Anggung Praing
19133873A

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017

PENGESAHAN SKRIPSI
Berjudul :

EFEK EKSTRAK ETANOL KULIT BATANG FALOAK (*Sterculia quadrifida* R.Br) TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH (*in vitro*) DAN AKTIVITAS ENZIM GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS DIABETES

Oleh :

Rambu Konda Anggung Praing
19133873A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 4 April 2017

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi
Dekan,

Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., M.M., M.Sc., Apt

Pembimbing,

Dr. Titik Sunarni, M.Si., Apt

Pembimbing pendamping,

Sunarti, M.Sc., Apt

Penguji :

1. Tri Wijayanti, S.Farm., MPH., Apt. .....
2. Iswandi, S.Si., M.Farm., Apt. .....
3. Dewi Ekowati, S.Si., M.Sc., Apt. .....
4. Dr. Titik Sunarni, M.Si., Apt. .....

PERSEMBAHAN

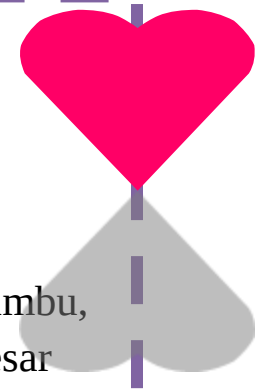
Janganlah takut, sebab Aku menyertai engkau, janganlah bimbang, sebab Aku ini Allahmu : Aku akan meneguhkan, bahkan akan menolong engkau, Aku akan memegang engkau dengan tangan kananKu yang membawa kemenangan (Yesaya 41: 10).

Biggest thanks for :

Tuhan Yesus Kristus

Bapa, Mama, Nene, Opung, Ka eles, Ka umbu, Umbu kecil, Rambu Ita dan keluarga besar Anggung Praing Thank you so much for your love and supports.

I do love you



PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, April 2017

Rambu Konda Anggung Praing

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas rahmat dan karuniaNya shingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **"EFEK EKSTRAK ETANOL KULIT BATANG FALOAK (*Sterculia quadrifida* R.Br) TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH (*in vitro*) DAN AKTIVITAS ENZIM GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS DIABETES"** ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar kesarjanaan pada Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

Dalam penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan, bimbingan, dan dukungan dari berbagai pihak, maka pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr. Ir. Djoni Taringan, MBA., selaku Rektor Universitas Setia Budi Surakarta.
2. Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., M.Sc., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta
3. Dr. Titik Sunarni, M.Sc., Apt selaku Pembimbing Utama yang telah meluangkan waktu beliau untuk membimbing penulis, sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
4. Sunarti, M.Sc., Apt., selaku Pembimbing Pendamping yang dengan sabar membimbing penulis, sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Bapak dan Ibu dosen panitia penguji skripsi yang telah memberi masukan demi kesempurnaan skripsi ini.
6. Terima kasih kepada Pak Yuli dari Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada yang telah banyak membantu.

7. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam menyusun skripsi ini. Kritik dan saran dari siapapun yang bersifatmembangun sangat penulis harapkan. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi siapapun yang mempelajarinya.

Surakarta, 4 April 2017

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL i

HALAMAN PENGESAHAN ii

HALAMAN PERSEMBAHAN iii

HALAMAN PERNYATAAN iv

KATA PENGANTAR v

DAFTAR ISI vii

DAFTAR GAMBAR xiii

DAFTAR TABEL xiv

DAFTAR LAMPIRAN xv

DAFTAR SINGKATAN xvii

INTISARI xviii

ABSTRACT xix

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang 1

B. Rumusan Masalah 3

C. Tujuan Penelitian 4

D. Manfaat Penelitian 4

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Faloak

1. Klasifikasi 5
2. Nama lain 5
3. Deskripsi 5
4. Kandungan kimia dan kegunaan 6

B. Tinjauan Fitokimia

1. Alkaloid 7

2. Saponin 7
3. Flavonoid 8
4. Tanin 8
5. Steroid 9
6. Triterpenoid 9
C. Simplisia
1. Pengertian 10
2. Pengumpulan 10
3. Pencucian dan pengeringan 10
D. Ekstraksi
1. Pengertian 11
2. Ekstrak 11
3. Maserasi 12
4. Pelarut 12
E. Diabetes Mellitus
1. Klasifikasi
1.1. Diabetes mellitus tipe 1 13
1.2. Diabetes mellitus tipe 2 13
1.3. Diabetes gestasional 13
1.4. Diabetes mellitus lain 14
2. Gejala
2.1. Gejala akut diabetes mellitus 14
2.2. Gejala kronik diabetes mellitus 14
3. Diagnosis 14
4. Manifestasi klinik 15
5. Stress oksidatif pada diabetes
5.1. Autooksidasi glukosa 16
5.2. Glikasi protein non enzimatik 16
5.3. Jalur poliol-sorbitol (aldose reduktase) 18
F. Antioksidan
1. Pengertian 19

2. Klasifikasi
2.1. Secara umum 19
2.2. Berdasarkan mekanisme kerjanya 20
3. Mekanisme kerja 21
G. Radikal Bebas
1. Pengertian 21
2. Sumber radikal bebas..... 22
3. Mekanisme pembentukan 22
4. Efek radikal bebas 23
H. Metode Uji Antioksidan *In Vitro*
1. Uji DPPH 23
2. Uji TRAP 24
3. Uji ABTS 24
4. Uji FRAP 25
I. Metode Uji Antioksidan *In Vivo* Terhadap GPx 25
J. Rutin 27
K. Diabetogenik 27
L. Glibenklamid
1. Sifat fisika kimia 28
2. Indikasi dan kontraindikasi 29
3. Dosis dan aturan pakai 29
4. Mekanisme kerja 29
5. Efek samping 29
M. Hewan Uji
1. Sistematika 30
2. Karakteristik utama 30
3. Jenis kelamin 30
N. Landasan Teori 31
O. Hipotesis 33

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel
1. Populasi 34
2. Sampel 34
B. Variabel Penelitian
1. Identifikasi variabel utama 34
2. Klasifikasi variabel utama 34
3. Definisi operasional variabel utama 35
C. Bahan dan Alat
1. Bahan
1.1. Bahan sampel 35
1.2. Bahan uji farmakologi 35
2. Alat 36
3. Hewan uji 36
D. Jalannya Penelitian
1. Determinasi kulit batang faloak 36
2. Pengambilan dan pembuatan serbuk kulit batang faloak 37
3. Penetapan kadar air serbuk kulit batang faloak 37
4. Pembuatan ekstrak etanol kulit batang faloak 37
5. Uji bebas alkohol ekstrak etanol kulit batang faloak 37
6. Identifikasi kandungan kimia ekstrak kulit batang faloak
6.1. Identifikasi flavonoid 38
6.2. Identifikasi tanin 38
6.3. Identifikasi saponin 38
6.4. Identifikasi alkaloid 38
6.5. Identifikasi steroid dan terpenoid 38
7. Uji aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH
7.1. Penyiapan larutan DPPH 80 ppm 39
7.2. Penyiapan larutan ekstrak kulit batang faloak 39
7.3. Penyiapan larutan rutin 39
7.4. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH 39
7.5. Penentuan operating time 39

7.6. Uji aktivitas antioksidan 40
7.7. Analisa data 40
8. Uji aktivitas antioksidan terhadap glutation peroksidase
8.1. Penentuan dosis 40
8.2. Pembatan larutan uji 41
8.3. Penentuan hewan uji 41
8.4. Perlakuan hewan uji 41
8.5. Prosedur uji diabetes aloksan 42
8.6. Pemeriksaan aktivitas antioksidan terhadap GPx 42
E. Analisa Statistik 43
F. Skema Penelitian 44

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN
A. Determinasi Kulit Batang Faloak 45
B. Pembuatan Serbuk Kulit Batang Faloak 45
C. Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Batang Faloak 46
D. Penetapan Kadar Air Serbuk Kulit Batang Faloak 47
E. Indentifikasi Kandungan Kimia Kulit Batang Faloak 48
F. Uji Bebas Alkohol Ekstrak Etanol Kulit Batang Faloak 48
G. Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap Radikal Bebas DPPH
1. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum 49
2. Penetapan *operating time* 49
3. Hasil pengujian aktivitas antioksidan 49
H. Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap GPx 53

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN
A. Kesimpulan 59
B. Saran 59

DAFTAR PUSTAKA 60
LAMPIRAN 68

DAFTAR GAMBAR

Halaman

1. Pohon faloak 6
2. Struktur kimia alkaloid 7
3. Struktur kimia flavonoid 8
4. Struktur kimia steroid 9
5. Struktur kimia triterpenoid 9
6. Struktur kimia DPPH 23
7. Reaksi antara DPPH dengan H• yang berasal dari senyawa peredam radikal bebas 24
8. Struktur GPx 25
9. Struktur kimia rutin 27
10. Struktur kimia aloksan 28
11. Struktur kimia glibenklamid 29
12. Konsentrasi larutan uji terhadap nilai rata-rata % inhibisi 50
13. Aktivitas antioksidan larutan uji berdasarkan nilai IC_{50} 52
14. Kadar GPx (U/mg) seluruh kelompok uji 54

DAFTAR TABEL

Halaman

1. Tingkat kekuatan antioksidan 21
2. Rendemen pengeringan kulit batang faloak 46
3. Karakteristik ekstrak etanol kulit batang faloak 46
4. Rendemen ekstrak kulit batang faloak 47
5. Penetapan kadar air serbuk kulit batng faloak 47
6. Identifikasi reaksi kimia ekstrak kulit batang faloak 48
7. Hasil uji bebas alkohol pada ekstrak kulit batang faloak 49
8. Konsentrasi larutan uji terhadap nilai rata-rata % inhibisi 50
9. Analisa perbedaan signifikasi kelompok variasi dosis ekstrak terhadap kelompok kontrol 54

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

1. Foto tanaman faloak 68

2. Surat determinasi kulit batang faloak 69

3. Ethical clearance 70

4. Perhitungan rendemen pengeringan kulit batang falaok 71

5. Perhitungan rendemen ekstrak etanol kulit batang faloak 72

6. Penetapan kadar air serbuk kulit batang faloak 73

7. Foto kegiatan penelitian 74

8. Identifikasi kandungan senyawa secara kualitatif 76

9. Radikal bebas DPPH 77

10. Rutin 78

11. Ekstrak etanol kulit batang faloak 79

12. Penetapan panjang gelombang maksimum DPPH 80

13. Penetapan *operating time* 81

14. Perhitungan IC_{50} rutin 82

15. Perhitungan IC_{50} ekstrak etanol kulit batang faloak 84

16. Hasil uji statistik *Independent sampels t-test* rata-rata nilai IC_{50} rutin dan ekstrak 86

17. Foto alat, bahan, dan hasil uji aktivitas antioksidan secara *in vitro* 87

18. Perhitungan dosis 89

19. Hasil pengukuran aktivitas enzim GPx hati tikus 91

20. Hasil uji statistik menggunakan *Kolmogorov-Smirnov test* dan *Mann-Whitney test* terhadap aktivitas enzim GPx 92

21. Foto alat, bahan dan kegiatan uji aktivitas enzim GPx hati tikus 99

DAFTAR SINGKATAN

ANOVA	*Analysis of variances*
CMC	*Carboxymethylcellulose*
DPPH	*Diphenylpicrylhydrazyl*
EDTA	*Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*
GPX	Glutation Peroksidase
GR	Glutation Reduktase
GSH	Glutation tereduksi
GSGG	Glutation teroksidasi
H_2O	Hidrogen; air
H_2O_2	Hidrogen peroksida
IC_{50}	*Inhibitory Concentration* 50
NADPH	*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen*
SOD	Superoksida Dismutase
UV-Vis	*Ultra Violet Visible*

INTISARI

PRAING, RKA., 2017, EFEK EKSTRAK ETANOL KULIT BATANG FALOAK (*Sterculia quadrifida* R.Br) TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH (*in vitro*) DAN AKTIVITAS ENZIM GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS DIABETES, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br.) merupakan bagian dari pohon faloak yang memiliki aktivitas antioksidan dan antidiabetes. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol kulit batang faloak secara *in vitro* dan *in vivo*.

Ekstrak etanol kulit batang faloak diuji aktivitas antioksidannya secara *in vitro* dengan metode penangkapan radikal bebas DPPH dengan parameter IC_{50} dan digunakan *rutin* sebagai pembanding. Uji aktivitas antioksidan secara *in vivo* pada penelitian ini menggunakan metode peningkatan aktivitas enzim glutation peroksidase pada jaringan hepar tikus diabetes yang telah diinduksi aloksan, data yang diperoleh dianalisis statistik menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan dilanjutkan uji *Mann-Whitney*.

Hasil uji aktivitas antioksidan secara *in vitro* menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit batang faloak memiliki nilai IC_{50} sebesar 4,86 ppm, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit batang faloak termasuk antioksidan kuat. Uji aktivitas antioksidan secara *in vivo* pada tikus diabetes menunjukkan aktivitas enzim glutation peroksidase pada dosis efektif 260 mg/Kg BB tikus terjadi peningkatan aktivitas enzim glutation peroksidase sebesar 56,10 U/mg dan memiliki beda signifikan dengan kelompok kontrol diabetes.

Kata kunci : kulit batang faloak, DPPH, glutation peroksidase, antioksidan.

ABSTRACT

PRAING, RKA., 2017, THE EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACT OF FALOAK BARK (*Sterculia quadrifida* R.Br) AGAINST FREE RADICAL DPPH (*in vitro*) AND ACTIVITY OF GLUTATHIONE PEROXIDASE ENZYME IN DIABETIC MICE, ESSAY, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Faloak bark (*Sterculia quadrifida* R.Br) is the part of faloak tree which has antioxidant and antidiabetic activity. The purpose of this study is to know the antioxidant effect of faloak bark by *in vitro* and *in vivo* method.

Ethanolic extract of faloak bark is tested to the antioxidant activity by bind the free radical DPPH method (*in vitro*) with IC_{50} parameter and using rutin as standard to compare with the extract. Antioxidant activity test (*in vivo*) in this study using increased activity of glutathion peroxidase enzyme in the tissue of mice's liver which has inducted by aloxan, and then analyze the datas using Kolmogorov-Smirnov test and continued by Mann-Whitney test.

The result of this study showed that the ethanolic extract of the faloak bark has antioxidant activity. Antioxidant activity of ethanolic extract of faloak bark by *in vitro* test has IC_{50} value 4,86 ppm, this indicated that the ethanolic extract of faloak bark include of a strong antioxidant. The result of *in vivo* test showed that glutathion peroxidase enzyme with the effective dose 260 mg/Kg weight of mice and the value of increase level of glutathion peroxidase enzyme is 56,10 U/mg and there is significant difference compared with the diabetic control group.

Key words : faloak bark, DPPH, gutathion peroxidase, antioxidant.

BAB I
PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Diabetes mellitus (DM) sebagai salah satu penyakit yang berhubungan dengan radikal bebas merupakan penyakit gangguan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia yang berhubungan dengan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein yang disebabkan oleh penurunan sekresi insulin atau penurunan sensitivitas insulin, atau keduanya dan menyebabkan komplikasi kronis mikrovaskular, makrovaskular, dan neuropati (Sukandar *et al.* 2008). Peningkatan kadar gula darah (hiperglikemia) pada DM menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein, dan aktivasi jalur metabolisme poliol yang selanjutnya mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif (Ueno *et al.* 2002).

Pembentukan senyawa oksigen reaktif tersebut dapat meningkatkan modifikasi lipid, DNA, dan protein pada berbagai jaringan. Modifikasi molekuler pada berbagai jaringan tersebut mengakibatkan ketidakseimbangan antara antioksidan protektif (pertahanan antioksidan) dan peningkatan produksi radikal bebas, hal ini merupakan awal kerusakan oksidatif yang dikenal sebagai stress oksidatif. Lebih lanjut, stress oksidatif juga memiliki kontribusi pada perburukan dan perkembangan kejadian komplikasi (Setiawan dan Suhartono 2005).

Adanya stress oksidatif pada diabetes dikaitkan dengan terjadinya komplikasi pada penyakit diabetes, khususnya karena pembentukan radikal bebas superoksida (Oberley 1998). Luasnya komplikasi pada diabetes tampak berkorelasi dengan konsentrasi glukosa darah sehingga glukosa berlebih diduga menjadi penyebab utama kerusakan jaringan (Rahbani-Nobar *et al*. 1999). Sumber stress oksidasi pada DM diantaranya perpindahan keseimbangan reaksi redoks karena perubahan metabolisme karbohidrat dan lipid yang akan meningkatkan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dari reaksi glikasi dan oksidasi lipid sehingga menurunkan sistem pertahanan antioksidan di antaranya glutation tereduksi (GSH) (Halliwel dan Gutteridge 1999).

Senyawa antioksidan sintetik maupun alami (dari berbagai tanaman) mampu mengontrol kadar glukosa darah dan mencegah komplikasi diabetes, dilihat dari adanya aktivitas antioksidan dan hipoglikemik dari senyawa aktif golongan polifenol pada tanaman (Widiowati 2008). Polifenol mempunyai kemampuan untuk menghambat reaksi oksidasi dan menangkap radikal bebas. Selain itu, polifenol juga mempunyai aktivitas sebagai antioksidan dan antiradikal (Burda dan Oleszek 2001).

Berdasarkan penelitian, senyawa-senyawa yang mempunyai potensi sebagai antioksidan umumnya merupakan senyawa flavonoid, fenol dan alkaloid. Senyawa flavonoid dan polifenol bersifat antioksidan, antidiabetes, antikanker, antiseptik dan antiinflamasi, sedangkan alkaloid mempunyai sifat antineoplastik yang juga ampuh menghambat pertumbuhan sel-sel kanker (Atta *et al*. 2001).

Salah satu tanaman yang memiliki potensi sebagai antioksidan alami untuk pengobatan penyakit degeneratif, salah satunya DM adalah faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br). Faloak merupakan tanaman yang tumbuh di Nusa Tenggara Timur (NTT). Pemanfaatan faloak oleh masyarakat NTT sampai saat ini masih bersifat pemanfaatan secara tradisional yang didasarkan pengetahuan dan pengalaman secara turun temurun (Ranta 2011). Bagian pohon faloak yang sering digunakan adalah kulit batang (klika). Oleh masyarakat NTT, klika faloak dipercaya dapat menyembuhkan berbagai penyakit seperti hepatitis, diabetes dan gangguan pencernaan.

Kulit batang faloak mengandung senyawa antioksidan alami yaitu flavonoid dan senyawa fenolik yang mampu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas (Siswadi *et al*. 2013). Penelitian yang telah dilakukan oleh Anin (2014) pada ekstrak etanol kulit batang faloak menggunakan metode DPPH mempunyai aktivitas antioksidan kuat dengan nilai IC_{50} 4,8101 ppm yang dibandingkan dengan vitamin C sebagai kontrol positif. Flavonoid sebagai salah satu kelompok senyawa fenolik yang banyak terdapat pada jaringan tanaman dapat berperan sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan flavonoid bersumber pada kemampuan mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya

mengkelat logam (Redha 2010). Selain itu, flavonoid dapat memperbaiki sensitivitas reseptor insulin (Song *et al.* 2005).

Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo*. Pengujian secara *in vitro* dapat menggunakan metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*). Metode ini sederhana dan mudah dikerjakan. Metode DPPH memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. Pengujian antioksidan secara *in vivo* dapat dilakukan dengan melihat status antioksidan endogen, salah satunya terhadap enzim glutation peroksidase pada jaringan hepar tikus diabetes yang diinduksi oleh aloksan. Glutation peroksidase sebagai enzim peredam *(quenching)* radikal bebas merupakan enzim yang berperan penting dalam melindungi organisme dari kerusakan oksidatif (Sen *et al*. 2010).

Kulit batang faloak digunakan oleh masyarakat NTT sebagai obat tradisional untuk antidiabetes masih kurang informasi ilmiahnya, maka pada penelitian ini perlu dilakukan pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit batang faloak terhadap radikal bebas DPPH dan enzim glutation peroksidase pada tikus diabetes.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang dikemukakan di atas dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

Pertama, apakah ekstrak etanol kulit batang faloak memiliki aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH ?

Kedua, apakah dari ekstrak etanol kulit batang faloak mampu meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase pada tikus yang diinduksi aloksan ?

Ketiga, berapakah dosis ekstrak etanol kulit batang faloak yang paling kuat dalam meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase ?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

Pertama, mengetahui aktivitas ekstrak etanol kulit batang faloak sebagai antioksidan terhadap radikal bebas DPPH.

Kedua, mengetahui aktivitas ekstrak etanol kulit batang faloak mampu meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase pada tikus yang diinduksi aloksan.

Ketiga, mengetahui dosis ekstrak etanol kulit batang faloak yang paling kuat dalam meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase.

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi atau pengetahuan bagi masyarakat umum, mengenai khasiat dari ekstrak etanol kulit batang faloak sebagai salah satu obat alternatif untuk penderita penyakit diabetes mellitus. Menambah referensi serta bahan acuan untuk penelitian lebih lanjut mengenai ekstrak etanol kulit batang faloak sebagai antidiabetes.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Faloak

1. Klasifikasi

Dalam sistem klasifikasi tumbuhan, tanaman faloak diklasifikasikan sebagai berikut (Siswadi *et al*. 2013) :

Kingdom : Plantae
Divisi : Angiospermae
Ordo : Malvales
Famili : Malvaceae
Genus : Sterculia
Spesies : *Sterculia quadrifida* R.Br

2. Nama lain

Faloak memiliki nama asing yaitu Red-fruit Kurrajong dan sinonim yaitu *Sterculia quadrifida* R.Br. Sedangkan di Timor Leste tanaman faloak dikenal dengan nama ‘Komila’ (Siswadi *et al*. 2013).

3. Deskripsi

Faloak merupakan tanaman obat yang termasuk dalam famili Malvaceae. Pohon faloak tumbuh di daerah dengan iklim tropis pada ketinggian 0-900 meter di atas permukaan laut. Pohon faloak tumbuh tersebar di Australia (Australia Barat, Queendsland, New South Wales) dan Papua Nugini. Namun pohon faloak banyak ditemukan di pulau Timor, Nusa Tenggara Timur (NTT) (Siswadi *et al*. 2013).

Tanaman faloak terdiri dari akar, batang, daun, bunga, buah dan biji. Pohon faloak dapat tumbuh mencapai tinggi lebih dari 15 meter. Tanaman ini memiliki kulit batang berwana abu-abu terang dan mengeluarkan getah transparan ketika disayat. Tanaman faloak berbunga pada bulan april hingga juni dan berbuah pada bulan juni hingga oktober setiap tahun. Pangkal daun tumpul dengan ujung daun yang meruncing. Buah berwarna kuning, jingga hingga merah dengan permukaan luar ditutupi bulu-bulu halus rapat yang ketika matang akan

terbuka, berisi 4-8 biji berwarna hitam mengkilap. Biji berbentuk elips dengan ukuran kira-kira 10 mm, dapat dimakan dan memiliki rasa seperti kacang. Di pulau Timor, faloak dapat ditemukan di semua daerah, disamping itu, berdasarkan survei vegetasi tercatat bahwa faloak dapat pula ditemukan di pulau Sumba dan daerah Ngada, pulau Flores (Russell-Smith *et al*. 2007).

Gambar 1. Pohon faloak

4. Kandungan kimia dan kegunaan

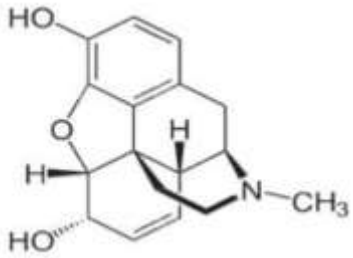
Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Siswadi *et al* (2013), ditemukan bahwa kulit pohon faloak mengandung senyawa fenolik, flavonoid, alkaloid dan terpenoid. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Ranta *et al* (2011) berhasil mengisolasi senyawa *3-hydroxyoctadecanoic acid* yang memiliki aktivitas sebagai antifungi terhadap jamur *Candida albicans*.

Bagian dari faloak yang digunakan sebagai obat herbal oleh masyarakat khususnya di pulau Timor yaitu bagian kulit batang (klika). Kulit batang faloak dipercaya dapat mengobati beberapa penyakit seperti hepatitis, kanker, gangguan saluran pencernaan, diabetes, reumatik, dan sebagai penguat sel darah merah. Umumnya, masyarakat tradisional mengkonsumsi kulit batang faloak dengan cara direbus, baik tanpa tambahan bahan lain atau dengan tambahan misalnya rempah-rempah seperti kunyit maupun kencur (Siswadi *et al*. 2013).

B. Tinjauan Fitokimia

1. Alkaloid

Alkaloid merupakan suatu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam. Hampir seluruh alkaloid berasal dari berbagai jenis tumbuhan. Semua alkaloid mengandung atom nitrogen yang bersifat basa dan merupakan bagian dari cincin heterosiklik (Ahmad 1986) dalam ikatan primer, sekunder, atau kuartener, dan bersifat basa, serta pada umumnya berasa pahit dan mempunyai aksi farmakologi tertentu (Robinson 1995). Alkaloid merupakan zat golongan tumbuhan sekunder yang terbesar. Alkaloid mempunyai kegiatan fisiologi yang menonjol dan sering digunakan secara luas dalam bidang pengobatan (Harborne 1987). Alkaloid terbukti mempunyai kemampuan regenerasi sel β pankreas yang rusak (Arjadi dan Susatyo 2010).



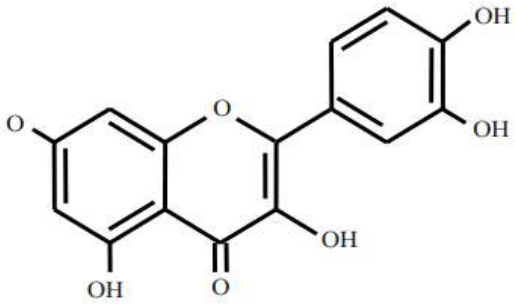
Gambar 2. Struktur kimia alkaloid

2. Saponin

Saponin merupakan glikosida yang aglikonnya berupa sapogenin, tersebar luas di tanaman tinggi. Saponin dapat dideteksi dengan pembentukan larutan koloidal dengan air yang apabila digojog menimbulkan buih yang stabil (Gunawan dan Mulyani 2007). Saponin larut dalam air dan etanol tetapi tidak larut dalam eter (Robinson 1995). Soponin mempunyai bagian utama berupa turunan triterpen dengan sedikit steroid. Residu gula dihubungkan oleh gugus OH biasanya C_3-OH dari aglikon (*monodesmoside saponin*) dan jarang dengan 2 gugus OH atau satu gugus OH dan satu gugus karboksil (Mustarichie *et al*. 2011). Saponin (triterpenoid, steroidal glikosides) mempunyai aktivitas menstimulasi pelepasan insulin dan memblok pembentukan glukosa dalam aliran darah (Bhushan *et al*. 2010).

3. Flavonoid

Flavonoid merupakan bagian dari senyawa fenolik, golongan ini memberikan warna pada buah dan bunga. Flavonoid adalah senyawa fenolik yang terhidroksilasi dan merupakan senyawa C_6-C_3-C_6 dimana C_6 diganti dengan cincin benzene dan C_3 adalah rantai alifatik yang terdiri dari cincin piran. Ada 7 tipe flavonoid yaitu flavon, flavanon, flavonon, flavanol, khalkon, antosianin, dan isoflavon (Mustarichie *et al*. 2011). Flavonoid tersebut dapat bersifat sebagai antidiabetes karena flavonoid mampu berperan sebagai senyawa yang menekan kadar glukosa dan meningkatkan aktivitas glukokinase hepatik dengan meningkatkan pelepasan insulin dari pankreas (Bhushan *et al*. 2010).



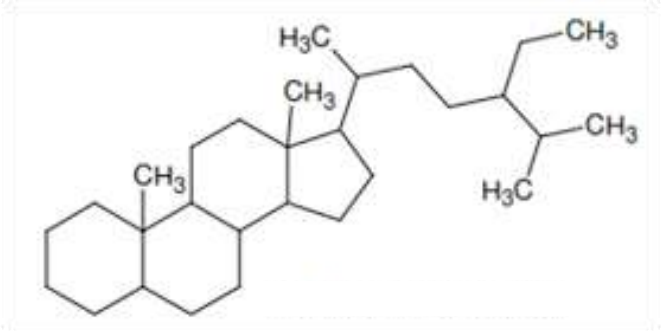
Gambar 3. Struktur kimia flavonoid

4. Tanin

Tanin adalah senyawa polifenol yang memiliki berat molekul cukup tinggi (>1000) dan dapat membentuk kompleks dengan protein. Tanin terdapat luas dalam tumbuhan pembuluh. Tanin adalah golongan bahan yang memberikan rasa kesat dan pahit. Sifat utama tanin adalah mampu berikatan dengan protein (Heinrich 2009). Tanin memiliki aktivitas dalam menurunkan kadar glukosa darah yaitu dengan meningkatkan glikogenesis. Selain itu, tanin juga berfungsi sebagai adstringen atau pengkelat yang dapat mengkerutkan membran epitel usus halus sehingga mengurangi penyerapan sari makanan dan menghambat asupan gula sehingga laju peningkatan gula darah tidak terlalu tinggi (Meidiana dan Widjanarko 2014).

5. Steroid

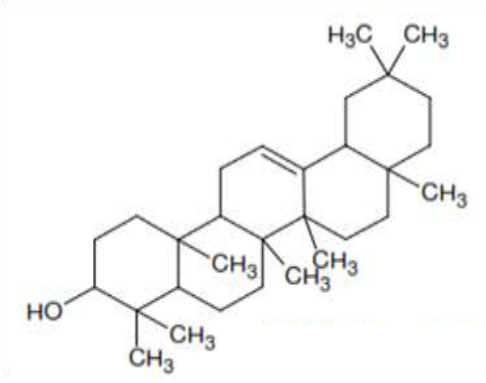
Steroid adalah suatu golongan senyawa triterpenoid yang mengandung inti siklopentana perhidrofenantren yaitu dari tiga cincin sikloheksana dan sebuah cincin siklopentana. Dahulu sering digunakan sebagai hormon kelamin, asam empedu dan lain-lain. Tetapi pada tahun-tahun terakhir ini makin banyak senyawa steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan. Tiga senyawa yang biasa disebut fitosterol terdapat pada hampir setiap tumbuhan tinggi yaitu : sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol (Harborne 1987; Robinson 1995).



Gambar 4. Struktur kimia steroid

6. Triterpenoid

Triterpenoid merupakan senyawa yang diturunkan dari skualena dengan kerangka karbon berasal dari enam satuan isoprena. Paling sedikit ada empat golongan senyawa yang termasuk triterpenoid yaitu triterpen, steroid, saponin, dan glikosida jantung (Harborne 1987). Senyawa ini merupakan komponen aktif dalam tumbuhan obat yang telah digunakan untuk penyakit diabetes (Robinson 1995).



Gambar 5. Struktur kimia triterpenoid

C. Simplisia

1. Pengertian

Simplisia adalah bahan alami yang digunakan sebagai bahan obat dan belum mengalami perubahan proses apapun, kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan.

Simplisia terdiri atas tiga golongan yaitu simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan atau mineral. Simplisia nabati adalah simplisia yang dapat berupa tanaman utuh, bagian tanaman, eksudat tanaman, atau gabungan dari ketiganya. Simplisia hewani adalah simplisia berupa hewan utuh atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa bahan kimia murni. Simplisia pelikan atau mineral adalah simplisia berupa bahan pelikan atau mineral yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan tidak berupa bahan kimia murni (Gunawan dan Mulyani 2004).

2. Pengumpulan

Bagian simplisia yang diambil dari tanaman, misalnya daun, bunga, buah, akar atau rimpang karena zat berkhasiat tidak terdapat pada seluruh bagian dari tanaman. Kadangkala ada bagian dari tanaman justru beracun dan tidak dikehendaki. Bila yang dikumpulkan daun sebaiknya tidak tercampur dengan bagian lain dari tanaman seperti biji, bunga, atau tangkai. Pengumpulan simplisia juga perlu memperhatikan kondisi khusus, misalnya pemanenan daun yang dilakukan sewaktu daun masih muda atau ketika masih tunas (Dalimartha 2008).

3. Pencucian dan pengeringan

Pencucian simplisia bertujuan untuk melepaskan kotoran (tanah, debu, dan kotoran lainnya) yang melekat pada tanaman obat sehingga mikroba atau kotoran yang dapat merusak dan mengubah komposisi zat pada tanaman dapat dihilangkan. Proses pencucian dilakukan dengan cara mengalirkan air bersih pada simplisia sehingga kotoran dapat terlarut dan terbuang. Kualitas air yang digunakan untuk membersihkan simplisia harus air bersih yang tidak mengandung mikroba atau logam, air yang digunakan disarankan dengan air tanah yang bersih (Dalimartha 2008).

Pengeringan simplisia bertujuan mengurangi kadar air simplisia, sehingga simplisia tidak mudah rusak, berjamur, atau kandungan bahan aktif berubah jika disimpan dalam waktu cukup lama. Sebelum proses pengeringan, simplisia seperti rimpang, batang, atau kulit kayu dipotong kecil-kecil untuk mempercepat proses pengeringan. Pengeringan dilakukan secara alami, dilakukan dengan menjemur di bawah sinar matahari langsung. Simplisia ini dihamparkan merata setipis mungkin dengan alas tikar atau plastik dengan sambil sering dibalik agar keringnya merata (Dalimartha 2008).

D. Ekstraksi

1. Pengertian

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan zat yang dapat larut dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang disari mengandung zat aktif yang dapat larut dan zat yang tidak larut seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-lain (Depkes 1986).

Pemilihan penyari harus mempertimbangkan banyak faktor. Cairan penyari yang baik harus memenuhi kriteria-kriteria : murah, stabil secara fisika dan kimia, netral dan tidak mudah terbakar, selektif, tidak mempengaruhi zat berkhasiat (Anonim 1993).

2. Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI 1995).

Menurut Farmakope Indonesia edisi III, ekstrak terdiri dari tiga macam yaitu ekstrak cair, ekstrak kental dan ekstrak kering. Ekstrak cair adalah ekstrak yang diperoleh dari hasil penyarian bahan alam masih mengandung larutan penyari. Ekstrak kental adalah ekstrak yang telah mengalami proses penguapan, dan tidak mengandung cairan penyari lagi, tetapi konsistensinya tetap cair pada suhu kamar. Ekstrak kering adalah ekstrak yang telah mengalami proses

penguapan dan tidak mengandung pelarut lagi dan mempunyai konsistensi padat (berwujud kering).

3. Maserasi

Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Kerugian utama dari metode maserasi ini adalah memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa akan sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun di sisi lain, metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Mukhriani 2014).

4. Pelarut

Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah yang maksimum dari zat aktif dan seminimum mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan. Pelarut yang biasa digunakan adalah air, eter, etanol atau campuran etanol dan air. Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 70%. Keuntungan penggunaan etanol 70% adalah tidak beracun dan tidak berbahaya. Robinson (2005) menyatakan suatu senyawa fenol dengan gugus hidroksil yang memiliki sifat polar dapat diekstraksi menggunakan pelarut polar yaitu etanol 70%.

E. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus adalah suatu kelompok penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin maupun kedua-duanya. Gejala yang timbul disebabkan oleh adanya peningkatan kadar glukosa darah akibat penurunan sekresi insulin (Soegondo 2013).

1. Klasifikasi

Jenis diabetes mellitus menurut organisasi kesehatan dunia (WHO) yaitu :

1.1 Diabetes mellitus tipe 1. Diabetes mellitus tipe 1 (Diabetes Mellitus yang tergantung insulin [*Insulin Dependent Diabetes Mellitus*/ IDDM]) merupakan 5-10 persen dari semua kasus diabetes mellitus, biasanya ditemukan pada anak atau orang dewasa dan tidak ada pembentukan insulin sehingga penderita memerlukan suntikan insulin setiap hari. Pada diabetes mellitus tipe 1 terjadi pada sel β Langerhans sehingga mengakibatkan produksi insulin berhenti atau sedikit sekali (Nugroho 2012).

1.2 Diabetes mellitus tipe 2. Diabetes mellitus tipe 2 yaitu adanya resistensi insulin atau gangguan sekresi insulin. Pada tipe 2 ini tidak selalu dibutuhkan insulin, kadang-kadang cukup dengan diet dan antidiabetik oral. Karenanya tipe ini sering disebut dengan *noninsulin dependent diabetes mellitus* atau NIDDM (Robbins *et al.* 2007). Disebabkan oleh dua hal yaitu respon jaringan terhadap insulin atau sering disebut dengan resistensi insulin dan penurunan produksi insulin akibat regulasi sekresinya terganggu atau terjadi kerusakan fungsional pada sel β Langerhans. Sebagian besar penderita diabetes mellitus tipe 2 disebabkan karena kegemukan karena kelebihan makanan (Nugroho 2012).

Patogenesis diabetes mellitus tipe 2 lebih sedikit diketahui, meskipun tipe ini sering ditemukan. Pada diabetes tipe ini dapat terjadi akibat efek genetik dan juga dipengaruhi oleh lingkungan. Dua efek metabolisme yang menandai diabetes mellitus tipe 2 adalah gangguan sekresi insulin pada sel β dan ketidakmampuan jaringan perifer merespon insulin (Robbins *et al*. 2007).

1.3 Diabetes mellitus gestasional. Diabetes mellitus yang terjadi pada kehamilan toleransi terhadap glukosa secara normal berfluktuasi selama kehamilan. Sebagian besar perempuan dengan diabetes mellitus gestasional memperlihatkan pemulihan kadar glukosa normal setelah persalinan (Sacher dan Mc Pherson 2004).

1.4 Diabetes mellitus lain. Diabetes mellitus tipe lain merupakan diabetes mellitus yang timbul akibat penyakit lain yang mangakibatkan gula darah meningkat misalnya infeksi berat, pemakaian obat kortikosteroid dan lain-lain. Dalam klasifikasi diabetes mellitus ini individu mengalami hiperglikemia akibat kelainan spesifik seperti kelainan genetik fungsi sel β dan endokrinopati (Nabyl 2012).

2. Gejala

Gejala Diabetes Mellitus dapat digolongkan menjadi gejala akut dan gejala kronik (Parkeni 2011).

2.1 Gejala akut diabetes mellitus. Permulaan gejala yang ditunjukkan oleh penderita DM meliputi serba banyak (poli) yaitu banyak makan (poliphagi), banyak minum (polidipsi) dan banyak kencing (poliuri). Gejala utama penderita diabetes yaitu poliuri (peningkatan pengeluaran urin) karena air mengikuti glukosa yang keluar melalui urin (Corwin 2009). Keadaan tersebut jika tidak segera diobati maka akan timbul gejala banyak minum, banyak kencing, nafsu makan mulai berkurang atau berat badan turun dengan cepat (turun 5-10 kg dalam 2-4 minggu), mudah lelah dan apabila tidak lekas diobati akan timbul rasa mual, bahkan penderita akan jatuh koma yang disebut dengan koma diabetic (Parkeni 2011).

2.2 Gejala kronik diabetes mellitus. Gejala kronik yang sering dialami oleh penderita DM adalah kesemutan, kulit terasa panas, atau seperti tertusuk-tusuk jarum, rasa tebal di kulit, kram, capai, mudah mengantuk, mata kabur, biasanya sering ganti kacamata, gatal sekitar kemaluan terutama wanita, gigi mudah goyah dan mudah lepas, kemampuan seksual menurun, bahkan impotensi dan para ibu hamil sering mengalami keguguran atau kematian janin dalam kandungan, atau dengan bayi berat lahir lebih dari 4 kg (Soegondo 2013).

3. Diagnosis

Diagnosa DM harus didasarkan atas pemeriksaan kadar gula darah. Uji diagnostik DM dilakukan pada mereka yang menunjukkan gejala DM. Kepastian diagnostik diabetes mellitus umumnya berdasarkan adanya gejala dan keluhan serta hasil pemeriksaan glukosa darah sewaktu ≥ 200 mg/dl (dalam plasma) dan

kadar gula darah puasa ≥ 126 mg/dl dan ≥110 mg/dl (darah kapiler) (Sudoyo *et al.* 2006).

Pemeriksaan yang dapat dilakukan untuk mendiagnosis diabetes mellitus antara lain adalah pemeriksaan urin untuk mendeteksi adanya glukouria. Pemeriksaan darah yang meliputi glukosa darah puasa, glukosa darah sewaktu, tes toleransi glukosa oral (TTGO), glukosa darah kapiler dan tes glikohemoglobin (HbA1c) (Porth dan matfin 2009).

4. Manifestasi klinik

Penderita diabetes mellitus tipe 1 biasanya memiliki tubuh yang kurus dan cenderung berkembang menjadi diabetes ketoasidosis karena insulin sangat kurang disertai peningkatan hormon glukagon. Sejumlah 20-40% pasien mengalami diabetes ketodiasis setelah beberapa hari mengalami poliuria (pengeluaran urin secara berlebihan), polidipsi (minum air secara berlebihan), poliphagi (makan secara berlebihan) dan kehilangan berat badan (Sukandar *et al.* 2008).

Pasien dengan diabetes mellitus tipe 2 sering asimptomatik. Munculnya komplikasi dapat mengindikasikan bahwa pasien telah menderita diabetes mellitus selama bertahun-tahun, umumnya muncul neuropati dan terdeteksi letargi, poliuri, nokturia dan polidipsi sedangkan penurunan bobot badan secara signifikan jarang terjadi (Sukandar *et al.* 2008).

5. Stress oksidatif pada diabetes

Pada DM pertahanan antioksidan dan system perbaikan seluler akan terangsang sebagai respon tantangan oksidatif (Nuttal *et al.* 1999). Sumber stress oksidatif yang terjadi berasal dari peningkatan produksi radikal bebas akibat autooksidasi glukosa, penurunan konsentrasi antioksidan berat molekul rendah di jaringan, dan gangguan aktivitas pertahanan antioksidan enzimatik (Kowluru 2001). Kemaknaan stress oksidatif pada patologi penyakit sering tidak tentu (Halliwel dan Gutteridge 1999). Dengan demikian stress oksidatif dan gangguan pertahanan antioksidan merupakan keistimewaan DM yang terjadi sejak awal penyakit. Di samping itu, stress oksidatif juga memiliki kontribusi pada perburukan dan perkembangan kejadian komplikasi. Beberapa studi

mengungkapkan penurunan status antioksidan dalam plasma dan serum sampel dibandingkan kontrol berdasarkan usia. Fenomena ini dapat terjadi sejak anak-anak serta berjalan secara progresif dan memburuk sesuai perjalanan waktu dan berkembangnya komplikasi (Nuttal *et al.* 1999).

Diabetes pada anak ditemukan penurunan glutation eritrosit, glutation total, α-tokoferol plasma, dan β-karoten plasma secara bermakna. Penurunan berbagai antioksidan tersebut terkait dengan pembentukan senyawa penanda adanya stress oksidatif, misalnya peningkatan lipid hidroperoksida, diena terkonjugasi, dan protein karbonil secara bermakna (Haffner 1999). Pada diabetes usia 50-60 tahun ditemukan peningkatan peroksidasi lipid sejak onset diabetes.

DM merupakan salah satu kelainan metabolik yang dapat menimbulkan komplikasi vascular dan nonvascular. Salah satu hipotesis penyebab munculnya berbagai komplikasi tersebut adalah stress oksidatif. Pada diabetes terdapat tiga jalur munculnya stress oksidatif, yaitu autooksidasi glukosa, glikasi protein nonenzimatik, dan jalur poliol sorbitol (aldose reduktase).

5.1 Autooksidasi glukosa. Proses autooksidasi glukosa dikatalisis oleh senyawa logam dalam jumlah kecil seperti besi dan seng. Hasil katalisis tersebut adalah senyawa oksigen reaktif. Autooksidasi glukosa terjadi pada fase I proses glikasi nonenzimatik pada protein yang secara alamiah masih bersifat reversibel. Fase ini merupakan sumber hidrogen peroksida yang mampu menghambat CuZn SOD, selain hidrogen peroksida, radikal superoksida juga dihasilkan oleh proses autooksidasi glukosa tersebut serta terkait dengan pembentukan protein glikasi dalam plasma penderita diabetes. Akibat yang ditimbulkan berupa peningkatan aktivitas radikal superoksida serta kerusakan enzim superoksida dismutase (Soesilowati 2003; Droge 2002).

5.2 Glikasi protein nonenzimatik. Keadaan hiperglikemia menyebabkan produksi berbagai pereduksi antara lain glukosa, glukosa-6-fosfat, dan fruktosa akan meningkat melalui proses glikolisis dan jalur poliol. Glukosa sebagai gula pereduksi dapat menjadi agen yang bersifat toksik. Sifat toksik tersebut disebabkan oleh kemampuan kimiawi gugus karbonil aldehid yang dimilikinya. Meskipun sebagian besar keberadaan gula pereduksi dalam larutan sebagai

struktur cincin nonaldehid, glukosa dalam bentuk rantai lurusnya merupakan aldehid (Rahbani-Nobar *et al*. 1999). Aldehid merupakan senyawa yang mampu berikatan secara kovalen sehingga terjadi modifikasi protein. Modifikasi protein dapat dibangkitkan dalam tubuh melalui berbagai mekanisme enzimatik dan nonenzimatik (Anderson *et al.* 1999).

Selain glukosa, semua jenis gula pereduksi juga mampu menyebabkan reaksi glikasi pada bermacam protein, target kerusakan lain adalah lipid-amino seperti *fosfatidiletanolamin,* dan DNA (Rahbani-Nobar *et al*. 1999). Reaksi pengikatan aldehid pada protein dikenal sebagai reaksi glikasi.Hewan dengan diabetes, proses glikasi dapat teramati secara luas pada berbagai organ dan jaringan termasuk ginjal, hati, otak, paru dan saraf (Oldfield *et al.* 2001).Secara keseluruhan, perubahan kimia ini dikenal sebagai reaksi Maillard (Beckman *et al.* 2001).

Reaksi Maillard dapat terjadi pada kondisi penuaan fisiologis *in vivo* sebaik kondisi *in vitro* serta meningkat pada keadaan hiperglikemia (Oldfield *et al.* 2001; Ueno *et al.* 2002). Selain itu reaksi maillard juga berkaitan dengan komplikasi kronik DM. Reaksi ini secara umum terdiri atas 4 tahap, meliputi kondensasi nonenzimatik gula pereduksi, aldehid atau ketosa dengan gugus amino bebas dari protein atau asam nukleat membentuk glikosilamin. Reaksi ini dikenal sebagai fase satu serta secara alamiah bersifat reversibel dan terjadi dalam beberapa jam (kurang dari 24 jam). Selanjutnya pada fase kedua akan terjadi penataan ulang glikosilamin menjadi produk Amadori. Reaksi ini terjadi akibat kadar glukosa yang masih tinggi dalam waktu lebih dari 24 jam. Produk Amadori tersebut bersifat toksik bagi jaringan namun masih reversible. Kadar produk Amadori pada sejumlah protein meningkat sebanding dengan derajat hiperglikemia pada DM, kemudian pada fase ketiga, penataan ulang dan dehidrasi berganda produk Amadori menjadi amino atau senyawa karnonil reaktivitas tinggi seperti 3-*deoxyglucosane.* Fase terakhir reaksi antara senyawa karbonil dengan gugus amino lain dilanjutkan proses penataan ulang membentuk beragam *advance glycosylation end products* (AGE-product/AGEs) sebagai petunjuk *cross linking*

dan *browning* pada protein (Niwa *et al.* 1997; Simanjuntak dan Sudaryanti 1998; Carr dan Frei 1999; Soesilowati 2003).

AGEs merupakan salah satu produk penanda modifikasi protein sebagai akibat reaksi gula pereduksi terhadap asam amino. Akumulasi AGEs di berbagai jaringan merupakan sumber utama radikal bebas yang mampu berperan dalam peningkatan stress oksidatif, serta terkait dengan patogenesis komplikasi diabetes mirip pada penuaan yang normatif. Pada diabetes, akumulasi AGEs secara umum mempercepat terjadinya aterosklerosis, nefropati, neuropati, retinopati, serta katarak. Pengikatan AGEs terhadap reseptor makrofag spesifik (RAGE) mengakibatkan sintesis sitokin dan faktor pertumbuhan serta peningkatan stress oksidatif (Shoda *et al*. 1997; Carr dan Frei 1999; Droge 2002; Ueno *et al*. 2002; Beckett dan Kalsi 2003).

5.3 Jalur poliol-sorbitol (aldose reduktase). normoglikemia, sebagian besar glukosa seluler mengalami fosforilasi menjadi glukosa-6-fosfat oleh enzim heksokinase. Bagian kecil dari glukosa yang tidak mengalami fosforilasi memasuki jalur poliol, yakni jalur alternatif metabolisme glukosa (Ueno *et al.*2002). Melalui jalur ini, glukosa dalam sel dapat diubah menjadi sorbitol dengan bantuan enzim aldose reduktase (AR) (Nishimura 1998). Enzim aldose reduktase dapat ditemukan pada sejumlah jaringan mamalia termasuk lensa dan retina. Enzim tersebut mengkonversi glukosa menjadi polialkohol sorbitol dan retina. Enzim tersebut mengkonversi glukosa menjadi polialkohol sorbitol melalui reduks gugus aldehid glukosa (Rahbani-Nobar *et al.* 1999).

Dalam keadaan normal, konsentrasi sorbitol di dalam sel rendah. Akan tetapi, apabila terjadi keadaan hiperglikemia konsentrasi sorbitol meningkat. Sorbitol dengan bantuan enzim sorbitol dehydrogenase (SDH), akan diubah menjadi fruktosa. Degradasi sorbitol ini berjalan lambat sehingga sorbitol menumpuk dalam sel, sehingga dapat menyebabkan peningkatan tekanan osmotik dan selanjutnya dapat merusak sel (Nishimura 1998).

Masuknya substrat (substrat flux) melalui jalur poliol, selain dapat meningkatkan kadar sorbitol dan fruktosa intraseluler, juga menurunkan rasio NADPH terhadap NADP+. Selain itu, rasio NADH terhadap NAD+ sitosolik juga

menurun. Berkurangnya NADPH di dalam sel akibat meningkatnya AR dapat menghambat aktivitas enzim lain yang membutuhkan NADPH.

F. Antioksidan

1. Pengertian

Antioksidan adalah sebuah molekul yang dapat mencegah oksidasi molekul lain, berperan penting dalam melindungi sel dari kerusakan dengan kemampuan memblokir proses kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas. Antioksidan melindungi sel dari kerusakan radikal bebas dengan menyumbangkan elektron ke radikal bebas sehingga menstabilkan dan menghentikan reaksi berantai, atau dengan menerima satu elektron tidak berpasangan bertujuan untuk menstabilkan radikal bebas dan mencegah kerusakan protein, DNA dan lipid. Antioksidan menyumbangkan elektron pada radikal bebas untuk menghentikan reaksi berantai, antioksidan itu sendiri berubah menjadi radikal bebas. Reaktivitas dari antioksidan tidak sereaktif radikal bebas sehingga tidak berbahaya dan dapat dinetralkan dengan antioksidan lain (Draelos 2010)

2. Klasifikasi

2.1 Secara umum

2.1.1 Antioksidan endogen. Antioksidan endogen yaitu sejumlah komponen protein dan enzim yang disintesis dalam tubuh yang berperan dalam menangkal oksidasi oleh radikal bebas yang terdiri dari katalase, superoksida dismutase, serta protein yang berikatan dengan logam seperti transferin dan seruloplasmin. Antioksidan endogen dibagi menjadi dua kelompok antioksidan enzimatis dan antioksidan non-enzimatis. Antioksidan enzimatis seperti enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutation peroksidase (GPx). Sedangkan antioksidan non-enzimatis dibagi menjadi dua kelompok lagi yaitu antioksidan larut lemak seperti tokoferol, karotenoid, flavonoid, quinon, bilirubin dan antioksidan larut air seperti asam askorbat, asam urat, protein pengikat logam, dan protein pengikat heme.

2.1.2 Antioksidan eksogen. Antioksidan eksogen bersumber dari makanan terdiri atas tokoferol (vitamin E), asam askorbat (vitamin C), karotenoid

dan flavonoid. Antioksidan jenis eksogen ini dapat dimodifikasi dengan makanan dan suplemen (Winarsi 2007).

2.2 Berdasarkan mekanisme kerjanya

2.2.1 Antioksidan primer. Antioksidan primer disebut juga antioksidan enzimatis, suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan primer, apabila dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal, kemudian radikal antioksidan yang terbentuk segera berubah menjadi senyawa yang lebih stabil. Antioksidan primer bekerja dengan cara mencegah pembentukan senyawa radikal bebas baru atau mengubah radikal bebas yang telah terbentuk menjadi molekul yang kurang reaktif (Youngson 2005).

2.2.2 Antioksidan sekunder. Antioksidan sekunder disebut juga antioksidan eksogenus atau antioksidan non-enzimatis. Antioksidan dalam kelompok ini juga disebut sistem pertahanan preventif. Dalam sistem pertahanan ini, terbentuknya senyawa oksigen reaktif dihambat dengan cara pengkelatan metal atau dirusak pembentukannya, pengkelatan metal terjadi dalam cairan ekstraselular. Antioksidan non-enzimatis dapat berupa komponen non-nutrisi dan komponen nutrisi dari sayuran dan buah-buahan. Kerja sistem antioksidan non-enzimatik yaitu dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkapnya akibatnya radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen selular.

Antioksidan sekunder meliputi vitamin C, vitamin E, karoten, flavonoid, asam urat, bilirubin dan albumin. Senyawa antioksidan non-enzimatis bekerja dengan cara menangkap radikal bebas (*free radical scavenger*), kemudian mencegah reaktivitasnya. Ketika jumlah radikal bebas berlebihan, kadar antioksidan non-enzimatik yang dapat diamati dalam cairan biologis menurun (Youngson 2005).

2.2.3 Antioksidan tersier. Antioksidan tersier meliputi enzim DNA-*repair* dan metionin sulfoksida reduktase. Enzim-enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas (Youngson 2005).

Tabel 1. Tingkat Kekuatan Antioksidan

Intensitas	Nilai IC_{50} (ppm)
Kuat	< 50
Aktif	50-100
Sedang	101-250
Lemah	250-500
Tidak aktif	>500

(Sumber : Jun *et al.* 2003)

3. Mekanisme kerja

Mekanisme antioksidan dalam menghambat oksidasi atau menghentikan reaksi berantai pada radikal bebas dari lemak yang teroksidasi, dapat disebabkan oleh empat mekanisme reaksi, yaitu pelepasan hidrogen dari antioksidan, pelepasan elektron dari antioksidan, adisi lemak ke dalam cincin aromatik pada antioksidan dan pembentukan senyawa kompleks antara lemak dan cincin aromatik dari antioksidan (Ketaren 1986).

Radikal bebas dapat berkurang dan diubah menjadi air dengan kerjasama tiga enzim antioksidan utama atau antioksidan endogen yaitu SOD, CATdan GPx. SOD mengkatalis O_2 ke H_2O_2 (langkah pertama), selanjutnya catalase dan glutation peroksidase mengubah H_2O_2 menjadi H_2O oleh dua jalur yang berbeda. Jika tidak dicegah maka radikal hidroksil dari hidroperoksida akan mengakibatkan kerusakan oksidatif sel seperti kerusakan DNA, karboksilasi dari protein dan lipid peroksidasi, termasuk lipid di membran mitokondria. Sehingga jalur kerusakan oksidatif ini akan berakhir kepada kematian selular (Moron dan Cortazan 2012).

G. Radikal Bebas

1. Pengertian

Radikal bebas adalah atom atau gugus atom apa saja yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Elektron dari radikal bebas yang tidak berpasangan ini sangat mudah menarik elektron dari molekul lainnya sehingga radikal bebas tersebut menjadi lebih reaktif. Senyawa yang dihasilkan oleh polusi, asap rokok, kondisi stress, bahkan oleh sinar matahari akan berinteraksi dengan radikal bebas di dalam tubuh (Hernani dan Rahardjo 2005).

2. Sumber radikal bebas

Sumber radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh (*endogenus*) yang terbentuk sebagai sisa proses metabolisme (proses pembakaran) protein atau karbohidrat dan lemak yang dikonsumsi. Radikal bebas dapat pula diperoleh dari luar tubuh (*eksogenus*) yang berasal dari polusi udara, asap kendaraan motor, asap rokok, berbagai bahan kimia, makanan yang terlalu hangus dan lain sebagainya. Beberapa contoh radikal bebas antara lain : anion superoksida, radikal hidroksil ($OH^{\cdot}$), nitrit oksida ($NO^{\cdot}$), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan sebagainya (Windono *et al*. 2001).

3. Mekanisme pembentukan

Tubuh secara terus menerus membentuk radikal oksigen (Khlifi *et al*. 2005). Radikal ini dibentuk melalui mekanisme metabolisme normal. Radikal bebas juga terbentuk akibat respon terhadap pengaruh luar tubuh seperti polusi udara, sinar ultraviolet, asap kendaraan bermotor dan asap rokok. Salah satu unsur kimia sering terlibat dalam pembentukan radikal bebas oksigen. Molekul oksigen (O_2) sangat penting untuk fungsi sel karena memainkan peranan penting dalam serangkaian reaksi biokimia yang terjadi dalam rantai pernapasan yang bertanggung jawab untuk sebagian besar produksi adenosine trifosfat (ATP), yang menyediakan energi yang dibutuhkan untuk banyak reaksi seluler dan fungsi. Sumber radikal bebas terjadi melalui sederetan mekanisme reaksi, yang pertama pembentukan awal radikal bebas (inisiasi), lalu perambatan atau terbentuknya radikal baru (propagasi). Tahap terakhir yaitu pengubahan menjadi radikal bebas stabil dan tidak reaktif. Autooksidan adalah senyawa yang mengandung ikatan rangkap, hydrogen alilik, benzilik atau tersier yang rentan terhadap oksidan oleh udara (Winarsi 2007).

Radikal bebas dapat bereaksi dengan radikal bebas yang lain atau dengan molekul non radikal. Elektron yang tidak berpasangan dari dua radikal yang saling bertemu akan bergabung dengan membentuk ikatan kovalen dan tidak bersifat sebagai radikal. Radikal yang bertemu dengan spesies non radikal akan menghasilkan radikal baru (Winarsi 2007).

4. Efek radikal bebas

Radikal bebas dibutuhkan tubuh untuk membunuh kuman dalam keadaan normal. Radikal bebas dalam jumlah sangat banyak dan bertemu dengan asam lemak tidak jenuh yang ada di dalam membran sel akan menyebabkan kerusakan oksidatif dan terjadilah proses penuaan.

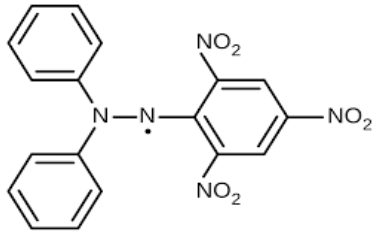
Radikal bebas sebenarnya penting bagi kesehatan dan fungsi tubuh yang normal dalam memerangi peradangan, membunuh bakteri, dan mengendalikan tonus otot polos pembuluh darah dan organ-organ dalam tubuh kita. Radikal bebas yang dihasilkan melebihi batas proteksi antioksidan seluler, maka akan menyerang sel itu sendiri. Struktur sel yang berubah turut merubah fungsinya, yang akan mengarah pada proses munculnya penyakit (Khomsan 2009).

H. Metode Uji Antioksidan *In Vitro*

Beberapa metode pengukuran aktivitas antioksidan yang sering digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan suatu senyawa diantaranya uji DPPH, uji TRAP, uji ABTS, dan uji FRAP.

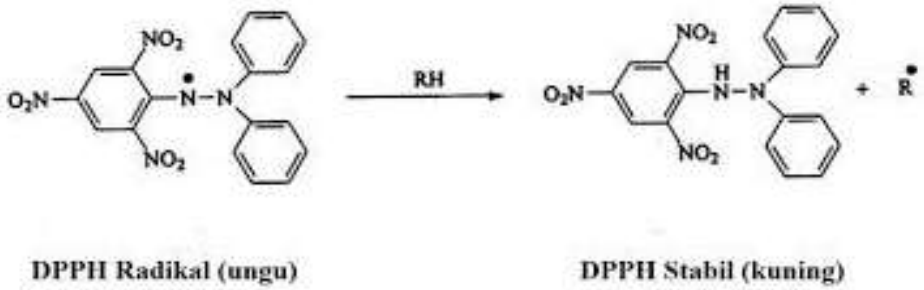
1. Uji DPPH

Salah satu metode untuk menentukan aktivitas antioksidan penangkap radikal adalah metode DPPH (*1,1-Diphenyl-2-picrylhidrazyl*). Metode DPPH memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517 nm dengan warna violet gelap. Penangkap radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang kemudian menyebabkan penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Sunarni 2005).



Gambar 6. Struktur kimia DPPH

Radikal bebas DPPH (*1,1-Diphenyl-2-picrylhidrazyl*) jika bereaksi dengan senyawa antioksidan akan berubah menjadi DPPH hidrasin yang berwarna kuning, tingkat perubahan dari warna ungu menjadi warna kuning menunjukan bahwa radikal bebas DPPH menjadi DPPH hidrasin yang stabil (Narayanaswani dan Duraisami 2011).



Gambar 7. Reaksi antara DPPH dengan H· yang berasal dari senyawa peredam radikal bebas.

2. Uji TRAP

Pengujian TRAP (*Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*) bekerja berdasarkan pengukuran konsumsi oksigen selama reaksi oksidasi lipid terkontrol yang diinduksi oleh dekomposisi termal dari AAPH (*Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride*) untuk mengukur total aktivitas antioksidan. Hasil uji diekpresikan sebagai jumlah (dalam mikromolar) radikal peroksil yang terperangkap oleh 1 liter plasma. Pengukuran serum trap berdasarkan pada penentuan lamanya waktu yang diperlukan oleh serum uji untuk bertahan dari oksidasi buatan (Setyanto 2012).

3. Uji ABTS

Pungujian ABTS (*Azinobis ethyl-Benzo Thiazoline Sulfonic acid*) merupakan substrat dari peroksidase, dimana ketika dioksidasi dengan kehadiran H_2O_2 akan membentuk senyawa radikal kation yang menstabilkan dengan karakteristik menunjukan absorbansi kuat pada panjang gelombang 414 nm. ABTS merupakan senyawa yang larut air dan stabil secara kimia. Akumulasi dari ABTS dapat dihambat oleh antioksidan pada medium reaksi dengan aktivitas yang bergantung pada waktu reaksi dan jumlah antioksidan. Kemampuan relatif antioksidan untuk mereduksi ABTS dapat diukur dengan menggunakan

spektrofotometri pada panjang gelombang 734 nm. Absorbansi maksimal juga dapat terjadi pada panjang gelombang yang lain. Panjang gelombang yang mendekati daerah infra merah (734 nm) dipilih untuk meminimalkan interfensi dari absorbansi komponen lainnya. Hasil pengukuran dengan spektrofotometer selanjutnya dibandingkan dengan standar baku antioksidan sintetik, yaitu trolox yang merupakan analog vitamin E. Hasil perbandingan ini diekspresikan sebagai TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Activity*). TEAC adalah konsentrasi (dalam milimolar) larutan trolox yang memiliki efek antioksidan ekuivalen dengan 1,0 nM larutan zat uji. TEAC mencerminkan kemampuan relatif dari antioksidan untuk menangkap radikal ABTS dibandingkan dengan trolox (Setyanto 2012).

4. Uji FRAP

Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) bekerja berdasarkan pada reduksi dari analog ferroin, kompleks Fe^{3+} dari tripidiltriazin Fe $(TPTZ)^{3+}$ menjadi Fe^{2+}, $Fe(TPTZ)^{2+}$ yang berwarna biru intensif oleh antioksidan pada suasana asam. Hasil pengujian diinterpretasikan dengan peningkatan absorbansi pada panjang gelombang 593 nm, sehingga dapat disimpulkan jumlah Fe^{2+} (dalam mikromolar) ekuivalen dengan antioksidan standar (Antolovich *et al*. 2002).

I. Metode Uji Antioksidan *In vivo* Terhadap GPx

Pemeriksaan enzim antioksidan pada hewan uji seperti pemeriksaan peningkatan enzim GPx, SOD dan katalase.

Glutation peroksidase (GPx) merupakan salah satu antioksidan enzimatik yang mencegah kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas dengan mengkatalisis berbagai hidroperoksida dan merupakan suatu protein yang memiliki bentuk tetramer. Enzim ini mengandung empat atom selenium yang terikat sebagai *selenocysteine.* Struktur enzim ini dapat dilihat pada gambar di bawah ini :

Gambar 8. Struktur GPx

Penderita diabetes menunjukkan penurunan vitamin E dan glutation. Glutation dalam bentuk tereduksi (GSH) terdapat dalam plasma manusia, intraseluler, dengan kemampuan sebagai antioksidan untuk menghambat radikal bebas dengan fungsi secara umum sebagai *buffer* redoks dan kofaktor enzim glutation peroksidase (GPx) (Setiawan dan Suhartono 2005). Glutation peroksidase akan mereduksi H_2O_2 menjadi H_2O dan Glutation disulfide (GSSH) dengan bantuan Glutation tereduksi (GSH).

GPx terdapat dalam hepar dan sel darah merah dengan konsentrasi tinggi, sedangkan jantung, ginjal, paru-paru, adrenal, lambung dan jaringan adipose mengandung kadar glutation peroksidase dalam kadar sedang. Glutation peroksidase kadar rendah sering ditemukan dalam otak, otot, testis dan lensa mata. Pada penderita nekrosis hati dan penyakit degeneratif aktivitas glutation peroksidase rendah karena terjadi defisiensi selenium (Rohrdanz *et al.* 2002; Chen *et al.* 2002).

$$\text{Aktivitas GPx} = \frac{(B-B^0)}{(T2-T1)x\,V} \text{ x dilusi sampel} = \text{nmol/menit/ml} = \text{mU/mL}$$

Keterangan :

B = sampel

B^0 = kontrol

T1 = waktu saat pembacaan pertama

T2 = waktu saat pembacaan kedua

V = volume sampel pre test ditambah ke sumur pereaksi

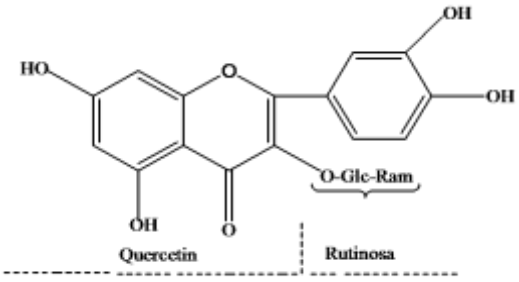
Metode pemeriksaan yang dilakukan adalah metode enzimatis dengan menggunakan glutation peroksidase. Glutation peroksidase (GPx) mengkonversi glutation tereduksi (GSH) menjadi glutation teroksidasi (GSSH) sekaligus mengurangi hidroperoksida lipid ke beberapa koresponden alkohol atau hidrogen peroksida bebas ke air. Beberapa isozim telah ditemukan di berbagai lokasi seluler dan spesifitas substrat yang berbeda. Rendahnya GPx telah berkolerasi dengan gangguan terkait radikal bebas. Dalam Glutathione peroxidase *assay,* GPx mereduksi *Cumene Hydroperoxide* saat terjadi perubahan GSH ke GSSH.

Selanjutnya GSSH yang dihasilkan direduksi menjadi GSH oleh GR dengan mengkonsumsi NADPH. Penurunan NADPH (biasanya diukur pada panjang gelombang 340 nm) sebanding dengan aktivitas GPx (Biovision 2012).

J. Rutin

Rutin dan aglikonnya adalah flavonoid yang telah dikenal mempunyai efek antioksidan dan antiinflamasi. Rutin mampu mencegah kerusakan oksidatif dan kematian sel melalui beberapa mekanisme, antara lain menangkap radikal oksigen, perlindungan terhadap peroksidasi lipid dan mengkhelat ion logam. Rutin adalah glikosida flavonol yang terdiri dari aglikon kuersetin dan rutinosida (rhamnosa dan glukosa) sebagai gulanya (Herowati 2005).

Rutin sering digunakan sebagai pembanding pada uji aktivitas antioksidan karena senyawa ini merupakan antioksidan dari golongan flavonoid yang cukup efektif guna meredam aksi destruktif radikal bebas. Rutin (*5,7,3,4-tetrahidroksi flavonol 3-0-rutinosida*) merupakan senyawa flavonoid dari kelompok flavonol, tepatnya merupakan glikosida flavonol yang terdiri atas aglikon kuersetin dan rutinosida (ramnosa dan glukosa) sebagai gulanya (Susilowati 2010).



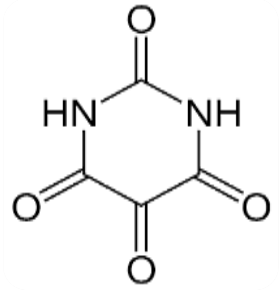
Gambar 9. Struktur kimia rutin

K. Diabetogenik

Aloksan adalah derivat pirimidin sederhana, yang diperoleh dari oksidasi asam urat oleh asam nitrat. Aloksan merupakan bahan kimia yang digunakan untuk menginduksi diabetes pada binatang percobaan. Pemberian aloksan adalah cara yang cepat untuk menghasilkan kondisi diabetik eksperimental (antidiabetes) pada binatang percobaan. Aloksan telah dikenal secara luas sebagai agen diabetogenik yang digunakan untuk menginduksi DM tipe 2 pada hewan

percobaan. Biasanya aloksan digunakan untuk menginduksi DM pada hewan percobaan seperti kelinci, tikus, mencit dan anjing (Anindhita 2009).

Aloksan secara cepat dapat mencapai pankreas, aksinya diawali dari pengambilan yang cepat oleh sel β Langerhans. Pembentukan oksigen reaktif merupakan factor utama pada kerusakan sel tersebut. Pembentukan oksigen reaktif diawali dengan proses reduksi aloksan dalam sel β Langerhans. Aloksan mempunyai aktifitas tinggi terhadap senyawa seluler yang mengandung gugus SH, glutation reduksi (GSH), sistein dan senyawa sulfhidril terikat protein. Faktor lain selain pembentukan pembentukan oksigen reaktif adalah gangguan pada homeostatis kalsium intraseluler dari penghambat glukokinase dalam proses metabolisme energi (Nugroho 2006). Tingginya konsentrasi aloksan tidak mempunyai pengaruh pada jaringan percobaan lainnya. Mekanisme aksi dalam menimbulkan perusakan selektif sel β pankreas belum diketahui dengan jelas. Efek diabetogeniknya bersifat antagonis terhadap glutation yang bereaksi dengan gugus SH. Aloksan bereaksi dengan cara merusak substansi esensial didalam sel β pankreas (Anandhita 2009).



Gambar 10. Struktur kimia aloksan

L. Glibenklamid

1. Sifat fisika kimia

Kelarutan glibenklamid adalah praktis tidak larut dalam air dan dalam eter, sukar larut dalam etanol dan dalam metanol, larut sebagian dalam kloroform (Depkes 1995)

2. Indikasi dan kontra indikasi

Glibenklamid diindikasikan pada pengobatan diabetes mellitus tipe 2 onset maturitas stabil dan tidak terkomplikasi ringan atau tidak parah, yang tidak dapat diobati hanya dengan diet saja. Kontraindikasi glibenklamid hipersensitif, penderita yang terkomplikasi dengan ketoasidosis, koma diabetik, demam, trauma parah atau gangrene dan penderita fungsi ginjal yang tidak sempurna (Anonim 2008).

3. Dosis dan aturan pakai

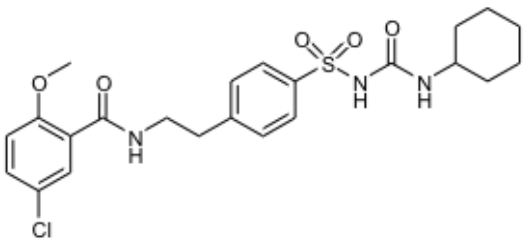
Pengobatan dengan glibenklamid dimulai dari dosis rendah (2,5 mg) diberikan pada pagi hari, sedangkan profil mingguan glukosa serum dipantau. Dosis permulaan 1 kali sehari 2,5-5 mg, bila perlu dinaikkan setiap minggu sampai maksimal 2 kali sehari 10 mg (Tan dan Raharja 2002).

4. Mekanisme kerja

Glibenklamid bekerja dengan menghambat ATP sensitive potassium channel di sel β pankreas, sehingga membantu untuk mengurangi jumlah gula dalam darah orang dengan diabetes tipe 2 (Anonim 2008). Mengurangi kadar glukagon dalam serum, dan meningkatkan pengikatan insulin pada jaringan target dan reseptor (Mycek *et al*. 2001). Satheesh (2004) mengemukakan bahwa glibenklamid memiliki aktivitas antioksidan dimana glibenklamid mampu meningkatkan kandungan GSH dan SOD hewan uji diabetes.

5. Efek samping

Glibenklamid mempunyai efek samping antara lain : gejala saluran cerna berupa mual, diare, sakit perut, hiper sekresi asam lambung. Gejala susunan saraf pusat berupa vertigo, menimbulkan gejala hipertiroidisme dan ikterus obstruktif. Hipoglikemia dapat terjadi pada penderita yang tidak mendapat dosis tepat, tidak makan cukup, atau dengan gangguan fungsi hati atau ginjal (Sukandar *et al*. 2008).



Gambar 11. Struktur Kimia Glibenklamid

M. Hewan Uji

Hewan uji adalah setiap hewan yang dipergunakan pada sebuah penelitian biologis dan biomedis yang dipilih berdasarkan syarat atau standar dasar yang diperlukan dalam penelitian tersebut. Dalam memperlakukan hewan uji untuk penelitian diperlukan pengetahuan yang cukup mengenai berbagai aspek tentang sarana biologis, dalam hal penggunaan hewan percobaan laboratorium.

1. Sistematika

Sistematika tikus menurut Depkes (2009), sebagai berikut :

Dunia : Animalia
Filum : Chordata
Sub Filum : Vertebrata
Classis : Mamalia
Sub classis : Plasentalia
Order : Rodentia
Familia : Muridae
Genus : Rattus
Spesies : *Rattus norvegicus.*

2. Karakteristik utama

Tikus merupakan hewan yang cerdas dan relatif resisten terhadap infeksi. Tikus putih umumnya tenang dan mudah ditangani, tidak begitu fotophobia. Tikus putih galur wistar (*Rattus novergicus*) memiliki berat antara 150-600 g, hidung tumpul dan panjang badannya antara 18-25 cm. kepala dan badan tikus galur wistar lebih pendek dibandingkan ekornya, serta ukuran telinganya tidak lebih dari 20-33 mm (Anonim 1993).

3. Jenis kelamin

Penelitian ini menggunakan tikus jantan sebab kondisi hormonalnya dinilai lebih stabil dibanding tikus betina yang sangat berfluktuasi pada saat mulai beranjak dewasa, sehingga dikhawatirkan akan memberikan respon yang berbeda dan dapat mempengaruhi hasil penelitian (Anonim 1993).

N. Landasan Teori

Antioksidan adalah sebuah molekul yang diperlukan tubuh untuk menetralisir radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas. Mekanisme kerja antioksidan yaitu dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stress oksidatif. Stress oksidatif adalah ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas dengan pertahanan antioksidan di dalam tubuh, stress oksidatif dapat menganggu metabolisme sel dan menyebabkan kerusakan DNA, lipid, dan protein. Radikal bebas adalah suatu atom atau molekul yang sangat reaktif dan memiliki elektron yang tidak berpasangan, sehingga sangat mudah untuk menarik elektron dari molekul lain (radikal bebas baru)**.**

Salah satu penyakit yang berhubungan dengan radikal bebas adalah diabetes mellitus. Diabetes mellitus adalah penyakit degeneratif yang ditandai dengan hiperglikemia dan berhubungan dengan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. Diabetes mellitus disebabkan oleh penurunan sekresi insulin atau penurunan sensitivitas insulin. Hiperglikemia yang terjadi pada diabetes mellitus menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein nonenzimatik, dan jalur poliol sorbitol yang selanjutnya mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif. Peningkatan produksi senyawa oksigen reaktif dari proses tersebut mengakibatkan timbulnya stress oksidatif yang berkontribusi pada perburukan dan perkembangan kejadian komplikasi pada diabetes mellitus.

Peningkatan suplai antioksidan dalam tubuh akan membantu mengurangi resiko komplikasi pada penderita diabetes. Senyawa antioksidan sintetik maupun alami (dari berbagai tanaman) mampu mengontrol kadar glukosa darah dan mencegah komplikasi diabetes. Hal ini dilihat dari adanya aktivitas antioksidan dan hipoglikemik dari senyawa aktif golongan polifenol pada tanaman. Polifenol mempunyai kemampuan untuk menghambat reaksi oksidasi dan menangkap radikal bebas, selain itu senyawa-senyawa yang memiliki potensi sebagai antioksidan adalah flavonoid dan alkaloid.

Salah satu tanaman yang memiliki potensi sebagai antioksidan alami untuk pengobatan diabetes mellitus adalah faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br). Faloak merupakan tanaman yang tumbuh di NTT (Nusa Tenggara Timur), penggunaan faloak oleh masyarakat NTT masih bersifat pemanfaatan secara tradisional. Bagian dari pohon faloak yang sering digunakan untuk pengobatan adalah kulit batang (klika) faloak yang mengandung senyawa antioksidan alami yaitu flavonoid dan fenolik yang mampu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas.

Ekstrak etanol kulit batang faloak memiliki aktivitas antioksidan kuat dengan nilai IC_{50} 4,8101. Flavonoid sebagai salah satu kelompok senyawa fenolik yang banyak terdapat pada jaringan tanaman dapat berperan sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan flavonoid bersumber pada kemampuan mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam. Selain itu, flavonoid dapat bersifat sebagai antidiabetes karena flavonoid mampu berperan sebagai senyawa yang menekan kadar glukosa darah dan meningkatkan aktivitas glukokinase hepatik dengan meningkatkan pelepasan insulin dari penkreas.

Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo*. Pengujian secara *in vitro* dapat menggunakan metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*). Radikal bebas DPPH (*1,1-Diphenyl-2-picrylhidrazyl*) jika bereaksi dengan senyawa antioksidan akan berubah menjadi DPPH hidrasin yang berwarna kuning, tingkat perubahan dari warna ungu menjadi warna kuning menunjukan bahwa radikal bebas DPPH menjadi DPPH hidrasin yang stabil. Pengujian antioksidan secara *in vivo* dapat dilakukan dengan melihat status antioksidan endogen, salah satunya terhadap enzim glutation peroksidase pada jaringan hepar tikus diabetes yang diinduksi oleh aloksan. Glutation peroksidase sebagai enzim peredam *(quenching)* radikal bebas merupakan enzim yang berperan penting dalam melindungi organisme dari kerusakan oksidatif dengan cara mereduksi H_2O_2 menjadi H_2O dan glutation disulfide (GSSH) dengan bantuan glutation tereduksi.

O. Hipotesis

Berdasarkan uraian sebelumnya, dapat disusun hipotesis sebagai berikut :

Pertama, ekstrak etanol kulit batang faloak memiliki aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH yang dinyatakan dalam nilai $IC_{50.}$

Kedua, ekstrak etanol kulit batang faloak mampu meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase pada tikus yang diinduksi aloksan.

Ketiga, ekstrak etanol kulit batang faloak pada dosis tertentu akan meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase paling kuat.

BAB III
METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) yang diambil dari Kupang, Nusa Tenggara Timur (NTT).

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) dalam keadaan kering.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini adalah aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) terhadap radikal bebas DPPH.

Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah aktivitas dari ekstrak etanol kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) dalam berbagai variasi dosis terhadap aktivitas enzim glutation peroksidase pada tikus putih jantan diabetes.

Variabel utama ketiga pada penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar.

Variabel utama keempat dalam penelitian ini adalah peneliti, kondisi laboratorium, kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, usia, jenis kelamin dan galur.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) yang diberikan pada tikus dengan berbagai variasi dosis.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah aktivitas enzim glutation peroksidase pada hewan uji setelah diberi perlakuan menggunakan ekstrak etanol

kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) pada kelompok uji, kontrol negatif dan kontrol positif dan aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH.

Variabel kendali pada penelitian ini adalah peneliti, kondisi laboratorium, kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, usia, jenis kelamin, galur, dan glutation peroksidase.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, kulit batang faloak merupakan kulit batang yang diperoleh dari Kupang, Nusa Tenggara Timur (NTT).

Kedua, serbuk kulit batang faloak merupakan serbuk yang berasal dari kulit batang faloak yang telah dikeringkan, digiling dan diayak dengan ayakan no. mesh 40.

Ketiga, ekstrak etanol kulit batang faloak adalah ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi serbuk kulit batang faloak dengan pelarut etanol 70%, selanjutnya dipekatkan menggunakan *vakum evaporator* hingga diperoleh ekstrak pekat kulit batang faloak.

Keempat, aktivitas antioksidan secara *in vitro* dengan menggunakan metode penangkapan radikal bebas DPPH.

Kelima, tikus diabetes adalah tikus jantan yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan sekitar 180-220 g yang mengalami diabetes akibat induksi aloksan.

Keenam, aktivitas glutation peroksidase adalah aktivitas yang ditetapkan dari data supernatan hati menggunakan enzim glutation peroksidase.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) dari Kupang, (NTT) Nusa Tenggara Timur.

1.2 Bahan uji farmakalogi. Bahan uji farmakologi yang digunakan pada penelitian ini adalah glibenklamid (Indofarma), aloksan (Aldrich), NaCl 0,9%, air suling, phosphate buffer, GSH, *glutathione peroxidase assay kit*, DPPH (*1,1 difenil-2-pikrilhidrazil*), *rutin*, dan metanol p.a.

2. Alat

Alat yang dipakai untuk membuat simplisia kulit batang faloak adalah penghalus yang berfungsi untuk menghancurkan kulit batang faloak, oven, mesin penggiling, ayakan nomor mesh 40. Alat penyari untuk kulit batang faloak yang digunakan antara lain alat-alat gelas, peralatan maserasi yang terdiri dari botol cokelat, *vacum evaporator.* Alat yang digunakan untuk mengukur kadar air adalah *Sterling-Bidwell*, alat-alat gelas, timbangan elektrik, mortir dan stamfer, batang pengaduk. Alat yang digunakan untuk perlakukan hewan uji yaitu timbangan, spuit oral, jarum suntik, pipa kapiler dan kandang tikus. Alat untuk pengujian glutation peroksidase yaitu spektrofotometer UV-Vis, lemari beku -80^{0}C, sentrifugase dingin Eppendorf, tabung EDTA LOT, mikropipet *Eppendorf, microsentrifugase tube eppendorf* dan vortex.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih galur wistar kelamin jantan, umur 2-3 bulan dengan berat badan rata-rata 180-220 g sebanyak 30 ekor. Pengelompokan dilakukan secara acak masing-masing 5 ekor per kelompok. Semua tikus dipelihara dengan cara yang sama, mendapat diet yang sama, ukuran kandang yang sesuai dengan temperature 30±10^{o}C.

Penerangan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap. Selama penelitian kebutuhan makanan dan minuman harus selalu terkontrol agar mencegah kematian tikus terutama saat diinduksi aloksan untuk membuat tikus diabetes.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi kulit batang faloak

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) yang bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) yang dilakukan dengan mencocokan ciri-ciri morfologi yang ada pada kulit batang faloak yang dibuktikan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret Surakarta.

2. Pengambilan dan pembuatan serbuk kulit batang faloak

Sampel penelitian yang digunakan adalah klika faloak yang diperoleh dari Kupang, Nusa Tenggara Timur (NTT). Sampel kulit batang faloak yang diperoleh disortasi basah lalu dicuci. Sampel kemudian dirajang dan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50ºC, kemudian dilakukan sortasi kering dan diserbukkan.

3. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak kulit batang faloak

Penetapan kadar air serbuk kulit batang faloak dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell.* Caranya dengan menimbang serbuk kulit batang faloak sebanyak 20 gram dimasukkan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut xilena sebanyak 100 ml sampai serbuk terendam, kemudian memasang alat *Sterling-Bidwell,* tahap selanjutnya dipanaskan dengan api kecil. Pemanas dihentikan bila air pada penampung tidak menetes lagi, kemudian diukur kadar airnya dengan melihat volume pada skala alat tersebut dan dihitung persen kadar airnya (Sudarmadji *et al.* 2010).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{volume terbaca}}{\text{berat bahan}} \text{ x } 100\%$$

4. Pembuatan ekstrak etanol kulit batang faloak

Serbuk kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) ditimbang 500 g, dimasukkan ke dalam botol maserasi kemudian dituangi dengan etanol 70% sebanyak 5000 ml, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya, sambil sesekali diaduk. Cairan hasil ekstraksi disaring dengan kain flanel. Ampas kemudian dimaserasi dengan cara yang sama dan dibiarkan selama 2 hari sambil sesekali diaduk. Kemudian filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50ºC, hasilnya disebut ekstrak etanol kulit batang faloak.

5. Uji bebas alkohol ekstrak etanol kulit batang faloak

Tes bebas alkohol ekstrak etanol kulit batang faloak dilakukan dengan cara ekstrak kulit batang faloak ditambah asam asetat encer dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan. Bila tidak ada bau ester (etil asetat) berarti sudah tidak ada etanol (Depkes 1979).

6. Identifikasi kandungan kimia ekstrak kulit batang faloak

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk memastikan kebenaran zat kimia yang terkandung di dalam kulit batang faloak. Identifikasi senyawa meliputi senyawa flavonoid, tanin, saponin, steroid dan triterpenoid.

Pada identifikasi senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit batang faloak berdasarkan reaksi warna menggunakan tabung reaksi dan bahan-bahan kimia seperti berikut :

6.1 Identifikasi flavonoid. Sejumlah tertentu ekstrak dilembabkan dengan 100 ml air panas kemudian didihkan selama 5 menit, disaring dan ambil filtratnya 5 ml dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan serbuk magnesium secukupnya, 1 ml asam klorida dan 2 ml amil alkohol, dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Terbentuknya warna merah/kuning/jingga pada lapisan amil alcohol menunjukkan positif flavonoid (Sarker 2006).

6.2 Identifikasi Tanin. Sejumlah ekstrak ditambah 20 ml air panas kemudian didihkan selama 15 menit, setelah dingin disaring. Sebanyak 5 ml filtrate dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi larutan besi (III) klorida 1%. Jika tannin positif maka akan terbentuk warna hijau violet setelah direaksikan dengan larutan besi (III) klorida (Depkes 1995).

6.3 Identifikasi Saponin. Sejumlah tertentu ekstrak ditambah dengan air panas 10 ml, didinginkan lalu dikocok selama 10 detik. Kemudian didiamkan selama 10 menit. Saponin positif bila muncul buih yang tinggi 1-10 cm. Pada penambahan satu tetes asam klorida 2N buih tidak hilang (Robinson 1995).

6.4 Identikasi alkaloid. Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan cara serbuk dan ekstrak simplisia sebanyak 500 mg dilarutkan dalam 100 ml air panas, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrate sebanyak 5 ml dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan dengan 1,5 ml HCl 2% kemudian dilanjutkan dengan penambahan 2 sampai 4 tetes reagen Dragendroff. Alkaloid positif terjadi kekeruhan atau endapan coklat (Harborne 1987).

6.5 Identifikasi steroid dan terpenoid. Sejumlah tertentu ekstrak ditambahkan dengan satu tetes Liebermann Burchard yang terdiri dari 1 ml asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat 1 tetes. Terpenoid menunjukan reaksi positif

dengan adanya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan. Sedangkan, steroid menunjukan reaksi positif apabila muncal cincin biru kehijauan (Sarker 2006).

7. Uji aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH

7.1 Penyiapan larutan DPPH 80 ppm. Larutan pereaksi DPPH 80 ppm dibuat dengan cara menimbang 8 mg serbuk DPPH yang kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml dan ditambahkan metanol p.a ke dalam labu takar sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 80 ppm.

7.2 Penyiapan larutan ekstrak kulit batang faloak. Pembuatan larutan stok esktrak kulit batang faloak dengan konsentrasi 1000 ppm. Dibuat dengan cara menimbang 100 mg ekstrak kental secara teliti kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sampai larut dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, selanjutnya ditambah metanol p.a sampai tanda batas. Kemudian dibuat larutan seri konsentrasi ekstrak etanol kulit batang faloak 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm.

7.3 Penyiapan larutan rutin. Pembuatan larutan stok rutin dibuat dengan konsentrasi 50 ppm. Dengan cara menimbang 5 mg rutin kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sampai larut dan dimasukkan dalam labu ukur 100 ml, selanjutnya ditambah metanol p.a sampai tanda batas. Setelah itu dibuat larutan seri konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm.

7.4 Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH untuk uji aktivitas antioksidan ekstrak kulit batang faloak dilakukan dengan 2 ml larutan DPPH 80 ppm ditambah 2 ml metanol p.a dikocok sampai homogen dan diamati serapan pada rentang 500-525 nm dengan menggunakan blanko metanol p.a.

7.5 Penentuan *operating time*. Penentuan *operating time* dilakukan dengan 2 ml larutan DPPH 80 ppm ditambah 2 ml meranol p.a, dikocok homogen dan diamati serapannya pada panjang gelombang 517 nm, dibaca mulai dari menit 0 sampai menit didapatkan nilai absorbansi yang stabil pada menit tertentu. Untuk penentuan operating time dapat ditentukan dari grafik antara waktu pembacaan dan absorbansi.

7.6 Uji aktivitas antioksidan. Setiap konsentrasi larutan uji dipipet sebanyak 2 ml, kemudian ditambahkan dengan 2 ml larutan pereaksi DPPH 80 ppm dalam vial, kocok, biarkan ditempat gelap selama 30 menit dan kemudian diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan (517 nm). Percobaan dilakukan 3 kali pengulangan. Pengamatan terhadap larutan kontrol dari 2 ml metanol ditambah 2 ml DPPH 80 ppm.

7.7 Analisa data. Hasil pengukuran absorbansi yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung prosentase aktivitas penangkap radikal bebas dari berbagai konsentrasi uji. Harga IC_{50} dihitung dari persamaan regresi linear antara probit dari persen (%) peredaman radikal (% radikal) versus logaritma berbagai konsentrasi uji. Rumus prosentase peredaman sebagai berikut :

$$\textbf{Peredaman} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbasi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \textbf{ x 100\%}$$

8. Uji aktivitas antioksidan terhadap glutation peroksidase

8.1 Penentuan dosis.

8.1.1 Glibenklamid. Dosis glibenklamid pada manusia 70 kg adalah 5 mg. Faktor konversi manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018. Sehingga dosis glibenklamid adalah 0,09 mg/200gram BB tikus atau 0,45 mg/kg BB tikus.

8.1.2 Aloksan monohidrat. Dosis aloksan yang digunakan pada penelitian ini adalah 36 mg/200gram BB tikus atau 180 mg/kg BB tikus, yang diberikan secara intraperitoneal.

8.1.3 Sediaan uji. Dosis yang diberikan pada tikus mengacu pada dosis pemakaian kulit batang faloak secara tradisional. Penentuan dosis dilakukan setelah melakukan orientasi dengan mengkonversi rendemen pengeringan dan ekstrak kulit batang faloak dari manusia 70 kg ke tikus 200 gram (faktor konversi 0,018), maka dosis yang diberikan kepada tikus dalam penelitian ini yaitu dosis I (65 mg/Kg BB tikus), dosis II (130 mg/Kg BB tikus), dan dosis III (260 mg/Kg BB tikus) banyaknya ekstrak kental kulit batang faloak yang digunakan dihitung berdasarkan berat badan dari masing-masing tikus.

8.2 Pembuatan Bahan uji.

8.2.1 Glibenklamid. Suspensi glibenklamid 0,09 mg/ml dibuat dengan cara melarutkan serbuk glibenklamid sebanyak 9 mg dalam CMC Na 0,5% sampai volume 100 ml.

8.2.2 CMC Na 0,5%. Larutan CMC Na konsentrasi 0,5% dibuat dengan cara melarutkan 0,5 gram serbuk CMC Na sedikit demi sedikit kedalam air suling panas sambil diaduk pada volume 100 ml air suling hingga mengembang sampai homogen.

8.2.3 Aloksan. Larutan aloksan 25 mg/ml adalah larutan yang digunakan sebagai penginduksi diabetes. Larutan aloksan dibuat dengan cara melarutkan serbuk aloksan sebanyak 2,5 gram dalam NaCl 0,9% hingga volume 100 ml.

8.3 Penentuan hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar dan tidak cacat dengan berat sekitar 180-220 g sebanyak 30 ekor yang kemudian dibagi menjadi 6 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Tikus-tikus tersebut kemudian diaklimatisasi selama satu minggu.

8.4 Perlakuan hewan uji

Tikus yang telah beradaptasi dengan lingkungannya kemudian ditimbang, tikus yang digunakan sebanyak 30 ekor secara acak yang dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor, sebelumnya tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 10 jam sebelum diberi perlakuan.

Kelompok 1 : kontrol normal tanpa perlakuan.

Kelompok 2 : kontrol negatif (tikus diberikan CMC Na 0,5%)

Kelompok 3 : kontrol pembanding (tikus diberikan glibenklamid 0,45 mg/kg BB tikus)

Kelompok 4 : tikus diberikan ekstrak etanol kulit batang faloak dengan dosis 65 mg/Kg BB tikus selama 14 hari.

Kelompok 5 : tikus diberikan ekstrak etanol kulit batang faloak dengan dosis 130 mg/Kg BB tikus selama 14 hari.

Kelompok 6 : tikus diberikan ekstrak etanol kulit batang faloak dengan dosis 260 mg/Kg BB tikus selama 14 hari.

8.5 Prosedur uji diabetes aloksan

Pada hari pertama sebelum tikus diberikan perlakuan, dilakukan pengambilan darah untuk pengukuran kadar glukosa awal (T_0). Pada hari yang sama juga diberikan larutan aloksan monohidrat 180 mg/kg BB tikus secara intraperitoneal. Setelah 5 hari diinduksi dengan larutan aloksan, setiap hewan uji dengan kadar gula darah > 200 mg/dL (positif diabetes) dikelompokkan kemudian diambil darahnya untuk pengukuran kadar glukosa darah hari pertama (T_1). Pengambilan darah dilakukan pada pembuluh darah mata (*venous plexus*) tikus.

8.6 Pemeriksaan aktivitas antioksidan terhadap GPx

Pemeriksaan kadar GPx supernatan jernih hati dilakukan dengan *Glutation Peroxidase Assay Kit* merek *Bio Vision* disimpan pada suhu -20ºC dan terlindung dari sinar matahari langsung. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

8.6.1 Preparasi sampel. Hati segar tikus ± 1,25 g dicacah dalam kondisi dingin dalam 5 ml larutan *phosphate buffer saline* (PBS) yang mengandung 11,5 g/L KCl. Homogenat disentrifugasi pada 4.000 rpm selama 10 menit sebanyak 2 kali hingga diperoleh supernatan jernih. Supernatan diambil untuk pengujian sedangkan sedimennya dibuang.

8.6.2 Pengukuran aktivitas GPx. Pengukuran menggunakan metode Lawrence dan Burk (1976) yang dimodifikasi. Sebanyak 200 µl supernatan hati ditambahkan 200 µl buffer phosphat 0,1 M pH 7,0 yang mengandung 0,1 mM EDTA, 200 µl glutation tereduksi (GSH) 10 mM dan 200 µl enzim glutation reduktase (2,4 unit). Kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37ºC, ditambahkan 200 µl NADPH 1,5 mM dan diinkubasi lagi selama 3 menit pada suhu yang sama dan dilanjutkan dengan penambahan 200 µl H_2O_2 1,5 mM. Laju perubahan serapan selama konversi NADPH menjadi $NADP^+$ diukur secara spektrofotometri pada λ = 340 nm selama 3 menit. Aktivitas GSH-Px dinyatakan sebagai µmol NADPH yang dioksidasi menjadi $NADP^+$ $menit^{-1}$ mg^{-1} protein dengan koefisien ekstrinsik (6,22 mM^{-1} cm^{-1}) untuk NADPH. Perhitungannya adalah sebagai berikut :

$$\text{M unit GSH-Px} = \frac{\text{Abs x Vt x 2 x 1000 x 1/mgprotein}}{\text{6,22 x Vs}}$$

Keterangan :

Abs = perubahan absorbansi

Vt = volume total

6,22 = koefisien ekstrinsik dari NADPH

2 = 2 mol GSH yang setara dengan 1 mol NADPH

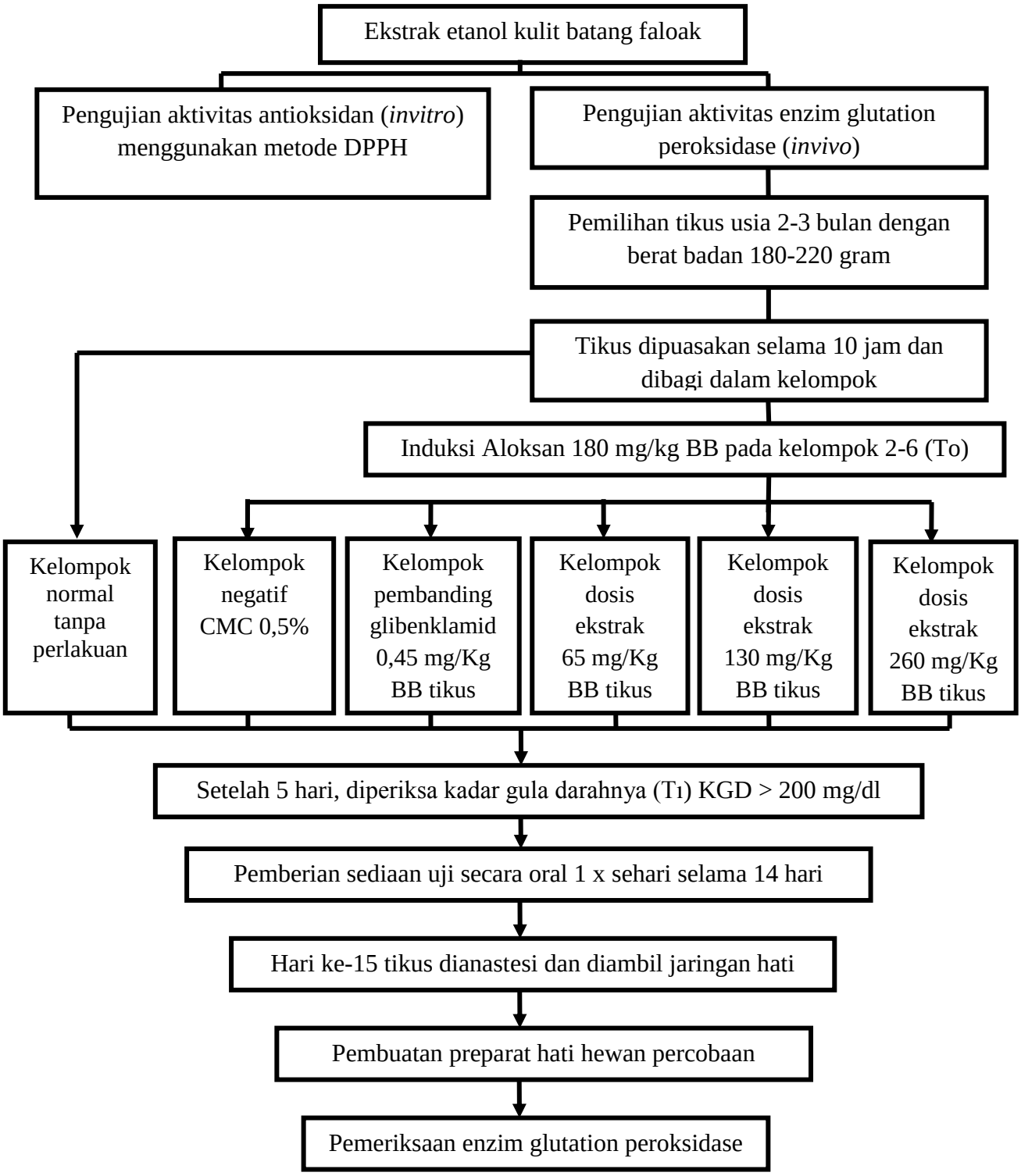
1000 = perubahan menjadi mili unit

Vs = volume sampel

E. Analisa Statistik

Analisa statistik yang pertama digunakan dalam penelitian ini adalah untuk melihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak yaitu dengan menggunakan uji distribusi normal (*Saphiro Wilk*). Jika data terdistribusi normal ($p>0,05$), analisis data dilanjutkan dengan uji parametrik (*One Way ANOVA*) untuk mengetahui perbedaan yang nyata diantara perlakuan. Jika hasil uji *One Way ANOVA* dan uji *Lavene Statistic* menunjukkan hasil normal ($p>0,05$), selanjutnya dilakukan uji *Post Hoc* untuk melihat aktivitas glutation peroksidase yang efektif diantara kelompok perlakuan. Namun, jika hasilnya data tidak homogen ($p< 0,05$), maka dilakukan uji non parametrik menggunakan uji *Mann-Whitney.*

F. Skema Penelitian



BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi Kulit Batang Faloak

Determinasi tanaman adalah suatu teknik untuk melihat kecocokan suatu tanaman berdasarkan ciri morfologi tanaman tersebut. Determinasi tanaman faloak dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang diambil, untuk menghindari kesalahan dalam mengumpulkan bahan serta kemungkinan tercampur dengan bahan tumbuhan lain. Determinasi ini dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Hasil determinasi menyatakan bahwa tanaman yang dipakai adalah kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br.). Hasil determinasi tanaman dapat dilihat pada Lampiran 2.

B. Pembuatan Serbuk Kulit Batang Faloak

Kulit batang faloak dalam penelitian ini diperoleh dari Kupang, Nusa Tenggara Timur pada bulan Januari 2017. Kulit batang faloak yang berwarna coklat tua dengan berat 4 Kg dibersihkan menggunakan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel dan setelah ditimbang kembali berat kulit batang faloak menjadi 3,6 Kg. Untuk memperkecil ukuran maka kulit batang faloak dipotong kecil-kecil sehingga mempercepat proses pengeringan. Selanjutnya kulit batang faloak dikeringkan dalam oven dengan suhu 50ºC selama 4 hari. Pengeringan dimaksudkan untuk mengurangi kadar air sehingga mencegah timbulnya jamur yang dapat menyebabkan terjadinya perubahan kimia dan dapat menurunkan mutu dan khasiat dari kulit batang faloak. Setelah melalui proses pengeringan dengan oven didapatkan berat kering sebesar 1,8 Kg. Kulit batang faloak yang telah kering dibuat serbuk dengan menggunakan alat penggiling. Selanjutnya serbuk diayak dengan pengayak no. 40 untuk memperoleh serbuk yang halus. Simplisia dibuat menjadi serbuk untuk

memperluas permukaan partikel simplisia yang kontak dengan pelarut sehingga penyaringan dapat berlangsung efektif.

Penentuan persentase berat kering terhadap berat basah dilakukan dengan cara menimbang kulit batang faloak yang masih basah, kemudian hasilnya dibandingkan dengan berat kulit batang faloak yang sudah kering. Hasil persentase berat kering terhadap berat basah kulit batang faloak dapat dilihat pada Tabel 2 di bawah ini.

Tabel 2. Rendemen pengeringan kulit batang faloak

Simplisia	Berat basah (Kg)	Berat kering (Kg)	Rendemen (%)
Kulit batang faloak	3,6	1,8	50

Kulit batang faloak sebanyak 3,6 Kg dikeringkan dan setelah dikeringkan beratnya menjadi 1,8 Kg sehingga persentase berat kering terhadap berat basah adalah 50%. Hasil perhitungan % rendemen dapat dilihat pada Lampiran 4.

C. Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Batang Faloak

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi dan menggunakan pelarut yang mampu untuk menyari sebagian besar metabolit sekunder yang terkandung dalam serbuk simplisia yang tidak dinyatakan lain dengan etanol 70% (Kemenkes 2013). Metode maserasi memiliki keuntungan yaitu menggunakan alat yang sederhana dan biaya yang dibutuhkan murah. Etanol 70% merupakan pelarut yang dapat menyari senyawa dari simplisia secara optimal dimana bahan pengotor hanya dalam skala kecil atau larut dalam cairan pengekstraksi (Voight 1995). Selain itu etanol 70% tidak beracun, netral, absorbsi baik, sulit ditumbuhi bakteri dan jamur, dan panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit (Depkes 1986).

Karakteristik ekstrak kulit batang faloak yang diperoleh dari hasil maserasi dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Karakteristik ekstrak etanol kulit batang faloak

Bentuk	Warna	Bau	Rasa
Kulit batang faloak	Coklat	Khas	pahit

Ekstrak kental tersebut kemudian ditimbang untuk selanjutnya dihitung % rendemen ekstrak etanol kulit batang faloak. Hasil perhitungan dapat dilihat pada Tabel 4 di bawah ini.

Tabel 4. Rendemen ekstrak etanol kulit batang faloak

Berat serbuk (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
500	67,68	13,54

Ekstrak kental yang didapat dari 500 gram serbuk kulit batang faloak sebesar 67,68 gram dan diperoleh rendemen ekstrak sebesar 13,54 %. Hasil perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 5.

D. Penetapan Kadar Air Serbuk Kulit Batang Faloak

Serbuk kulit batang faloak yang diperoleh dilakukan penetapan kadar air dengan cara destilasi menggunakan rangkaian alat *Sterling-BidwellI*. Penetapan kadar air serbuk bertujuan agar mutu dan khasiat serbuk kulit batang faloak tetap terjaga. Persyaratan kadar air suatu serbuk simplisia yaitu kurang dari 10% (Anonim 1986). Pelarut yang digunakan yaitu xylen karena xylen memiliki titik didih yang lebih tinggi dan berat jenis yang lebih kecil dibandingkan air selain itu xylen tidak bercampur dengan air. Hasil penetapan kadar air serbuk kulit batang faloak dapat dilihat pada Tabel 5 di bawah ini.

Tabel 5. Penetapan kadar air serbuk kulit batang faloak

Berat serbuk (g)	Volume terbaca (mL)	Kadar air (%)
20	1,8	9
20	1,9	9,5
20	1,8	9
	Rata-rata	9,16

Penetapan kadar air serbuk kulit batang faloak dilakukan dengan tiga kali replikasi dan kadar air serbuk kulit batang faloak yang telah ditetapkan yaitu sebesar 9,16%, hasil tersebut telah memenuhi syarat yaitu tidak lebih dari 10%, sehingga dalam penyimpanan tidak mudah untuk ditumbuhi mikroba. Perhitungan penetapan kadar air dapat dilihat pada Lampiran 6.

E. Identifikasi Kandungan Kimia Kulit Batang Faloak

Setelah didapatkan ekstrak kental kulit batang faloak, maka hasil ekstrak tersebut diperiksa kandungan kimianya menggunakan reaksi warna. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol kulit batang faloak dilakukan untuk mengetahui kebenaran kandungan kimia yang terdapat dalam kulit batang faloak.

Tabel 6. Identifikasi reaksi kimia ekstrak kulit batang faloak

Kandungan	Prosedur	Hasil	Pustaka	Kesimpulan
Flavonoid	Ekstrak ditambah serbuk Mg secukupnya, 1 mL HCl dan 2 mL amil alkohol	Merah jingga pada lapisan amil alkohol	Merah jingga atau kuning jingga pada lapisan amil alkohol	Positif
Steroid	Ekstrak ditambah Liebermann Bourchard	Cincin kecoklatan	Cincin biru kehijauan	Negatif
Terpenoid	Ekstrak ditambah Liebermann Bourchard	Cincin kecoklatan	Cincin kecoklatan	Positif
Saponin	Ekstrak ditambah 10 mL air suling panas dan didinginkan lalu dikocok	Buih dengan tinggi 1-10 cm dan tidak hilang selama 10 menit	Buih dengan tinggi 1-10 cm dan tidak hilang selama 10 menit	Positif
Tanin	Ekstrak ditambah ditambah besi (III) klorida	Terbentuk warna hijau violet	Terbentuk warna hijau violet	Positif
Alkaloid	Ekstrak ditambah 1,5 mL HCL dan reagen Dragendroff	Terbentuk kekeruhan atau endapan coklat	Terbentuk kekeruhan atau endapan coklat	Positif

Dapat dilihat pada Tabel 6 di atas, diketahui ekstrak etanol kulit batang faloak mengandung senyawa flavonoid, terpenoid, saponin, tanin, dan alkaloid. Hasil identifikasi senyawa dapat dilihat pada Lampiran 8.

F. Uji Bebas Alkohol Ekstrak Etanol Kulit Batang Faloak

Ekstrak dari kulit batang faloak dilakukan uji tes bebas etanol dengan melakukan esterifikasi etanol. Uji positif bebas etanol jika tidak menghasilkan bau ester yang khas dari etanol. Hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 7 dan Lampiran 7.

Tabel 7. Hasil uji bebas alkohol pada ekstrak kulit batang faloak

Simplisia	Tes bebas etanol	Hasil uji
Ekstrak kental kulit batang faloak	Ekstrak + H_2SO_4 pekat + CH_3COOH, dipanaskan	Tidak tercium bau ester yang khas

G. Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap Radikal Bebas DPPH

1. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum

Sebelum dilakukan pengujian aktivitas antioksidan sampel ekstrak etanol kulit batang faloak dan rutin sebagai pembanding, terlebih dahulu dilakukan pengukuran panjang gelombang radikal bebas DPPH. Panjang gelombang yang digunakan untuk pengukuran adalah panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang yang memiliki absorbansi yang paling tinggi. Pemilihan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk meminimalkan kesalahan pada saat pengukuran sehingga data yang didapat akurat, selain itu pada panjang gelombang maksimum dapat meningkatkan kepekaan pengukuran karena pada panjang gelombang maksimum tersebut, perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi adalah yang paling besar (Gandjar 2010). Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH adalah 517 nm dengan absorbansi 0,870. Hasil penetapan panjang gelombang maksimum DPPH dapat dilihat pada Lampiran 12.

2. Penetapan Operating time

Penentuan *operating time* digunakan untuk menentukan kestabilan absorbansi senyawa DPPH setelah direaksikan dengan senyawa uji. Dari hasil pengukuran *operating time* ekstrak kulit batang faloak waktu stabil dimulai dari menit ke-24 sampai menit ke-30. *Operating time* rutin dimulai dari menit ke-25 sampai menit ke-30. Sehingga penelitian ini menggunakan waktu menit 30 untuk *operating time* (Sagar B 2011). Hasil penentuan *operating time* dapat dilihat pada Lampiran 13.

3. Hasil pengujian aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH

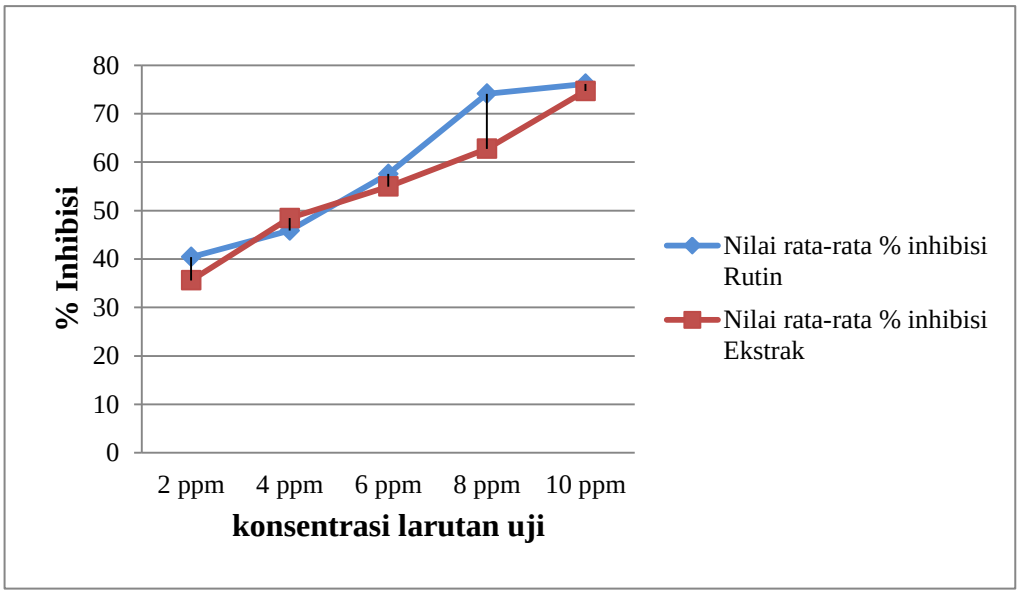
Pengujian persen peredaman larutan uji (ekstrak etanol kulit batang faloak) dilakukan dengan metode DPPH. Pengujian dilakukan 3 kali replikasi.

Rutin digunakan sebagai pembanding dalam pengujian ini karena rutin merupakan glikosida flavonoid yang sudah terbukti memiliki aktivitas antioksidan.

Penambahan larutan uji yang mengandung senyawa aktif yang mampu meredam radikal bebas akan menurunkan konsentrasi DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl*), diikuti dengan menurunnya serapan dari DPPH karena senyawa aktif dalam larutan uji memberikan atom hidrogen kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazin*) dengan ditandai perubahan warna violet larutan DPPH menjadi warna kuning. Proses perubahan warna yang terjadi pada DPPH karena ikatan rangkap terkonjugasi pada DPPH berkurang.

Tabel 8. Konsentrasi larutan uji terhadap nilai rata-rata % inhibisi

Konsentrasi larutan uji	2 ppm	4 ppm	6 ppm	8 ppm	10 ppm
Nilai rata-rata % inhibisi rutin±SD	40,42±0,07	45,86±0	57,55±0,07	74,10±0,07	76,17±0,07
Nilai rata-rata % inhibisi ekstrak±SD	35,59±0,07	48,43±0,07	54,94±0	62,76±0	74,67±0,07



Gambar 12. Konsentrasi larutan uji terhadap nilai rata-rata % inhibisi

Pengukuran nilai absorbansi peredaman radikal bebas DPPH dilakukan terhadap ekstrak etanol kulit batang faloak dan rutin sebagai pembanding yang dibuat dengan beberapa seri konsentrasi, setelah mereaksikan larutan uji dengan

DPPH dan didiamkan selama 30 menit sehingga terjadi reaksi yang stabil antara senyawa aktif dengan DPPH. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm sesuai dengan hasil yang diperoleh dari pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH.

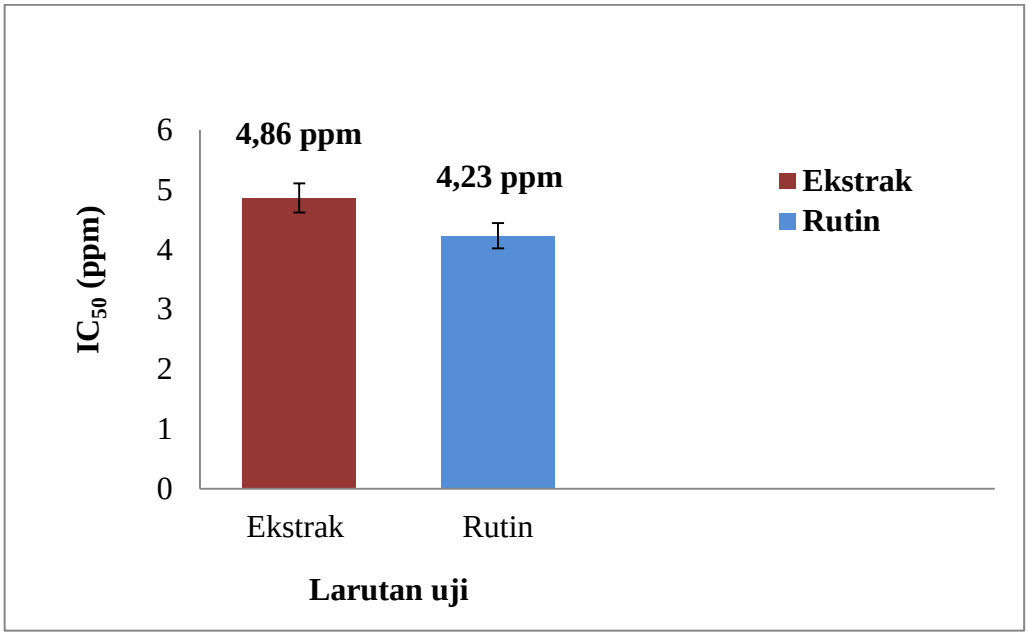
Setelah diperoleh data % peredaman dari semua seri konsentrasi larutan uji, data selanjutnya dianalisis probit dan hitung nilai IC_{50} dengan persamaan regresi linier berdasarkan rumus Y = a + bx. Semakin kecil harga IC_{50} maka semakin efektif sebagai antioksidan. Aktivitas peredaman radikal bebas biasanya dinyatakan sebagai persen peredaman dari DPPH yang dinyatakan sebagai konsentrasi yang menyebabkan hilangnya 50% aktivitas DPPH (IC_{50}).

Dari hasil perhitungan regresi linier antara seri konsentrasi larutan rutin dengan % inhibisinya diperoleh nilai r yang kurang bagus yaitu 0,97. Hal tersebut terjadi karena tidak teliti dalam memipet volume larutan rutin (seri konsentrasi 8 ppm) sehingga diperoleh nilai % inhibisi yang terlalu tinggi untuk seri konsentrasi 8 ppm, menyebabkan data yang diperoleh kurang linier. Untuk mendapatkan nilai r yang bagus (mendekati 1), maka konsentrasi 8 ppm dihilangkan ketika melakukan regresi linear antara seri konsentrasi larutan rutin terhadap % inhibisinya dan diperoleh nilai r yang lebih bagus yaitu sebesar 0,99. Dalam melakukan penenitian ini sangat diperlukan ketelitian dalam memipet volume larutan uji sehingga diperoleh data yang linier. Menurut Kurniawan (2008) data yang linier adalah data yang memiliki hubungan yang erat antara variabel terikat (% inhibisi) dengan variabel bebas (seri konsentrasi larutan uji) yang dinyatakan dengan nilai r dari regresi linier.

Nilai IC_{50} ekstrak etanol kulit batang faloak adalah 4,86 ppm dan nilai IC_{50} rutin adalah 4,23 ppm. Rutin telah banyak digunakan sebagai pembanding dalam pengujian aktivitas antioksidan secara *in vitro* karena senyawa ini merupakan antioksidan dari golongan flavonoid yang cukup efektif dalam meredam aksi destruktif radikal bebas, dengan cara mendonorkan atom hidrogen pada radikal bebas sehingga radikal bebas tersebut menjadi stabil. Aktivitas antioksidan rutin mampu mencegah kerusakan oksidatif dan kematian sel (Susilowati 2010).

Ekstrak etanol kulit batang faloak memiliki nilai IC_{50} yang bagus yaitu kurang dari 50 ppm (antioksidan kuat) karena mengandung senyawa flavonoid dan fenolik yang mampu untuk melindungi tubuh dari serangan radikal bebas (Siswandi *et al.* 2013). Flavonoid berperan dalam mencegah terjadinya komplikasi pada penderita diabetes mellitus dilihat dari adanya aktivitas antioksidan dan hipoglikemik dari senyawa aktif golongan polifenol pada tanaman (Widiowati 2008). Polifenol mempunyai kemampuan untuk menghambat reaksi oksidasi dan menangkap radikal bebas (Burda dan Oleszek 2001).

Hasil uji statistik menggunakan *Independent sampels t-test* untuk membandingkan nilai rata-rata IC_{50} rutin dengan nilai rata-rata IC_{50} ekstrak menunjukkan kedua nilai tersebut berbeda secara signifikan ($p<0,05$). Hasil uji statistik dapat dilihat pada Lampiran 16.



Gambar 13. Aktivitas antioksidan larutan uji berdasarkan nilai IC_{50}

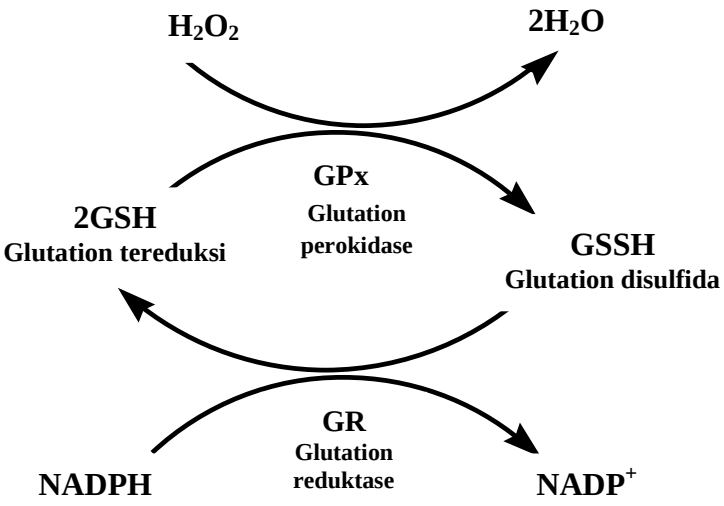
Secara spesifik, suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} < 50 ppm, aktif 50-100 ppm, sedang 101-250 ppm, lemah 250-500 ppm, dan tidak aktif > 500 ppm (Jun *et al*. 2003). Melihat nilai IC_{50} ekstrak etanol kulit batang faloak adalah 4,86 ppm, termasuk dalam antioksidan sangat kuat karena mengandung senyawa flavonoid dan fenolik yang mampu meredam

radikal bebas dan nilai IC_{50} rutin yang diperoleh adalah sebesar 4,23 ppm yang tergolong antioksidan sangat kuat. Hasil perhitungan nilai IC_{50} dapat dilihat pada Lampiran 14 dan 15.

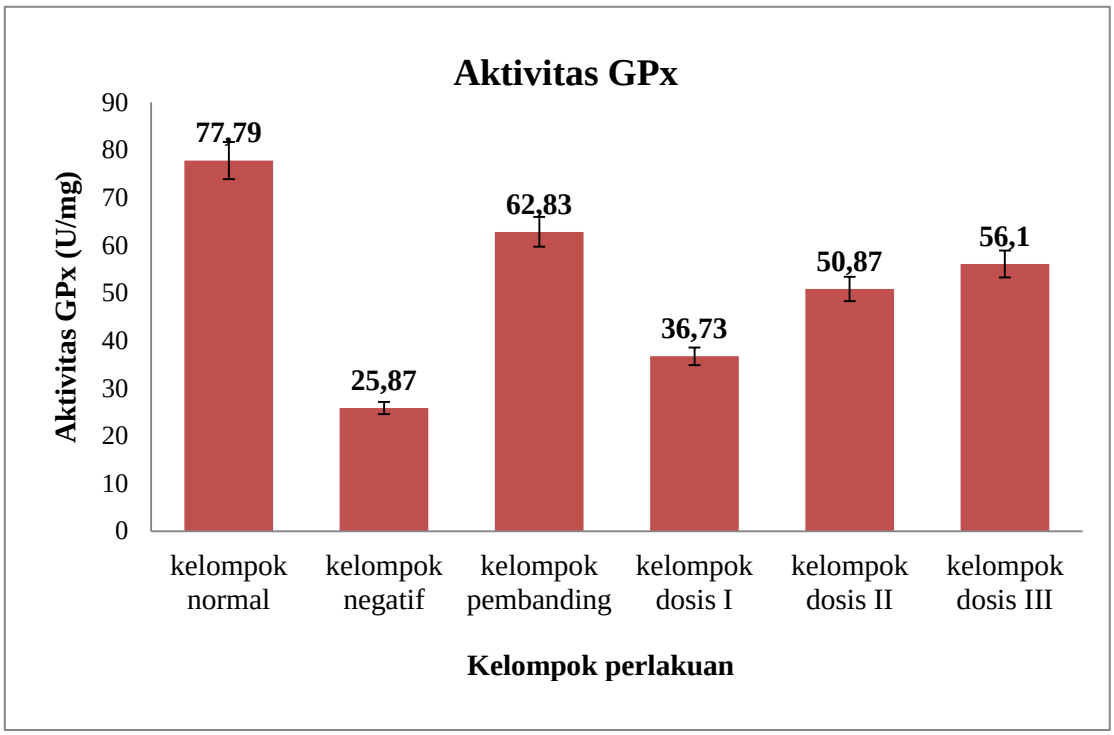
H. UJI AKTIVITAS TERHADAP ENZIM GPx

Ekstrak etanol kulit batang faloak dilakukan uji aktivitas terhadap enzim GPx secara *in vivo* dengan cara mengukur aktivitas enzim glutation peroksidase pada homogenat hati tikus, setelah diberi ekstrak etanol kulit batang faloak selama 14 hari dengan dosis sebesar 65, 130, dan 260 mg/Kg BB tikus.

GPx mengkatalisis reaksi perubahan GSH menjadi GSSH, sekaligus mengurangi jumlah hidrogen peroksida (H_2O_2) yang dirubah menjadi air (H_2O). H_2O_2 merupakan senyawa oksigen reaktif non radikal, tetapi mudah berubah menjadi radikal bebas (Droge 2007)



Dalam *Gluthation peroxidase activity assay*, GPx mereduksi *Cumene Hydroperoxide* saat terjadi oksidasi glutathion tereduksi (GSH) menjadi glutathion disulfide (GSSH). Selanjutnya GSSH yang dihasilkan direduksi menjadi GSH, reaksi tersebut dikatalisis oleh glutation reduktase (GR) dengan mengkonsumsi NADPH. Penurunan NADPH (biasanya diukur pada panjang gelombang 340 nm) sebanding dengan aktivitas GPx (Biovision 2012).



Gambar 14. Aktivitas GPx (U/mg) seluruh kelompok perlakuan

Kelompok	N	Aktivitas GPx (U/mg)±SD	% Kenaikan Aktivitas GPx
Kontrol normal	5	77,79±3,28	-
Kontrol negatif	5	25,87±1,07	-
Kontrol pembanding	5	62,83±1,44	58,82
Dosis ekstrak 65 mg/Kg BB tikus	5	36,7abc±0,66	29,57
Dosis ekstrak 130 mg/Kg BB tikus	5	50,87abc±1,90	49,14
Dosis ekstrak 260 mg/Kg BB tikus	5	56,10abc±0,94	53,89

Tabel 9. Analisa perbedaan signifikasi kelompok variasi dosis ekstrak terhadap kelompok kontrol

Keterangan :
a : berbeda signifikan terhadap kelompok kontrol normal
b : berbeda signifikan terhadap kelompok kontrol negatif
c : berbeda signifikan terhadap kelompok kontrol pembanding

Pada kelompok normal hasil rata-rata pengukuran aktivitas GPx menunjukkan nilai yang tertinggi yaitu 77,79 U/mg. Hal tersebut disebabkan karena pada kondisi normal berbagai organ tubuh mampu bekerja dengan baik, termasuk organ hati yang memiliki mekanisme sistem pertahanan alami berupa enzim antioksidan intrasel yaitu GPx yang berfungsi menetralkan dan

mempercepat degradasi senyawa radikal bebas untuk mencegah kerusakan komponen makromolekul sel (Setiawan dan Suhartono 2005). Pada keadaan fisiologis, *Reactive Oxygen Species* (ROS) membantu menjaga homeostasis (Robertson 2004). Pada kondisi normal terjadi keseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan endogen sehingga tidak terjadi peroksidasi lipid yang merupakan proses perusakan oksidasi asam lipid tidak jenuh rantai panjang (*polyunsaturated fatty acids*) pada membran sel (Yustika 2013).

Kelompok kontrol negatif menunjukkan aktivitas GPx yang paling rendah yaitu 25,87 U/mg dan berbeda secara signifikan ($p<0,05$) jika dibandingkan dengan kelompok normal, kelompok pembanding, dan kelompok variasi dosis ekstrak. Hal tersebut disebabkan karena kelompok kontrol negatif selama 14 hari hanya diberikan pembawa CMC 0,5% dan kondisi hiperglikemia akibat induksi aloksan. Aloksan sebagai agen radikal bebas yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada pankreas tikus. Kondisi hiperglikemia menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein, dan aktivasi jalur metabolisme poliol yang selanjutnya mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif yang dapat menyebabkan modifikasi molekuler berbagai jaringan, hal ini merupakan awal kerusakan oksidatif karena terjadi ketidakseimbangan antara antioksidan protektif dan peningkatan produksi radikal bebas. Radikal bebas yang dihasilkan tidak mampu dinetralkan oleh antioksidan endogen yaitu GPx. Kelompok kontrol negatif pada penelitian ini digunakan sebagai penanda kerusakan oksidatif akibat radikal bebas. Kerusakan oksidatif pada kelompok ini dapat dilihat dari penurunan aktivitas GPx jika dibandingkan dengan kelompok normal yang hanya diberi makan dan minum, karena pada kontrol normal tidak diinduksi dengan aloksan sehingga tidak terjadi proses kerusakan oksidatif (Monroy dan Mejia 2013).

Hasil pengukuran rata-rata aktivitas GPx pada kelompok kontrol pembanding yaitu 62,83 U/mg jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p<0,05$) berdasarkan analisis statistik. Hal tersebut disebabkan karena kelompok kontrol pembanding diberikan glibenklamid. Glibenklamid merupakan obat antidiabetes golongan sulfonilurea (SU) yang mampu untuk meningkatkan sekresi insulin oleh sel-sel β pulau

Langerhans pankreas. Glibenklamid akan berikatan dengan reseptor SUR yang terkait dengan kanal K (*ATP-dependent potassium channel*) menyebabkan penutupan kanal K_{ATP}. Tertutupnya kanal K_{ATP} menyebabkan depolarisasi karena K^+ tidak dapat masuk ke dalam sel sehingga memicu terbukanya kanal Ca^{2+} (*Calsium dependent voltage channel*) yang memungkinkan kenaikan Ca^{2+} intraseluler dan memicu pelepasan insulin (Ikawati 2008). Peningkatan sekresi insulin dari sel-sel β pulau Langerhans pankreas menyebabkan *intake* glukosa darah sehingga kadar glukosa darah menjadi turun dan tidak terjadi hiperglikemia yang berperan dalam reaksi berantai pembentukan radikal bebas (DiPiro 2008).

Hasil pengukuran rata-rata aktivitas GPx pada kelompok yang diberikan ekstrak etanol kulit batang faloak dengan dosis 65, 130, dan 260 mg/Kg BB tikus yaitu sebesar 36,73 U/mg ; 50,87 U/mg dan 56,10 U/mg jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p<0,05$). Hasil ini membuktikan bahwa ekstrak etanol kulit batang faloak memiliki kemampuan untuk meningkatkan aktivitas GPx dan menghentikan reaksi berantai pembentukan radikal bebas karena ekstrak tersebut mengandung senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dan antidiabetes.

Jika kelompok uji dengan dosis pemberian yang tertinggi (260 mg/Kg BB tikus) dibandingkan dengan kelompok yang diberikan glibenklamid menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan ($p<0,05$), hal ini terjadi karena glibenklamid yang digunakan dalam penelitian ini adalah glibenklamid murni yang mampu untuk meningkatkan aktivitas antioksidan endogen yaitu enzim GPx, SOD dan katalase dengan mekanisme menyebabkan homeostasis pada pankreas berjalan baik sehingga antioksidan endogen dapat bekerja menetralisir atau menangkap radikal bebas (Shakya *et al*. 2012).

Ektrak etanol kulit batang faloak tergolong sebagai antioksidan kuat karena nilai IC_{50} sebesar 4,86 ppm. Hasil ini membuktikan bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit batang faloak terutama flavonoid dan fenolik dapat menangkal radikal bebas. Kondisi hiperglikemia yang terjadi pada penderita diabetes mellitus dapat menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein, dan aktivasi jalur poliol-sorbitol yang selanjutnya mempercepat

pembentukan ROS (Ueno *et al*. 2002). Terbentuknya ROS tersebut menyebabkan stess oksidatif yang berperan dalam memicu terjadinya komplikasi pada penderita diabetes mellitus. Senyawa flavonoid dan fenolik dapat menurunkan jumlah ROS dengan cara memberikan atom hidrogennya sehingga flavonoid akan teroksidasi dan radikal bebas menjadi senyawa yang lebih stabil (Panjuantiningrum 2010).

Tubuh manusia dapat menghasilkan senyawa antioksidan endogen seperti SOD (*Superoxide Dismutase*), GPx (*Glutation peroxidase*) dan *catalase* yang berperan dalam melindungi tubuh dari serangan radikal bebas. Namun jumlah antioksidan endogen tersebut terbatas dengan adanya senyawa flavonoid, terpenoid, saponin, tanin dan alkaloid yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit batang faloak mampu meningkatkan aktivitas GPx karena senyawa-senyawa tersebut berperan sebagai antioksidan dan antidiabetes dimana dapat membantu penyembuhan diabetes dengan meningkatkan ketersediaan enzim antioksidan di dalam tubuh.

Flavonoid dapat menghambat aldose reduktase yang berperan dalam mengkatalisis reaksi perubahan glukosa dan galaktosa menjadi bentuk-bentuk poliolnya. Poliol-poliol tersebut berimplikasi dalam diabetes neuropati, katarak dan galaktosemia (Linder 2006). Flavonoid dapat mencegah reaksi oksidasi salah satunya adalah reaksi glikosilasi yang selanjutnya akan menghasilkan *advanced glycation end products* (AGEs) dan senyawa dikarbonil. Ikatan AGEs dengan reseptor AGEs (RAGE) memicu timbulnya ROS (Sundoyo *et al*. 2006).

Terpenoid dapat menstimulus sel β pankreas sehingga mampu untuk meningkatkan sekresi insulin (Tende *et al*. 2011)

Saponin dapat berfungsi sebagai antidiabetes dibuktikan oleh penelitian yang dilakukan oleh Firdous *et al*. (2009) terhadap histopatologi pankreas, diketahui bahwa saponin mampu meregenerasi pankreas yang menyebabkan adanya peningkatan jumlah sel-sel β pulau Langerhans pankreas sehingga sekresi insulin meningkat. Peningkatan sekresi insulin tersebut membantu menurunkan kadar glukosa darah.

Tanin memiliki aktivitas dalam menurunkan kadar glukosa darah yaitu dengan meningkatkan glikogenesis. Selain itu, tanin juga berfungsi sebagai

adstringen atau pengkelat yang dapat mengkerutkan membran epitel usus halus sehingga mengurangi penyerapan sari makanan dan menghambat asupan gula sehingga laju peningkatan gula darah tidak terlalu tinggi (Meidiana dan Widjanarko 2014).

Alkaloid mampu menghambat aktivitas enzim alfa glukosidase dan terbukti mempunyai kemampuan regenerasi sel β pankreas yang rusak (Arjadi dan Susatyo 2010).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa :

Pertama, ekstrak etanol kulit batang faloak memiliki aktivitas antioksidan dalam menangkal radikal bebas DPPH dengan nilai IC_{50} 4,86 ppm.

Kedua, ekstrak etanol kulit batang faloak mampu meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase pada tikus yang diinduksi aloksan.

Ketiga, dosis ekstrak etanol kulit batang faloak yang paling kuat dalam meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase adalah dosis 260 mg/kg BB tikus.

B. Saran

Saran untuk penelitian ini adalah

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat senyawa apa saja yang terkandung dalam kulit batang faloak yang mampu menghambat radikal bebas DPPH dan meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase.

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan metode dan parameter yang lain terkait efek antioksidan pada ekstrak etanol kulit batang faloak.

DAFTAR PUSTAKA

Ahmad Sjamsul. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam*. Jakarta: Karunika Jakarta Universitas Terbuka.

Andayani Y. 2003. Mekanisme aktivitas antihiperglikemik ekstrak buncis (Phaseolus vulgaris Linn.) pada tikus diabetes dan identifikasi komponen aktif [Skripsi]. Bogor: Institut pertanian Bogor. Hlm 20-82.

Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW. 1999. The myeloperokidase of human phagocytes generates *N*-carboxymethyl lysine on proteins: a mechanism for producing advance glycation end products at sites of inflammation. *J Clin Invest* 104(1):103-13.

Anin. 2014. Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol klika faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) dengan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) [Skripsi]. Makasar: Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makasar.

Anindhita. 2009. Efek aloksan terhadap kadar glukosa darah tikus wistar [Skripsi]. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

Anonim. 1993. *Pedoman Pengujian dan Pengembangan Fitofarmaka, Penapisan Farmakologi dan Pengujian Klinik*. Jakarta: Yayasan Pengembangan Obat Bahan Alam Phyto Medica.

Anonim. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Depertemen Kesehatan Republik Indonesia.

Anonim. 2008. *MIMS Petunjuk Konsultasi*. Jakarta: PT. Info Master Lisensi.

Ansel HC. 1989. *Penghantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Edisi ke-4. Jakarta: Indonesia University Press.

Antolovich, Michael, Paul DP, Emilios P, Suzanne MD, Kevin R. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 172:183-198.

Arjadi F, P. Susatyo. 2010. Regenerasi sel pulau Langerhans pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) diabetes yang diberi rebusan daging mahkota dewa (*Phaleria macrocarp*(Scheff.)Boerl.)2(2).

Atta *et al.* 2001. Bioactive natural product a potential pharmacopores, a theory of memory, pure appl. *Chem* 73: 555-560

Beckett AH, Kalsi VS, 2003. *Compelling need for suplementation: how specific nutrients help retard the complication of diabetes melitus.* Disampaikan dalam Symposium "Compeling Need For Nutrient Therapy in The Treatment of Diabetes Mellitus and The Associated Complication", Surabaya, 8 February, 2003.

Beckman Ja, Goldfine AB, Gordon MB, Creager MA. 2001. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilatation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation* 103:1618-23.

BioVision. 2012. Glutathione Peroxidase Activity Assay Kit. [Catalog #K762-100]. http://www.biovision.com [Juli 2012].

Burda S, Oleszek W. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2774-2779.

Carr A, Frei B. 1999. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C base antioxidant and healt effects in humans. *Am J Clin Nutr* 69:1086-107.

Chen CY, Holtzman GI, Bakhit RM, 2002. High-genistin isoflavone supplementation modulate erythrocyte antioxidant enzymes and increased running endurance in rats undergoing one session of exhausting exercise-a pilot study. *Pakistan journal of nutrition* 1(1):1-7.

Corwin Ej. 2009. *Buku Saku Patofisiologi*. Edisi Revisi ke-3. Subekti NB, Penerjemah; Jakarta: ECG. Terjemahan dari: *Handbook of Pathophysiology.*

Dalimartha S. 2008. *1001 Resep Herbal*. Jakarta: Penebar Swadaya.

Departemen Kesehatan. 1979. *Farmakope Indonesia.* Edisi ke-3. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia

Departemen Kesehatan. 1986. *Sediaan Galenik.* Edisi ke-3. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Departemen Kesehatan. 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi ke-4. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Departemen Kesehatan. 2009. *Pedoman Pengendalian Tikus Khusus di Rumah Sakit*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM. 2008. *Pharmacotherapy: A Phatophysiologic Approach*. Seventh Edition. McGraw-Hill. New York.

Draelos. 2010. *Cosmetic Dermatology Products & Procedures*. United Kingdom: Willey-Backwell.

Droge W. 2007. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physial Rev* 82:47-95.

Firdous M, Koneri R, Sarvaraidu CH, Shubhapriya KH. 2009. Antidiabetic Activity of Saponin of Momordica Cymbalaria In Streptozotosin-Nicotinamide NIDDN Mice. Journal Of Clinical and Diagnosis Research 3: 1460-1465.

Gandjar, Ibnu G, Abdul R. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

Gunawan D, Mulyani S. 2004. *Ilmu obat alam (Farmakognosi)*. Jilid pertama. Yogyakarta: Penebar Swadaya.

Gunawan D, Mulyani S. 2007. *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi)*. Jilid Pertama. Jakarta: Penebar Swadaya.

Haffner SM. 1999. The importance of hyperglycemia in the non fasting state to the development cardiovascular state. *Endocrine Review* 19(5):583-92.

Halliwel B, Gutteridge JMC. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine.* New York: Oxford University Press.

Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terbitan ke-2. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah; Bandung: Institut Teknologi Bandung. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods*.

Harborne JB. 2006. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan.* Kosasih P, Iwang S, penerjemah; Bandung: Institut Teknologi Bandung.

Heinrich M, Barnes J, Gibbons S, Williamson E. 2009. *Farmakognosi dan Fitoterapi*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran. Hlm 85.

Hernani dan Rahardjo. 2005. *Tanaman Berkhasiat Antioksidan*. Jakarta : Penebar Swadana.

Herowati R. 2005. Aktivitas antiinflamsi rutin dan kuersetin setelah pemakaian per oral terhadap radang kaki tikus yang diinduksi karagen. *Jurnal Farmasi Indonesia* 2:35-37.

Ikawati Z. 2008. *Pengantar Farmakologi Molekuler*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Jun *et al.* 2003. Camparison of antioxidant activities of isoflavones form kudzu root (*Puerarua labata* O). *Journal Food Science Institute of Technologist* 68:2117-2122.

Kemenkes.2013. *Farmakope Herbal Indonesia*.Suplemen III. Edisi 1. Jakarta: Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.

Ketaren S. 1986. *Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan*. Jakarta: UI Press. Hlm 125.

Khlifi S, Hachmini Y, Khalil A, Safi N, Abbouyi A. 2005. In vitro antioxidant effect of Globularia alypum L. Hy dromethanolic extract. *Indian J Pharmacol* 37(4):227-231.

Khomsan A. 2009. *Rahasia Sehat dengan Makanan Berkhasiat*. Jakarta: Kompas Media Nusantara.

Kowluru RA, Tang J, Kern TS. 2001. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experiment galactosemia. *Diabetes* 50:1938-42.

Kurniawan D. 2008. Regresi linier. http://ineddeni.wordpress.com

Lawrence dan Burk. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. Biochem Biophys Res Commun 71:952-958.

Linder MC. 2006. *Biokimia Nutrisi dan Metabolisme*. UI Press. Jakarta: 265-278.

Meidiana Okky, Widjanarko SB. 2014. Uji efek ekstrak air daun pandan wangi terhadap penurunan kadar glukosa darah dan histopatologi tikus diabetes mellitus. *Jurnal Pangan dan Argoindustri* 2:16-27.

Monroy ML, Mejia CF. 2013. Oxidative stress in Diabetes Melitus and the role of vitamins with antioxidant actions. *Mexico Ntech*, 9;210-215.

Moron UM, Cortazar IC. 2012. Protection against oxidative stress and "IGF-I deficiency conditions". *Intech* 1:89-116.

Mukhriani. 2014. Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal Kesehatan 7(2)*.

Mustarichie R, Musfiroh I, Levita J. 2011. *Metode Penelitian Tanaman Obat*. Bandung: Widya Padjajaran. Hlm 8-17.

Nabyl. 2012. *Panduan Hidup Sehat Mencegah dan Mengatasi Diabetes Mellitus*. Yogyakarta: Aulia Publishing.

Narayanaswamy N, Duraisamy A. 2011. Tyrosinase inhibition and anti-oxidant properties of *Muntingia calabura* extracts: in vitro studies. *International journal of pharma and bio sciences* 2.

Nishimura CY. 1998. Aldose reductase in glucose toxicity: A potential targets for the prevention of diabetic complications. *Pharmacological reviews* 50(1):21-33.

Niwa T, Katsuzaki T, Miyazaki S. 1997. Immunohistochemical detection of imidazolone, a novel advance glycation end product, in kidney and aortas of diabetic patients. *J Clin Invest* 99(6):1272-80.

Nugroho AE. 2012. *Farmakologi Obat-obat Penting dalam Pembelajaran Ilmu Farmasi & Dunia Kesehatan*. Yogyakarta: Pustaka pelajar. Hlm 146-152.

Nuttal SL, Dunne F, Kendal MJ, Martin U. 1999. Age-independent oxidative stress in elderly patiens with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Q J Med* 92:33-8.

Oberley LW. 1988. Free radicals and biabetes. *Free Radic Biol Med* 5(2): 113-24.

Oldfield MD, Bach LA, Forbes JM. 2001. Advance glycation end products cause epithelial-myofibrobalst transdifferentiation via the receptor for advance glycation end products (RAGE). *J Clin Invest* 108:1853-63.

Panjuantiningrum F. 2011. Pengaruh pemberian buah naga merah (H. Polyrhizus) terhadap kadar glukosa darah tikus putih yang diinduksi aloksan [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.

Parkeni. 2011. *Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Mellitus Tipe 2 di Indonesia.* Jakarta: Parkeni.

Porth CM, Matfin G. 2009. Pathophysiology: Concepts of Altered Health States. 8th edition.

Rahbani-Nobar ME, Rahimi-Pour A, Adi-Beig F, Mirhashemi SM. 1999. Total antioxidant capacity, superoxide dismute and glutathione peroxidase in diabetic patients. *Medical journal of Islamic Academy of Sciences* 12(4):109-14.

Ranta F. 2011. Aktivitas antimokroba zat ekstraktif pohon faloak (*Sterculia comosa* Wallich) [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Redha A. 2010. Flavonoid: struktur, sifat antioksidatif dan peranannya dalam sistem biologis. *Jurnal Belian* 9:196-202.

Robbins, Vinay K, Ramzi S, Cotran, Stanley. 2007. *Buku Ajar Patologi* Edisi 7. Jakarta: EGC Hlm 723-725.

Robertson RP, 2004. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic beta cells in diabetic. *The Journal of Biological Chemistry* 279:42351-42354.

Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi IV. Bandung: Institut Teknologi Bandung. Hlm 281.

Rohrdanz E, Sandra O, Quynh-Hoa T, Regine K. 2002. The phytoestrogen daidzein effects the antioxidant enzyme system rat hepatoma H4HE cells *Journal of Nutrition* 132: 370-375.

Russell-Smith *et al.* 2007. Rural livelihoods and burning practices in savanna landscapes of Nusa Tenggara Timur, Eastern Indonesia. *Hum Ecol* 35: 345-359.

Sacher RA, Mc Pherson RA. 2004. *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium.* Jakarta: EGC. Hlm. 518-526.

Sagar B, Kedare S. 2011. *J Food Sci Technol* 48(4):412-422.

Sarker SD, Latif Z, Gray AI. 2006. *Natural Product Isolation.* Edisi ke-2. Humana Press. Hlm 30-32, 340-342.

Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy R, Biplab D. 2010. Free Radicals, Antioxidants, Diseases and Phytomedicines : Current Status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Rivew and Research* 3(1): 021.

Setiawan B, Suhartono E. 2005. Stres oksidatif dan peran antioksidan pada diabetes melitus. *Majalah kedokteran Indonesia* 55(2): 86-91.

Setyanto AMN. 2012. Formulasi sediaan krim antioksidan dari eksrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.

Shakya G, Goud C, Pajaniradje S, Rajagopalan R. 2012. Protective Role of Wheatgrass on Oxidative stress In Streptozotocin Induce Type 2 Diabetic Rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. ISSN- 0975-1491. Vol 4, Issue 3.

Shoda H, Miyata S, Liu HF. 1997. Inhibitory effect of tenilsetain on the Maillard reaction. *Endocrinology* 138(5):1886-92.

Simanjuntak D, Sudaryati E. 1998. Aspek pencegahan radikal bebas melalui antioksidan. *Majalah kedokteran Indonesia* 48(1):50-4.

Siswadi, Rianawati. 2013. Potential Distribution and Utilization of Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br 1844), *Proceeding International Confrence of Forest and Biodiversity Manado.* Editor : Langi. M, Manado Forestry Institute. Manado. Hlm 165.

Soegondo S. 2013. *Penatalaksanaan Diabetes Mellitus Terpadu*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Soesilowati S. 2003. Diabetic neuropathy: pathogenesis and treatment. *Acta Medica Indonesiana* 35(1):27-34.

Song Y *et al.* 2005. Association of dietary flavonoids with risks of type 2 diabetes and markers of insulin resistance and sistemic inflammation in women : a

prospective study and cross-sectional analysis. *Journal of the American college of nutrism* 24(5):376-384.

Suarsana I, Utama IH, Agung I, Suartini A. 2011. Pengaruh hiperglikemia dan vitamin E pada kadar malonaldehida dan enzim antioksidan Intrasel jaringan pankreas tikus. *MKB* 43(2).

Sudarmaji S, Haryono B, Suhardi. 2010. *Prosedur Analisis untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.

Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiadi S. 2006. *Buku Ajar Penyakit Dalam.* Jilid 3 Edisi IV. Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FKUI. Hlm 1852-1893.

Sukandar E Y, Andrayati R, Sigit JI, Adnyana IK, Setiadi AAP, Kusnandar. 2008. *ISO Farmakoterapi*. Jakarta: PT. ISFI Penerbitan. Hlm 26-36.

Sunarni T. 2005. Aktivitas antioksidan penagkap radikal daun kepel (*Stelechocarpus burahol* (BI.) Hook f. & Th.). *Jurnal Farmasi Indonesia* 2:14-15.

Sundoyo, Ari W. 2006. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Edisi IV Jilid II. Jakarta: Pusat Penerbit Departemen Ilmu Penyakit Dalam. FKUI.

Susilowati N. 2010. Aktivitas antioksidan fraksi-fraksi ekstrak metanolik daun seligi (Phyllanthus buxifolius. Muell, Arg) terhadap radikal bebas DPPH (*1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil*) [skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.

Tende JA, Ezekiel I, Dikko AAU, Goji ADT. 2011. Effect of ethanolic leaves extract of moringa oleifera on blood glucose levels of streptozotosin induced diabetics and normoglycemic wistar rats. *Br J Parm Toxicol* 2:1-4.

Tjay, Tan Hoan, Raharja, Kirana. (2002), *Obat-Obat Penting: Khasiat Penggunaan dan Efek-Efek Sampingnya*, Edisi Kelima, Cetakan Kedua, Penerbit PT. Alex Media Komputindo, Jakarta.

Ueno Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa T. 2002. Dietary gluthatione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *J Nutr* 132:897-900.

Voight R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Edisi ke-5. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.

Voight R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Edisi V. Soendani NS, penerjemah. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. Terjemahan dari Lehrburch der Pharmazeutishen Technology.Hlm 561-567

Widiowati W. 2008. Potensi antioksidan sebagai antidiabetes. *Jurnal Kedokteran Maranatha* 7(2).

Winarsi H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.

Windono *et al.* 2001. Uji perendaman radikal bebas terhadap 1,1 diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH) dari ekstrak kulit buah dan biji anggur (*Vitis vinifera* L.) Probolinggo Biru dan Bali. *Artocarpus* 1.

Youngson R. 2005. *Antioksidan Manfaat Vitamin C & E Bagi Kesehatan*. Jakarta: Arcan.

Yustika AR, Aulanni'am, Prasetyawan S. 2013. Kadar malondialdehid (MDA) dan gambaran histopatologi pada ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) pasca induksi Cylosporine-A. *Studentjournal* 1:222:228.

Lampiran 1. Foto tanaman faloak

Pohon faloak

Buah faloak

Daun faloak

Kulit batang faloak

Lampiran 2. Surat determinasi kulit batang faloak

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS SEBELAS MARET
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
LAB. PROGRAM STUDI BIOLOGI
Jl. Ir. Sutami 36A Kentingan Surakarta 57126 Telp. (0271) 663375 Fax (0271) 663375
http://www.biology.mipa.uns.ac.id, E-mail biologi @ mipa.uns.ac.id

Nomor : 201/UN27.9.6.4/Lab/2016
H a l : Hasil Determinasi Tumbuhan
Lampiran : -

Nama Pemesan : Rambu Konda Anggung Praing
NIM : 19133873A
Alamat : Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

HASIL DETERMINASI TUMBUHAN

Nama Sampel : *Sterculia quadrifida* R.Br.
Familia : Sterculiaceae

Hasil Determinasi menurut C.A. Backer & R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr. (1963, 1965) :
1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31a-32a-33a-34a-35a-36d-37b-38b-39b-41b-42b-44b-45b-46e-50a_____ **94. Sterculiaceae**
1a-2a_____ **15. *Sterculia***
1_____ ***Sterculia quadrifida* R.Br.**

Deskripsi Tumbuhan :
Habitus : pohon, menahun, tinggi tanaman 5-10 m. Akar : tunggang, bercabang, putih kotor atau putih kekuningan hingga coklat kekuningan. Batang : tumbuh tegak, percabangan monopodial, bercabang banyak, berbentuk bulat, berkayu, permukaan kulit batang gundul, berwarna abu-abu muda hingga abu-abu kusam, ranting berwarna coklat keabuan. Daun : tunggal, terletak berseling, bentuk bulat telur, panjang 5-12 cm, lebar 4-8 cm, pangkal daun tumpul hingga berlekuk, tepi daun rata, ujung meruncing, pertulangan daun menyirip, permukaan atas daun mengkilat dan berwarna hijau tua, permukaan bawah daun mengkilat dan berwarna hijau muda; tangkai daun bulat, gundul, berwarna hijau. Bunga : majemuk, tumbuh dalam kumpulan kecil di ketiak daun di dekat ujung batang, berwarna kuning kehijauan hingga kuning-krem atau kuning keputihan. Buah : berwarna hijau ketika muda, oranye di kulit luar dan oranye hingga merah di bagian dalam ketika masak. Biji : bulat memanjang, panjang 8-12 mm, diameter 6-8 mm, berjumlah 8 per buah, berwarna hitam ketika masak.

Surakarta, 23 Desember 2016

Mengetahui,
Kepala Program Studi Biologi FMIPA UNS

Dr. Ratna Setyaningsih, M.Si.
NIP. 19660714 199903 2 001

Penanggungjawab
Determinasi Tumbuhan

Suratman, S.Si., M.Si.
NIP. 19800705 200212 1 002

Lampiran 3. Ethical clearance

HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
Dr. Moewardi General Hospital
RSUD Dr. Moewardi

School of Medicine Sebelas Maret University
Fakultas Kedokteran Universitas sebelas Maret

ETHICAL CLEARANCE
KELAIKAN ETIK

Nomor : 160 / II / HREC /2017

The Health Research Ethics Committee Dr. Moewardi General Hospital / School of Medicine Sebelas Maret University Of Surakarta
Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Moewardi / Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta

after reviewing the proposal design, here with to certify
setelah menilai rancangan penelitian yang diusulkan, dengan ini menyatakan

That the research proposal with topic :
Bahwa usulan penelitian dengan judul

PENGARUH EKSTRAK ETANOL KULIT BATANG FALOAK (Sterculia quadrifida R.Br) TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH DAN AKTIVITAS ENZIM GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS DIABETES

Principal investigator : Rambu Konda Anggung Praing
Peneliti Utama 19133873A

Location of research : Laboratorium Pau Gizi Universitas Gajah Mada
Lokasi Tempat Penelitian

Is ethically approved
Dinyatakan laik etik

Issued on : 24 Februari 2017

Chairman
Ketua

Dr. Hari Wujoso, dr., Sp.F,MM
NIP. 19621022 199503 1 001

Lampiran 4. Perhitungan rendemen pengeringan kulit batang faloak

Simplisia	Berat basah (Kg)	Berat kering (Kg)	Rendemen (%)
Kulit batang faloak	3,6	1,8	50

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat kering (Kg)}}{\text{Berat basah (Kg)}} \text{ x } 100\ \%$$

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{1{,}8\ \text{Kg}}{3{,}6\ \text{Kg}} \text{ x } 100\ \%$$

$$= 50\ \%$$

Lampiran 5. Perhitungan rendemen ekstrak etanol kulit batang faloak

Simplisia	Berat serbuk (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
Kulit batang faloak	500	67,68	13,54

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat ekstrak (gram)}}{\text{Berat serbuk (gram)}} \text{ x } 100\%$$

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{67{,}68 \text{ gram}}{500 \text{ gram}} \text{ x } 100 \%$$

$$= 13{,}54 \%$$

Lampiran 6. Penetapan kadar air serbuk kulit batang faloak

Berat serbuk (g)	Volume terbaca (mL)	Kadar air (%)
20	1,8	9
20	1,9	9,5
20	1,8	9
	Rata-rata	9,16

Perhitungan :

Kadar air$_1$ $= \frac{\text{volume terbaca (mL)}}{\text{berat serbuk (g)}} \text{x } 100\%$

$= \frac{1{,}8 \text{ mL}}{20 \text{ g}} \text{x } 100\%$

= 9 %

Kadar air$_2$ $= \frac{\text{volume terbaca (mL)}}{\text{berat serbuk (g)}} \text{x } 100\%$

$= \frac{1{,}9 \text{ mL}}{20\text{g}} \text{x } 100\%$

= 9,5 %

Kadar air$_3$ $= \frac{\text{volume terbaca (mL)}}{\text{berat serbuk (g)}} \text{x } 100\%$

$= \frac{1{,}8 \text{ mL}}{20 \text{ g}} \text{x } 100\%$

= 9 %

Rata-rata kadar air serbuk kulit batang faloak $= \frac{\text{Kadar air1+kadar air2+kadar air 3}}{3}$

$= \frac{9\%+9{,}5\%+9\%}{3} = 9{,}16\%$

Lampiran 7. Foto kegiatan penelitian

Oven kulit batang faloak suhu 50ºC

Giling kulit batang faloak

Ayak serbuk kulit batang faloak

Maserasi 500 g serbuk kulit batang faloak dengan 5 L etanol 70% (1 : 10)

Vakum hasil maserasi

Evaporasi filtrat

Penetapan kadar air dengan rangkaian alat *Sterling-Bidwell*

Volume air yang diperoleh

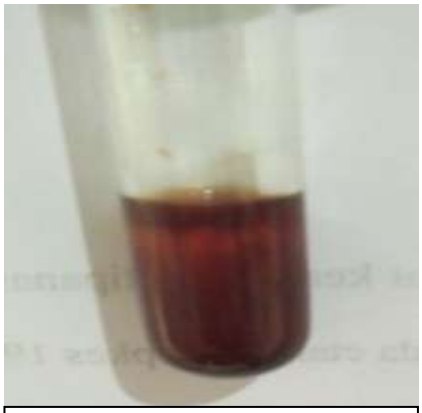
Serbuk kulit batang faloak

Ekstrak kental kulit batang faloak

Uji bebas alkohol

Lampiran 8. Idenfikasi kandungan senyawa secara kuantitatif

Flavonoid
Ekstrak ditambah serbuk Mg secukupnya, 1 mL HCl dan 2 mL amil alkohol→ merah jingga pada lapisan amil



Terpenoid
Ekstrak ditambah Liebermann Bourchard →cincin kecoklatan

Alkaloid
Ekstrak ditambah 1,5 mL HCL dan reagen Dragendroff →endapan coklat

Saponin
Ekstrak ditambah 10 mL air suling panas dan didinginkan lalu dikocok →buih tinggi 1-10 cm

Tanin
Ekstrak ditambah ditambah besi (III) klorida → warna hijau violet

Lampiran 9. Radikal bebas DPPH

Penimbangan DPPH

$$80 \text{ ppm} = \frac{80 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{8 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

Untuk membuat larutan DPPH konsentrasi 80 ppm maka ditimbang DPPH sebanyak 8 mg.

Pembuatan larutan DPPH

DPPH yang telah ditimbang menggunakan neraca elektrik sebanyak 8 mg, dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas dalam labu takar 100 ml yang telah ditutupi dengan alumunium foil.

Lampiran 10. Rutin

Penimbangan rutin

$$50 \text{ ppm} = \frac{50 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{5 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

Untuk membuat larutan induk rutin konsentrasi 50 ppm maka ditimbang rutin sebanyak 5 mg.

Pembuatan larutan induk rutin

Rutin yang telah ditimbang menggunakan neraca elektrik sebanyak 5 mg, dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas dalam labu takar 100 ml.

Pembuatan seri konsentrasi

Larutan induk rutin 50 ppm dibuat seri konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm.

Konsentrasi (ppm)	Pengenceran (ml)	Volume yang dibuat (ml)
2	2	50
4	4	50
6	6	50
8	8	50
10	10	50

Contoh perhitungan pembuatan konsentrasi 2 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$50 \text{ ppm} \times V_1 = 2 \text{ ppm} \times 50 \text{ ml}$$

$$V_1 = 2 \text{ ml}$$

Larutan induk rutin 50 ppm dipipet sebanyak 2 ml, 4 ml, 6 ml, 8 ml, dan 10 ml kemudian masing-masing dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas dalam labu takar 50 ml.

Lampiran 11. Ekstrak etanol kulit batang faloak

Penimbangan ekstrak kental

$$1000 \text{ ppm} = \frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{100 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

Untuk membuat larutan induk ekstrak konsentrasi 1000 ppm maka ditimbang ekstrak kental sebanyak 100 mg.

Pembuatan larutan induk rutin

Ekstrak yang telah ditimbang menggunakan neraca elektrik sebanyak 100 mg, dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas dalam labu takar 100 ml.

Pembuatan seri konsentrasi

Larutan induk ekstrak 1000 ppm dibuat seri konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm.

Konsentrasi (ppm)	Pengenceran (ml)	Volume yang dibuat (ml)
2	0,1	50
4	0,2	50
6	0,3	50
8	0,4	50
10	0,5	50

Contoh perhitungan pembuatan konsentrasi 2 ppm

$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$

$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 2 \text{ ppm} \times 50 \text{ ml}$

$V_1 = 0{,}1 \text{ ml}$

Larutan induk ekstrak 1000 ppm dipipet sebanyak 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, dan 0,5 ml kemudian masing-masing dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas dalam labu takar 50 ml.

Lampiran 12. Penetapan panjang gelombang maksimum DPPH

λ (nm)	Absorbansi DPPH	λ (nm)	Absorbansi DPPH
600	0,403	495	0,758
595	0,411	490	0,732
590	0,421	485	0,620
585	0,435	480	0,572
580	0,446	475	0,521
575	0,560	470	0,475
570	0,489	465	0,430
565	0,517	460	0,383
560	0,542	455	0,350
555	0,576	450	0,324
550	0,613	445	0,299
545	0,654	440	0,285
540	0,698	435	0,274
535	0,759	430	0,258
530	0,827	425	0,247
525	0,854	420	0,235
520	**0,860**	415	0,224
515	**0,867**	410	0,220
510	**0,847**	405	0,217
505	0,820	400	0,215
500	0,786		

Panjang geombang yang dililih yaitu 517 nm dengan nilai absorbansi yang paling tinggi yaitu 0,870.

Lampiran 13. Penetapan *operating time*

Waktu (detik)	Ekstrak etanol kulit batang faloak	Rutin
0	0,102	0,096
60	0,102	0,095
120	0,101	0,096
180	0,101	0,095
240	0,100	0,095
300	0,100	0,094
360	0,100	0,094
420	0,099	0,094
480	0,099	0,093
540	0,099	0,093
600	0,099	0,093
660	0,098	0,093
720	0,099	0,092
780	0,099	0,092
840	0,099	0,092
900	0,098	0,092
960	0,098	0,092
1020	0,098	0,091
1080	0,098	0,091
1140	0,097	0,091
1200	0,098	0,090
1260	0,098	0,090
1320	0,097	0,090
1380	0,097	0,090
1440	**0,096**	0,090
1500	**0,096**	**0,089**
1560	**0,096**	**0,089**
1620	**0,096**	**0,089**
1680	**0,096**	**0,089**
1740	**0,096**	**0,089**
1800	**0,096**	**0,089**

Lampiran 14. Perhitungan IC_{50} rutin

Replikasi	konsentrasi	Absorbansi	% Inhibisi	IC_{50} (ppm)
Replikasi 1	2	0,518	40,4598	4,23
	4	0,471	45,8621	
	6	0,369	57,5862	
	8	0,225	74,1379	
	10	0,207	76,2069	
Replikasi 2	2	0,519	40,3448	4,24
	4	0,471	45,8621	
	6	0,370	57,4713	
	8	0,226	74,0230	
	10	0,207	76,2069	
Replikasi 3	2	0,518	40,4598	4,23
	4	0,471	45,8621	
	6	0,369	57,5862	
	8	0,225	74,1379	
	10	0,208	76,0919	

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbasi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \text{ x } 100\%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0{,}870 - 0{,}518}{0{,}870} \; x \; 100\%$$

= 40,4598 %

Replikasi 1

a = 28,9196

b = 4,9885

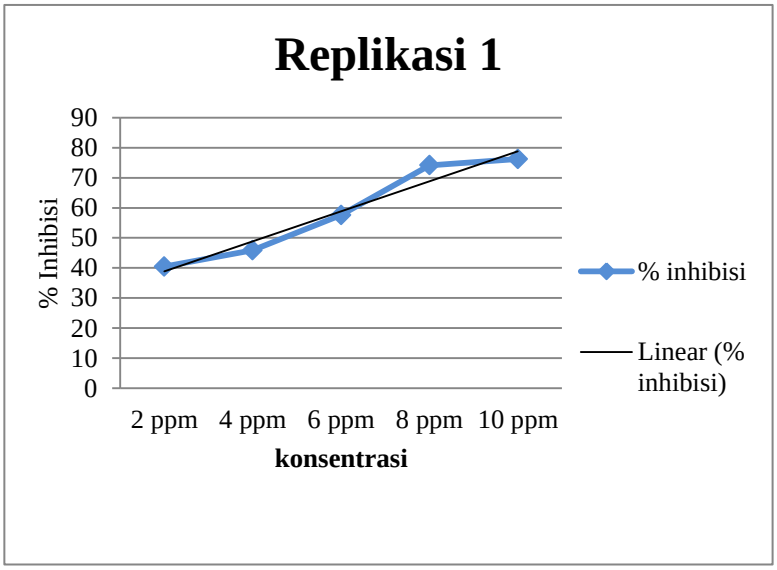
r = 0,9767

y = a + bx

50 = 28,9196 + 4,9885 x

x = (50-28,9196)/4,9885

x = 4,2258 ~ 4,23 ppm



Replikasi 2

a = 28,8161

b = 4,9942

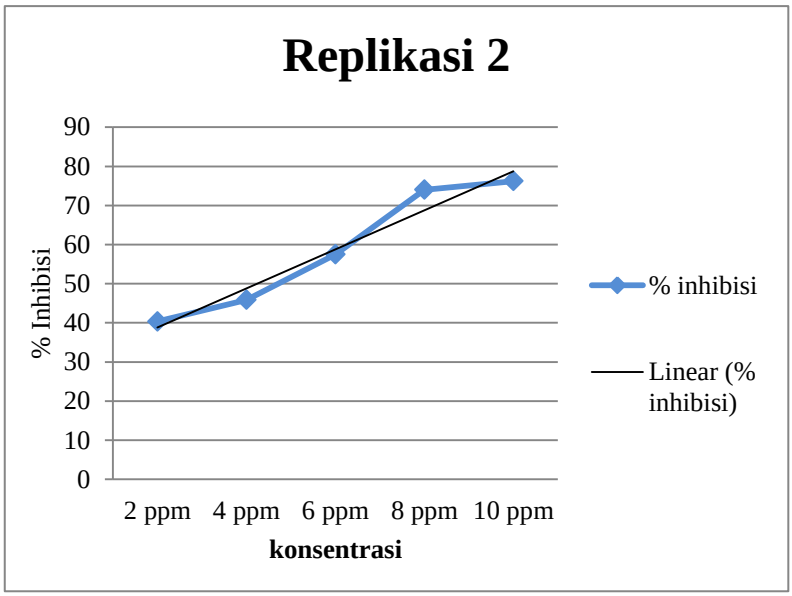
r = 0,9773

y = a + bx

50 = 28,8161 + 4,9942 x

x = (50-28,8161)/4,9942

x = 4,2417 ~ 4,24 ppm



Replikasi 3

a = 28,9656

b = 4,9770

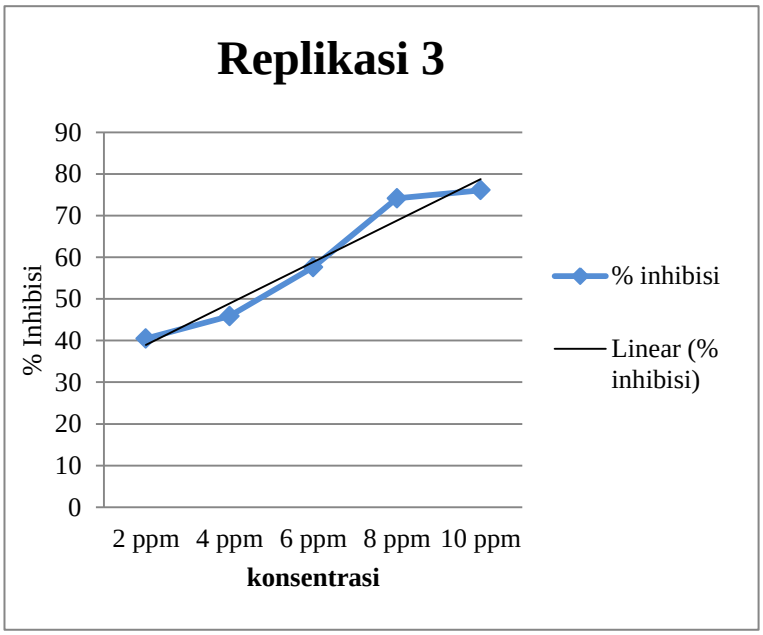
r = 0,9763

y = a + bx

50 = 28,9656 + 4,9770x

x = (50-28,9656)/4,9770

x = 4,2263 ~ 4,23 ppm



Rata-rata nilai IC_{50} rutin = $\frac{4,23+4,24+4,23}{3}$ = 4,23 ppm

Lampiran 15. Perhitungan IC_{50} ekstrak etanol kulit batang faloak

Replikasi	konsentrasi	Absorbansi	% Inhibisi	IC_{50} (ppm)
Replikasi 1	2	0,560	35,6322	4,86
	4	0,448	48,5057	
	6	0,392	54,9425	
	8	0,324	62,7586	
	10	0,220	74,7126	
Replikasi 2	2	0,560	35,6322	4,86
	4	0,449	48,3908	
	6	0,392	54,9425	
	8	0,324	62,7586	
	10	0,221	74,5977	
Replikasi 3	2	0,561	35,5172	4,87
	4	0,449	48,3908	
	6	0,392	54,9425	
	8	0,324	62,7586	
	10	0,220	74,7126	

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbasi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

$$= \frac{0{,}870 - 0{,}560}{0{,}870} \; x \; 100\,\%$$

$$= 35{,}6322$$

Replikasi 1

a = 27,7862

b = 4,5707

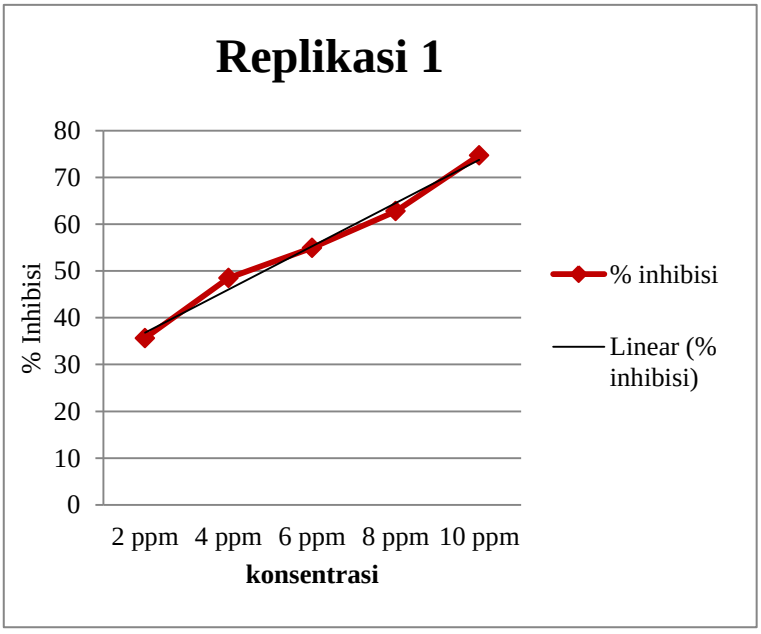
r = 0,9936

y = a + bx

50 = 27,7862 + 4,5707

x = (50-27,7862)/4,5707

x = 4,8600 ~ 4,86 ppm



Replikasi 2

a = 27,5747

b = 4,6149

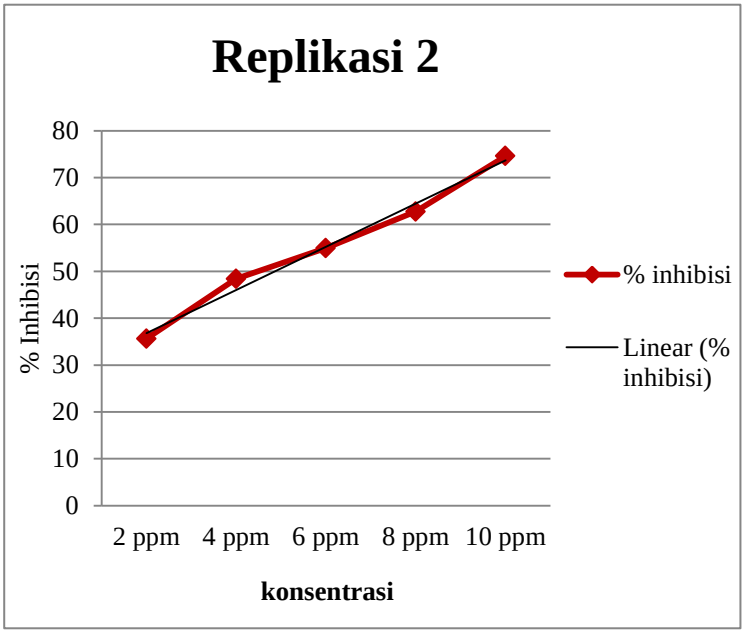
r = 0,9937

y = a + bx

50 = 27,5747 + 4,6149

x = (50-27,5747)/4,6149

x = 4,8593 ~ 4,86 ppm



Replikasi 3

a = 27,4368

b = 4,6379

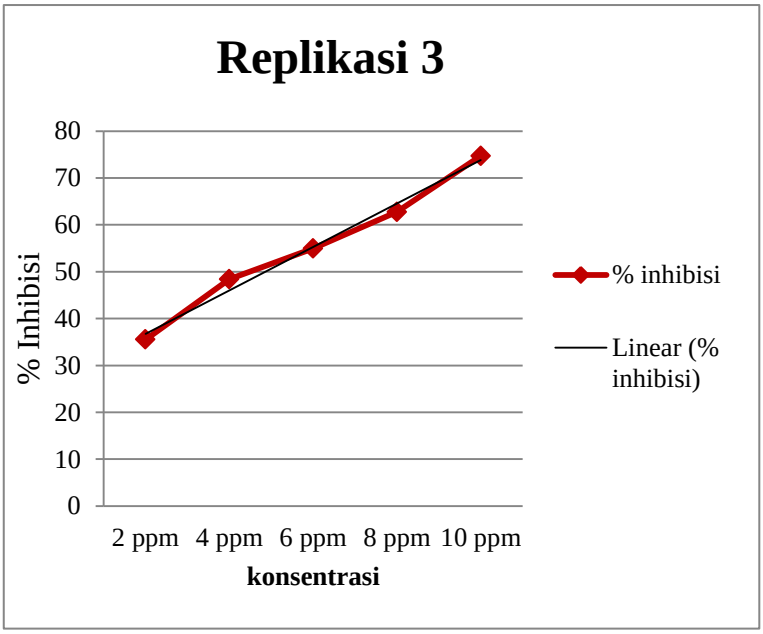
r = 0,9935

y = a + bx

50 = 27,4368 + 4,6379

x = (50-27,4368)/4,6379

x = 4,8650 ~ 4,87 ppm



Rata-rata nilai IC_{50} ekstrak = $\frac{4,86+4,86+4,87}{3}$ = 4,86 ppm

Lampiran 16. Hasil uji statistik *Independent sampels t-test* rata-rata nilai IC_{50} rutin dan ekstrak

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
IC50_rutin	3	4,2333	,00577	4,23	4,24
IC50_ekstrak	3	4,8633	,00577	4,86	4,87

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		IC50_rutin	IC50_ekstrak
N		3	3
Normal Parameters[a,b]	Mean	4,2333	4,8633
	Std. Deviation	,00577	,00577
Most Extreme Differences	Absolute	,385	,385
	Positive	,385	,385
	Negative	-,282	-,282
Kolmogorov-Smirnov Z		,667	,667
Asymp. Sig. (2-tailed)		,766	,766

a. Test distribution is Normal.
b. Calculated from data.

Dari data uji *One-Sample Kolmogorov-Smirnov* diperoleh IC_{50} rutin dengan signifikasi = 0,766 > 0,05 (H_0 diterima) dan IC_{50} ekstrak dengan signifikasi = 0,766 > 0,05. Disimpulkan data tersebut terdistribusi normal sehingga dapat dilakukan analisis *Independent sampels t-test*.

Group Statistics

	larutan uji	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
IC50	rutin	3	4,2333	,00577	,00333
	ekstrak	3	4,8633	,00577	,00333

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
IC50	Equal variances assumed	,000	1,000	-133,643	4	,000	-,63000	,00471	-,64309	-,61691
	Equal variances not assumed			-133,643	4,000	,000	-,63000	,00471	-,64309	-,61691

Hasil *Lavene's Test for Equality of Variances* menunjukkan signifikasi = 1,000 > 0,05 yang berarti kedua varians adalah sama.

Hasil *t-test Equality of Means* menunjukkan signifikasi = 0,000<0,05 yang berarti rata-rata nilai IC_{50} rutin dan ekstrak adalah berbeda secara signifikan.

Lampiran 17. Foto alat, bahan dan hasil uji aktivitas antioksidan secara *in vitro*

DPPH

Larutan DPPH 80 ppm

Metanol pro analisis

Rutin

Larutan rutin 50 ppm

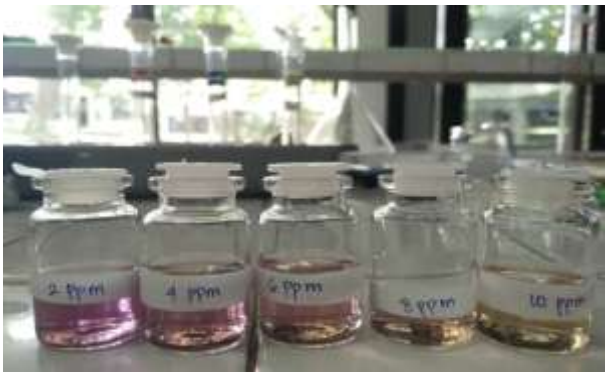
Rutin direaksikan dengan DPPH

Hasil reaksi antara rutin dan DPPH

Ekstrak kental kulit batang faloak

Larutan ekstrak 1000 ppm

Ekstrak direaksikan dengan DPPH



Hasil reaksi antara ekstrak dan DPPH

Pembuatan seri konsentrasi
ekstrak dan rutin

Spektrofotometer UV-Vis

Lampiran 18. Perhitungan dosis

1. Aloksan

Dosis aloksan utuk tikus = 180 mg/Kg BB tikus
= 36 mg/200 g BB tikus

Contoh :

Dosis aloksan untuk tikus BB 180 g $= \frac{180\ g}{200\ g}$ x 36 mg = 32,4 mg

2. Glibenklamid

Dosis glibenklamid untuk manusia BB = 70 Kg adalah 5 mg

Faktor konversi dari manusia BB 70 Kg → tikus BB 200 g adalah 0,018

Dosis glibenklamid untuk tikus BB 200 g = 5 mg x 0,018
= 0,09 mg/200 g BB tikus
= 0,45 mg/Kg BB tikus

Contoh :

Dosis glibenklamid untuk tikus BB 180 g = $\frac{180\ g}{200\ g}$ x 009 mg = 0,081 mg

3. Na CMC

Larutan stok CMC 0,5 %

$$0{,}5\% = \frac{0{,}5\ g}{100\ ml} = \frac{500\ mg}{100\ ml} = 5\ mg/ml$$

Volume pemberian untuk tikus yang beratnya 200 gram dengan larutan Na CMC 0,5% adalah 1 ml. Menimbang 500 mg Na CMC dilarutkan dengan air suling panas diaduk hingga larut kemudian dicukupkan volume sampai 100 ml.

4. Ekstrak etanol kulit batang faloak

Berat kulit batang faloak = 3,6 Kg

Berat kulit batang faloak setelah dioven = 1,8 Kg

Rendemen pengeringan = $\frac{1{,}8\ \text{Kg}}{3{,}6\ \text{Kg}} \text{ x } 100\% = 50\%$

Berat serbuk kulit batang faloak = 500 g (yang digunakan untuk maserasi)

Berat ekstrak kental = 67,6780 g

Dosis empiris = 20 g berat basah ~10 g berat kering

Berat kering = $\frac{50\ \%}{100\ \%} \text{ x } 20\ \text{g} = 10\ \text{g}$

Rendemen ekstrak = $\frac{67{,}6780\ \text{g}}{500\ \text{g}} \text{ x } 100\% = 13{,}5356\ \%$

$$\frac{13{,}5356\ \text{g}}{100\ \text{g}} \text{ x } 10\ \text{gram} = 1{,}35356\ \text{g} \sim 1{,}4\ \text{g dosis untuk manusia}$$

Faktor konversi manusia 70 Kg → tikus 200 g adalah 0,018

1,4 g x 0,018 = 0,0252 g/200 g BB tikus

= 0,126 g/Kg BB tikus

= 126 mg/Kg BB tikus

Dosis I = ½ x 126 mg/Kg BB tikus = 63 ~65mg/Kg BB tikus

Dosis II = 1 x 126 mg/Kg BB tikus = 126 ~130 mg/Kg BB tikus

Dosis III = 2 x 126 mg/Kg BB tikus = 252 ~260 mg/Kg BB tikus

Lampiran 19. Hasil pengukuran aktivitas enzim GPx hati tikus

Kelompok	Replikasi	Absorbansi	Aktivitas GPx (U/mg)	Rata-rata aktivitas GPx
Kontrol normal	1	0,964	74,39	77,79
	2	1,053	81,26	
	3	0,963	74,32	
	4	1,042	80,41	
	5	1,018	78,56	
Kontrol negatif	1	0,321	24,77	25,87
	2	0,340	26,24	
	3	0,354	27,32	
	4	0,322	24,85	
	5	0,339	26,16	
Kontrol pembanding	1	0,843	65,05	62,83
	2	0,810	62,51	
	3	0,794	61,27	
	4	0,804	62,05	
	5	0,820	63,28	
Dosis ekstrak I	1	0,464	35,81	36,73
	2	0,487	37,58	
	3	0,477	36,81	
	4	0,480	37,04	
	5	0,472	36,42	
Dosis ekstrak II	1	0,621	47,92	50,87
	2	0,684	52,78	
	3	0,673	51,94	
	4	0,668	51,55	
	5	0,650	50,16	
Dosis ekstrak III	1	0,732	56,49	56,10
	2	0,710	54,79	
	3	0,743	57,34	
	4	0,722	55,72	
	5	0,728	56,18	

Contoh perhitungan :

$$\text{Kadar GPx} = \frac{\text{Absorbansi x Vt x 2 x 1000 x 1/mg protein}}{6{,}22 \text{ x Vs}}$$

$$= \frac{(0{,}964 \text{ x } 1{,}2 \text{ x } 2 \text{ x } 1000 \text{ x} 1)}{(6{,}22 \text{ x } 0{,}2)} = 74{,}39 \text{ U/mg}$$

Keterangan :

Dosis glibenklamid : 0,45 mg/Kg BB tikus
Dosis aloksan : 180 mg/Kg BB tikus
Dosis ekstrak I : 65 mg/Kg BB tikus
Dosis ekstrak II : 130 mg/Kg BB tikus
Dosis ekstrak III : 260 mg/Kg BB tikus

Lampiran 20. Hasil uji statistik menggunakan *Kolmogorov-Smirnov test* dan *Mann-Whitney Test* terhadap aktivitas enzim GPx

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kelompok_normal	,250	5	,200*	,854	5	,206
kelompok_negatif	,229	5	,200*	,901	5	,417
kelompok_pembanding	,189	5	,200*	,954	5	,763
kelompok_dosis_I	,147	5	,200*	,995	5	,994
kelompok_dosis_II	,240	5	,200*	,926	5	,570
kelompok_dosis_III	,142	5	,200*	,994	5	,993

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

Aktivitas_GPx

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kelompok normal	5	77,7880	3,28249	1,46798	73,7122	81,8638	74,32	81,26
kelompok negatif	5	25,8680	1,06933	,47822	24,5402	27,1958	24,77	27,32
kelompok pembanding	5	62,8320	1,43834	,64324	61,0461	64,6179	61,27	65,05
kelompok dosis I	5	36,7320	,66473	,29728	35,9066	37,5574	35,81	37,58
kelompok dosis II	5	50,8700	1,90145	,85035	48,5090	53,2310	47,92	52,78
kelompok dosis III	5	56,1040	,94294	,42169	54,9332	57,2748	54,79	57,34
Total	30	51,6990	17,27600	3,15415	45,2480	58,1500	24,77	81,26

Test of Homogeneity of Variances

Aktivitas_GPx

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5,578	5	24	,002

Uji *Levene Statistic* menunjukkan bahwa data tidak homogen ($p<0,05$), sehingga dilanjutkan uji non parametrik (uji *Mann-Whitney*) untuk mengetahui perbedaan aktivitas GPx antara setiap kelompok.

Mann-Whitney Test

- **Perbandingan kelompok kontrol normal dan kontrol negatif (CMC 0,5%)**

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Aktivitas_GPx	kelompok normal	5	8,00	40,00
	kelompok negatif	5	3,00	15,00
	Total	10		

Test Statistics[a]

	Aktivitas_GPx
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-2,611
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008[b]

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

- **Perbandingan kelompok kontrol normal dan kontrol pembanding (glibenklamid 0,45 mg/Kg BB tikus)**

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Aktivitas_GPx	kelompok normal	5	8,00	40,00
	kelompok pembanding	5	3,00	15,00
	Total	10		

Test Statistics[a]

	Aktivitas_GPx
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-2,611
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008[b]

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

- **Perbandingan kelompok kontrol normal dan kelompok dosis I (ekstrak kulit batang faloak 65 mg/Kg BB tikus)**

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Aktivitas_GPx	kelompok normal	5	8,00	40,00
	kelompok dosis I	5	3,00	15,00
	Total	10		

Test Statistics[a]

	Aktivitas_GPx
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-2,611
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008[b]

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

- **Perbandingan kelompok kontrol normal dan kelompok dosis II (ekstrak kulit batang faloak 130 mg/Kg BB tikus)**

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Aktivitas_GPx	kelompok normal	5	8,00	40,00
	kelompok dosis II	5	3,00	15,00
	Total	10		

Test Statistics[a]

	Aktivitas_GPx
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-2,611
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008[b]

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

- **Perbandingan kelompok kontrol normal dan kelompok dosis III (ekstrak kulit batang faloak 260 mg/Kg BB tikus)**

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Aktivitas_GPx	kelompok normal	5	8,00	40,00
	kelompok dosis III	5	3,00	15,00
	Total	10		

Test Statistics[a]

	Aktivitas_GPx
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-2,611
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008[b]

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

- **Perbandingan kelompok kontrol negatif (CMC 0,5%) dan kelompok kelompok kontrol pembanding (glibenklamid 0,45 mg/Kg BB tikus)**

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Aktivitas_GPx	kelompok negatif	5	3,00	15,00
	kelompok pembanding	5	8,00	40,00
	Total	10		

Test Statistics[a]

	Aktivitas_GPx
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-2,611
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008[b]

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

- **Perbandingan kelompok kontrol negatif (CMC 0,5%) dan kelompok dosis I (ekstrak kulit batang faloak 65 mg/Kg BB tikus)**

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Aktivitas_GPx	kelompok negatif	5	3,00	15,00
	kelompok dosis I	5	8,00	40,00
	Total	10		

Test Statistics[a]

	Aktivitas_GPx
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-2,611
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008[b]

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

- **Perbandingan kelompok kontrol negatif (CMC 0,5%) dan kelompok dosis II (ekstrak kulit batang faloak 130 mg/Kg BB tikus)**

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Aktivitas_GPx	kelompok negatif	5	3,00	15,00
	kelompok dosis II	5	8,00	40,00
	Total	10		

Test Statistics[a]

	Aktivitas_GPx
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-2,611
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008[b]

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

- **Perbandingan kelompok kontrol negatif (CMC 0,5%) dan kelompok dosis III (ekstrak kulit batang faloak 260 mg/Kg BB tikus)**

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Aktivitas_GPx	kelompok negatif	5	3,00	15,00
	kelompok dosis III	5	8,00	40,00
	Total	10		

Test Statistics[a]

	Aktivitas_GPx
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-2,611
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008[b]

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

- **Perbandingan kelompok kontrol pembanding (glibenklamid 0,45 mg/Kg BB tikus) dan kelompok dosis I (ekstrak kulit batang faloak 65 mg/Kg BB tikus)**

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Aktivitas_GPx	Kelompok pembanding	5	8,00	40,00
	kelompok dosis I	5	3,00	15,00
	Total	10		

Test Statistics[a]

	Aktivitas_GPx
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-2,611
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008[b]

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

- **Perbandingan kelompok kontrol pembanding (glibenklamid 0,45 mg/Kg BB tikus) dan kelompok dosis II (ekstrak kulit batang faloak 130 mg/Kg BB tikus)**

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Aktivitas_GPx	kelompok pembanding	5	8,00	40,00
	kelompok dosis II	5	3,00	15,00
	Total	10		

Test Statistics[a]

	Aktivitas_GPx
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-2,611
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008[b]

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

- **Perbandingan kelompok kontrol pembanding (glibenklamid 0,45 mg/Kg BB tikus) dan kelompok dosis III (ekstrak kulit batang faloak 260 mg/Kg BB tikus)**

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Aktivitas_GPx	kelompok pembanding	5	8,00	40,00
	kelompok dosis III	5	3,00	15,00
	Total	10		

Test Statistics[a]

	Aktivitas_GPx
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-2,611
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008[b]

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

Lampiran 21. Foto alat, bahan dan kegiatan uji aktivitas enzim GPx hati tikus

Sentrifugase

Homogenaizer

Spektrofotometer UV-Vis

Larutan Na CMC 0,5%

Aloksan monohydrate

NaCl 0,9%

Tikus galur wistar

Menimbang berat tikus

Induksi aloksan secara intraperitoneum

Tikus dianestesi inhalasi dengan eter

Korbankan tikus dengan cara dislokasi leher

Bedah tikus untuk ambil organ hati

Kit Glutation peroksidase merek Bio Vision

Hepar tikus yang digunakan untuk mengukur aktivitas enzim GPx

Glibenklamid murni merek Indo Farma