

**EFEK EKSTRK ETANOL DAUN KACAPIRING (*Gardenia jasminoides* J. Ellis)
TERHADAP RADIKAL BEBAS *DPPH* DAN AKTIVITAS ENZIM
GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS HIPERGLIKEMIA**



Oleh :

Bety Kurnia Kumalasari
20144207A

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

**EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN KACAPIRING (*Gardenia jasminoides* J. Ellis)
TERHADAP RADIKAL BEBAS *DPPH* DAN AKTIVITAS ENZIM
GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS HIPERGLIKEMIA**

SKRIPSI

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

Oleh :

**Bety Kurnia Kumalasari
20144207A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

PENGESAHAN SKRIPSI

PENGESAHAN SKRIPSI

Berjudul

**EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN KACAPIRING (*Gardenia jasminoides* J. Ellis)
TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH DAN AKTIVITAS ENZIM
GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS HIPERGLIKEMIA**

Oleh

**Bety Kurnia Kumalasari
20144207A**

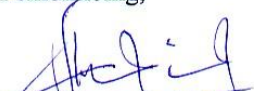
Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal 16 Juli 2018

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi
Dekan,




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

Pembimbing,


Dr. Titik Sunarni, S.Si., M. Si., Apt.

Pembimbing pendamping,


Dwi Ningsih, M. Farm., Apt.

Penguji:

1. Dr. Gunawan Pamudji, S.Si., M.Si., Apt
2. Sunarti, S. Farm., M. Sc., Apt
3. Hery Muhamad Ansory, S.Pd., M. Sc
4. Dr. Titik Sunarni, S.Si., M. Si., Apt.


.....
.....
.....
.....

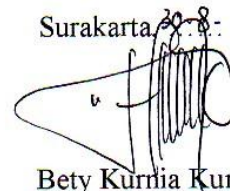
PERNYATAAN

PERNYATAAN

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

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

Surakarta, 30.8.2018



Bety Kurnia Kumalasari

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN KACAPIRING (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH DAN AKTIVITAS ENZIM GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS HIPERGLIKEMIA”** 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 rector 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, S.Si., M.Sc., Apt., selaku pembimbing utama yang telah meluangkan waktu beliau untuk membimbing penulis, sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
4. Dwi Ningsih, M.Farm., 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 bapak Yuli dari Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada yang telah banyak membantu.
7. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penyusun menyadari masih banyak kekurangan dalam menyusun skripsi ini. Kritik dan saran dari siapapun yang bersifat membangun sangat penulis

harapkan. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi siapapun yang mempelajarinya.

Surakarta, Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
INTISARI.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Perumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian.....	4
D. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. Tinjauan Tanaman	5
1. Sistematika Tanaman Kacapiring.....	5
2. Morfologi tumbuhan kacapiring (<i>Gardenia jasminoides</i> J. Ellis).....	5
3. Sinonim tanaman.....	6
4. Nama daerah.....	6
5. Nama asing.....	6
6. Aktivitas dan kegunaan	6
7. Kandungan tanaman kacapiring (<i>Gardenia jasminoides</i> J. Ellis).....	7
B. Simplisia.....	9
1. Pengertian Simplisia.....	9
2. Pengumpulan simplisia.....	10
3. Pengeringan Simplisia.....	10
4. Tahap Pembuatan Simplisia	10
C. Metode Penyarian.....	12

1.	Pengertian Penyarian.....	12
2.	Ekstraksi	12
3.	Pelarut.....	13
D.	Hewan Uji.....	13
1.	Sistematika hewan uji.....	13
2.	Biologi hewan uji	13
3.	Karakteristik hewan uji	14
4.	Teknik memegang dan penanganannya	14
E.	Diabetes Mellitus.....	15
1.	Definisi Diabetes Mellitus.....	15
2.	Klasifikasi Diabetes Mellitus	15
3.	Gejala Diabetes Mellitus	16
4.	Manifestasi klinik.....	16
5.	Komplikasi Diabetes Mellitus	16
6.	Antidiabetik oral.....	18
7.	Stress oksidatif pada diabetes.....	19
	Glikasi protein nonenzimatik	19
F.	Glibenklamid	20
1.	Sifat fisika dan kimia glibenklamid.....	20
2.	Mekanisme kerja	21
3.	Interaksi obat	21
4.	Dosis dan aturan pakai	21
5.	Efek samping	21
G.	Antioksidan.....	22
1.	Pengertian	22
2.	Klasifikasi Antioksidan	22
3.	Jenis Antioksidan Alami	23
4.	Mekanisme Kerja Antioksidan	24
H.	Diabetogenik.....	25
I.	Kuersetin.....	27
J.	Metode Uji Antioksidan In Vitro	28
1.	Metode DPPH.....	28
2.	Metode ABTS.....	28
3.	Metode FRAP	29
4.	Metode TRAP.....	29
K.	Enzim Glutation Peroksidase	29
L.	Metode Uji Antioksidan In Vivo Terhadap Glutation Peroxidase	30
M.	Spektrofotometer UV-Vis dan Absorbansi	30
N.	Landasan Teori	31
O.	Hipotesis	32
BAB III METODE PENELITIAN		33
A.	Populasi dan Sampel.....	33
1.	Populasi	33
2.	Sampel	33

B.	Variabel Penelitian	33
1.	Identifikasi variabel utama	33
2.	Klasifikasi variabel utama	33
3.	Definisi operasional variabel utama	34
C.	Bahan dan Alat	34
1.	Bahan	34
2.	Alat	35
3.	Hewan uji	35
D.	Jalannya Penelitian	36
1.	Determinasi daun kacapiring	36
2.	Pengambilan dan pembuatan serbuk daun kacapiring	36
3.	Penetapan kadar air ekstrak daun kacapiring	36
4.	Pembuatan ekstrak etanol daun kacapiring	37
5.	Susut pengeringan ekstrak daun kacapiring	37
6.	Bobot jenis ekstrak kental 1 % daun kacapiring	38
7.	Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun kacapiring	38
8.	Uji aktifitas antioksidan terhadap radikal bebas <i>DPPH</i>	39
9.	Uji aktivitas antioksidan terhadap glutation peroksidase	40
E.	Analisa Statistik	43
F.	Skema Penelitian	45
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN		47
A.	Determinasi Daun Kacapiring	47
B.	Pembuatan serbuk daun kacapiring	47
C.	Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kacapiring	48
D.	Penetapan Kadar Air Serbuk dan Ekstrak Etanol Daun Kacapiring	49
E.	Penetapan Bobot Jenis Serbuk Etanol Daun Kacapiring	49
F.	Identifikasi Kandungan Kimia Daun Kacapiring	50
G.	Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap Radikal Bebas <i>DPPH</i>	51
H.	Uji Aktivitas Terhadap Enzim GPx	55
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN		60
A.	Kesimpulan	60
B.	Saran	60
DAFTAR PUSTAKA		61
LAMPIRAN		69

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Tanaman Kacapiring (<i>Gardenia jasminoides</i> J. Ellis).....	5
2. Struktur kimia aloksan	26
3. Struktur kimia kuersetin.....	27
4. Mekanisme penghambatan radikal bebas DPPH	28
5. Skema penelitian	45
6. Skema pengujian antioksidan <i>DPPH</i>	46
7. Aktivitas antioksidan larutan uji berdasarkan nilai IC_{50}	54
8. Aktivitas Enzim GPx	55
9. Aktivitas GPx (U/mg) seluruh kelompok perlakuan.....	56

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Kriteria diabetes mellitus	15
2. Rendemen pengeringan daun kacapiring	48
3. Karakteristik ekstrak daun kacapiring.....	48
4. Rendemen ekstrak etanol daun kacapiring.....	49
5. Penetapan kadar air serbuk daun kacapiring.....	49
6. Penetapan kadar air ekstrak daun kacapiring	49
7. Penetapan susut pengeringan serbuk daun kacapiring	50
8. Penetapan susut pengeringan ekstrak daun kacapiring.....	50
9. Identifikasi reaksi kimia serbuk dan ekstrak daun kacapiring	51
10. Konsentrasi larutan uji terhadap nilai rata-rata % inhibisi kuersetin dan ekstrak etanol daun kacapiring.....	52
11. Analisa perbedaan signifikansi kelompok variasi dosis ekstrak terhadap kelompok kontrol.	56

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Surat Determinasi tanaman kacapiring	70
2. Surat ethical Clearence.....	71
3. Surat keterangan telah melakukan penelitian di Labolatorium Gizi (Hewan Coba) di Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada	72
4. Sertifikat Pelatihan Dasar Penangan Hewan Coba yang diselenggarakan oleh Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada	73
5. Foto tanaman kacapiring	74
6. Foto serbuk dan ekstrak daun kacapiring.....	75
7. Gambar alat dan bahan.....	76
8. Foto perlakuan pada hewan uji	79
9. Hasil identifikasi senyawa kimia serbuk daun kacapiring	80
10. Hasil identifikasi senyawa kimia ekstrak daun kacapiring	81
11. Hasil perhitungan presentase rendemen bobot kering terhadap botot basah daun kacapiring	82
12. Hasil perhitungan presentase rendemen serbuk terhadap ekstrak kental daun kacapiring	83
13. Hasil penetapan kadar air serbuk kering daun kacapiring	84
14. Hasil penetapan kadar air ekstrak daun kacapiring.....	85
15. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun kacapiring.....	86
16. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak daun kacapiring.....	87
17. Hasil penetapan berat jenis ekstrak daun kacapiring	88
18. Perhitugan dosis	89
19. Larutan uji <i>DPPH</i> dan Ekstrak	93
20. Radikal bebas <i>DPPH</i>	95

21. Kuersetin	96
22. Ekstrak etanol daun kacapiring	97
23. Penetapan panjang gelombang maksimum <i>DPPH</i>	98
24. Penetapan operating time larutan uji.....	99
25. Perhitungan IC_{50} kuersetin	100
26. Perhitungan IC_{50} ekstrak daun kacapiring	103
27. Hasil uji statistik independent sampels t-test rata-rata nilai IC_{50} kuersetin dan ekstrak	106
28. Hasil pengukuran GPx	108
29. Hasil uji statistic One Way Annova kadar enzim GPx hati tikus	109

INTISARI

KUMALASARI, BK., 2018, EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN KACAPIRING (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) TERHADAP RADIKAL BEBAS *DPPH* DAN AKTIVITAS ENZIM GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS HIPERGLIKEMIA, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) merupakan bagian dari tanaman kacapiring yang memiliki aktifitas antioksidan dan antidiabetes. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol daun kacapiring secara *in vitro* dan *in vivo*.

Ekstrak etanol daun kacapiring diuji aktivitas antioksidannya secara *in vitro* dengan metode penangkapan radikal bebas *DPPH* dengan parameter IC_{50} dan digunakan kuersetin sebagai pembanding. Uji aktivitas antioksidan secara *in vivo* pada penelitian ini menggunakan metode peningkatan aktivitas enzim glutation peroksidase pada jaringan hepar tikus hiperglikemia yang telah diinduksi aloksan, data yang diperoleh dianalisis statistik menggunakan uji *annova* dan dilanjutkan uji *post hoc*.

Hasil uji aktivitas antioksidan secara *in vitro* menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kacapiring secara *in vitro* memiliki nilai IC_{50} sebesar 86,411 $\mu\text{g/ml}$ hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kacapiring termasuk antioksidan kuat. Uji aktivitas antioksidan secara *in vivo* pada tikus diabetes menunjukkan aktivitas enzim glutation peroksidase pada dosis efektif 500 mg/Kg BB tikus terjadi peningkatan aktivitas enzim glutaion peroksidase sebesar 61,74 U/mg dan memiliki beda signifikan dengan kelompok kontrol hiperglikemia ($p < 0,05$).

Kata kunci : daun kacapiring, antioksidan, *DPPH*, glutation peroksidase.

ABSTRACT

KUMALASARI, BK., EFFECT OF CAPE JASMINE LEAF ETHANOL EXTRACT (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) ON *DPPH* FREE RADICAL AND GLUTATHION PEROXIDE EMZYM ACTIVITY ON THE HYPERGLYCEMIC RATS, UNDERGRADUATE THESIS, PHARMACEUTICAL FACULTY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Cape jasmine leaf (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) is a part of cape jasmine that has antioxidant and antidiabetic activity. This study aims to find the antioxidant activity of cape jasmine leaf ethanol extract in vitro and in vivo.

The antioxidant activity in cape jasmine leaf ethanol extract was tested by in vitro with *DPPH* free radical capture methods with IC_{50} parameter, and compared with quercetin was used as. The antioxidant activity test by in vivo in this study used the method of enzyme glutathione peroxidase activity increase in hyperglycemic rat liver tissue that had been induced with alloxan. The data obtained were statistically analyzed using *annova* test and continued by *post hoc* test.

The results of antioxidant activity test in vitro showed that the cape jasmine leaf ethanol extract in vitro had IC_{50} value of 86.411 mg/ml, meaning that it was included as powerful antioxidant. In vivo antioxidant activity test in diabetic rat showed the activity of glutathione peroxidase enzyme at effective dose of 500 mg/kg, here, there was an increase in glutathione peroxidase enzyme activity of 61.74 U/mg on rat and it also had a significant difference with the control group of hyperglycemia ($p < 0,05$).

Keywords : Cape jasmine leaf, antioxidant, *DPPH*, glutathione peroxidase

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Diabetes mellitus (DM) merupakan gangguan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia yang berhubungan dengan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang disebabkan oleh penurunan sekresi insulin atau sensitivitas insulin (Sukandar *et al.* 2009). Hiperglikemia adalah suatu kondisi dimana kadar glukosa dalam plasma darah melebihi batas normal yaitu diatas 120 mg/dL dalam kondisi berpuasa, dan diatas 200 mg/dL setelah dua jam makan (Hapsari 2008). Diabetes melitus tipe I dikarakterisasikan ketidakmampuan memproduksi insulin karena sel-sel beta dari pulau-pulau langerhans telah mengalami kerusakan sehingga pankreas berhenti memproduksi insulin (ADA 2007). Diabetes tipe 2 dikarakterisasi adanya gangguan fungsi pulau Langerhans dan resistensi insulin yang menghasilkan gangguan toleransi glukosa dan produksi glukosa hepatic puasa yang tinggi (WHO 2010).

Prevalensi DM pada tahun 2015 di dunia dan di Asia Tenggara sebanyak 425 juta orang dewasa dengan persentase 8,5 % kenaikan 4 kali lipat dari 108 juta di tahun 1980, diperkirakan tahun 2040 jumlahnya akan terus meningkat menjadi 642 juta. Indonesia menempati peringkat ketujuh dunia untuk prevalensi penderita diabetes jumlah penderita DM sebesar 10 juta dibandingkan dengan China, India, Amerika Serikat, Brazil, Rusia dan Meksiko (WHO 2015).

Peningkatan hiperglikemia pada DM menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein, dan aktivitas jalur metabolisme poliol kemudian 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 ketidak seimbangan antara antioksidan protektif (pertahanan antioksidan) dan peningkatan produksi radikal bebas, hal ini merupakan awal kerusakan oksidatif yang dikenal sebagai stress oksidatif. Stress oksidatif juga

memiliki kontribusi pada perburukan dan perkembangan kejadian komplikasi (Setiawan & Suhartono 2005).

Pertahanan antioksidan dan sistem perbaikan seluler akan terangsang sebagai respon tantangan oksidatif pada diabetes mellitus. Sumber stress oksidatif yang terjadi berasal dari peningkatan produksi radikal bebas akibat autooksidasi glukosa selain itu, stress oksidatif juga memiliki kontribusi pada perburukan dan perkembangan kejadian komplikasi (Sudirman 2011). Salah satu tanaman yang memiliki potensi antioksidan alami untuk pengobatan penyakit diabetes mellitus yaitu daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis). Daun kacapiring mengandung saponin, flavonoid, tanin dan triterpenoid/steroid (Herbie 2015)

Melihat keparahan yang ditimbulkan oleh penyakit DM, maka banyak penelitian yang dilakukan untuk mencari pengendalian penyakit ini. Sejumlah penelitian telah dilakukan untuk menunjukkan efek antidiabetes daun kacapiring. Noffritasari (2006) menyatakan bahwa pemberian infusa daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) dosis 1,25 g/kgBB dapat menurunkan kadar glukosa darah pada tikus galur Wistar yang diberi beban glukosa berlebih. Wijayanti (2008) menyatakan bahwa ekstrak etanol daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) dapat menurunkan kadar glukosa darah pada tikus galur wistar dengan dosis 2 g/kgBB. Baroroh *et al.* 2011 menyatakan ekstrak etanol daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) pada dosis 200 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB dapat menurunkan kadar gula darah dan anti aterosklerosis pada tikus jantan galur wistar dibandingkan glibenklamid. Sharadan & Phatak 2015 menyatakan bahwa ekstrak air daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) pada dosis 200 mg/kgBB dapat menurunkan kadar gula darah dan anti aterosklerosis.

Daun kacapiring mengandung senyawa antioksidan alami yaitu flavonoid yang mampu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas. Penelitian yang telah dilakukan Supendi (2012) menyatakan bahwa pada analisis fitokimia dan uji aktifitas antioksidan daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) dan daun beluntas (*Plucea indica* Less) pada ekstrak daun kacapiring menggunakan metode DPPH mempunyai aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} 94,55 μ g/ml.

Hubungan radikal bebas dengan diabetes mellitus yaitu keadaan stress oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas membawa pada kerusakan oksidatif mulai tingkat sel, jaringan hingga ke organ tubuh menyebabkan terjadinya proses penuaan dan munculnya penyakit salah satunya diabetes mellitus. Diabetes mellitus dapat menyebabkan stress oksidatif sehingga radikal bebas dalam tubuh.

Pengujian dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo*. Pengujian secara *in vivo* menggunakan metode *DPPH* (*1,1-difenil-pikrilhidrazil*). Metode *DPPH* digunakan untuk mengetahui reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. Pengujian antioksidan secara *in vivo* dilakukan dengan melihat status antioksidan endogen yaitu glutathion peroksidase dilihat pada jaringan hepar tikus diabetes yang diinduksi aloksan. Glutathion peroksidase merupakan enzim yang berperan penting untuk melindungi organisme dari kerusakan oksidatif (Sen *et al.* 2010).

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka akan dilakukan pengujian daun kacapiring terhadap aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun kacapiring terhadap radikal bebas *DPPH* dan enzim glutathion peroksidase pada tikus diabetes serta mengetahui dosis efektif dari ekstrak etanol 96 % daun kacapiring dalam meningkatkan aktivitas enzim glutathion peroksidase.

B. Perumusan Masalah

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

Pertama, apakah ekstrak etanol daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) mempunyai efek antioksidan terhadap radikal bebas *DPPH*?

Kedua, apakah ekstrak etanol daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) mampu meningkatkan aktivitas enzim glutathion peroksidase pada tikus yang diinduksi aloksan ?

ketiga, berapakah dosis ekstrak etanol daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) yang efektif dalam meningkatkan aktivitas enzim glutathion peroksidase ?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

Pertama, mengetahui aktivitas ekstrak etanol daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) sebagai antioksidan terhadap radikal bebas *DPPH*.

Kedua, mengetahui aktivitas ekstrak etanol daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) mampu meningkatkan aktivitas enzim glutathion peroksidase pada tikus yang diinduksi aloksan.

Ketiga, mengetahui dosis efektif ekstrak etanol daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) dalam meningkatkan aktivitas enzim glutathion peroksidase.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan membantu pengembangan obat tradisional, yang berguna bagi masyarakat serta kemajuan ilmu pengetahuan, memberikan informasi kepada masyarakat bagi pengembangan daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) sebagai antidiabetes dan memberikan kontribusi dalam hal pengembangan ilmu pengetahuan di bidang farmasi untuk obat herbal.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Tanaman

1. Sistematika Tanaman Kacapiring

Tanaman kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) menurut Dalimartha (2005) memiliki sistematika kingdom : Plantae; divisi : Magnoliophyta; kelas : Magnoliopsida; ordo : Rubiales; genus : Rubiaceae; spesies : *Gardenia augusta* Merr; nama spesifik : *Gardenia jasminoides* J. Ellis.

2. Morfologi tumbuhan kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis)

Kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) banyak dipelihara sebagai tanaman hias atau pagar hijau yang memiliki aroma bunga harum. Kacapiring termasuk tanaman perdu yang berumur tahunan serta banyak memiliki cabang, ranting maupun daun yang lebat. Tumbuhan ini lebih cocok di daerah pegunungan atau lokasi yang tingginya lebih dari 400 di atas permukaan laut, bunganya berukuran besar dan batang pohonnya mampu mencapai ketinggian berkisar 1-2 meter. Bunga mirip dengan bunga mawar putih dengan tajuk-tajuk melingkar dan bersusun membentuk satu kesatuan yang anggun. Daunnya berbentuk oval, tebal, licin dan mengkilap pada permukaan telapak daun bagian atasnya (Thomas 1989).



Gambar 1. Tanaman Kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis)

3. Sinonim tanaman

Sinonim tanaman kacapiring (*Gardenia augusta* Merr) yaitu *Gardenia augusta* Merr, *Gardenia florida* L, *L Gardenia grandiflora* Sleb. Et Zucc., *Gardenia maruba* Sieb, *Gardenia pictorum* Hassk , *Gardenia Gardenia radicans* Thumb, *Verneria augusta* L (Dalimartha 2005)

4. Nama daerah

Gardenia jasminoides J. Ellis banyak tersebar di Indonesia. Sumatra: meulu bruek, raja putih (Aceh); bunga cina, kacapiring, bunga susu (Melayu); Jawa : kacapiring (sunda); kacapiring, ceplokiring (Jawa); kacapiring, peciring, cepiring, ceplokiring(Jawa); kacapiring, sangklapa (Maluku); jempiring (Bali) (Dalimartha 2005).

5. Nama asing

Cape jasmine, *Gardenia florida*, *Common garden* (Inggris), *San tza che*, *Zhi zi* (China).

6. Aktivitas dan kegunaan

Ekstrak etanol daun kacapiring dosis 792 mg/kg BB, yang diberikan secara oral pada tikus jantan Sprague Dawley yang 4 jam sebelumnya diinduksi dengan pepton menunjukkan efek antipiretik dengan pembanding asetosal dosis 300 mg/Kg BB secara oral dimana terjadi penurunan suhu sebesar 1,74⁰C setelah 4 jam pemberian. Penurunan suhu tersebut sebanding dengan kelompok kontrol asetosal sebesar 2⁰C setelah 3 jam pemberian (Rinawati *et al.* 2000)

Noffritasari 2006 menyatakan bahwa pengaruh pemberian infusa daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) terhadap kadar glukosa darah tikus Wistar yang diberi beban glukosa menunjukkan dosis 1,25 g/kgBB dan 2,50 g/kgBB dapat menurunkan kadar glukosa darah secara bermakna.

Wijayanti 2008 menyatakan jika pengaruh pemberian ekstrak daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) terhadap penurunan kadar glukosa darah pada tikus putih menunjukkan bahwa ekstrak daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) dengan dosis 2 g/KgBB memberikan efek penurunan kadar glukosa darah yang lebih baik dibandingkan dosis lainnya.

Faridah *et al.* 2011 diketahui potensi antidiabetes ekstrak etanol daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) pada tikus jantan putih galur Wistar dengan dosis 500 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB mampu menurunkan kadar glukosa darah 58,97% dan 80,60% dibandingkan Glibenklamid dosis 1,35 mg/kgBB menurunkan kadar glukosa darah 73,93%.

7. Kandungan tanaman kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis)

Daun kacapiring mengandung saponin, flavonoid, polifenol dan minyak atsiri. Buah mengandung minyak atsiri, gardenin ($C_{14}H_{12}O_5$), gardenosida, geniposida (genepin-i-glukosida), genipin-1-a-D-gentiobiosida, gardosida (S,10-dehidrologanin), skandosida metil ester, glikosida, α -sitosterol, α -manitol, nonakosan, krosetin, krosin ($C_{44}H_{64}O_{24}$), klorogenin, tannin, dan dekstrosa. Kulit buah mengandung asam ursolat. Batang dan akar mengandung asam oleanolat asetat, d-manitol, stigmasterol. Bunga mengandung minyak atsiri benzyl asetat, hidroksisitroneal dan eugenol. Gardenin adalah Kristal berwarna kuning emas, larut dalam alkohol dan kloroform (BPOM RI 2008).

7.1 Flavonoid. Senyawa flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbanyak di alam. Berdasarkan ikatannya dengan gula, flavonoid terdiri dari dua kelompok yaitu gloikosida yang berikatan dengan satu atau lebih molekul gula, dan yang lain yaitu aglikon adalah flavonoid yang tidak berikatan dengan gula. Kebanyakan flavonoid yang berasal dari tumbuh-tumbuhan adalah dalam bentuk glikosida (Williamson 2004). Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa phenolik dengan struktur kimia $C_6-C_3-C_6$. Kerangka flavonoid terdiri dari satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen (Redha 2010).

Mekanisme flavonoid sebagai antidiabetes yaitu dengan kemampuannya sebagai zat antioksidan. Flavonoid bersifat protektif terhadap kerusakan sel β sebagai penghasil insulin serta dapat meningkatkan sensitivitas insulin (Panjuantiningrum 2010). Antioksidan dapat menurunkan *Reactive Oxygen Spesies* (ROS). Dalam pembentukan ROS, oksigen akan berikatan dengan elektron bebas yang keluar karena bocornya rantai elektron. Reaksi antara oksigen dan elektron bebas inilah yang menghasilkan ROS dalam mitokondria

(Annisa *et al* 2014). Antioksidan pada flavonoid dapat menyumbangkan atom hidrogennya. Flavonoid akan teroksidasi dan berikatan dengan radikal bebas sehingga radikal bebas menjadi senyawa yang lebih stabil (Panjuantiningrum 2010).

7.2 Saponin. Saponin berasal dari bahasa latin “*sapo*” yang berarti sabun, diberi nama demikian karena sifatnya yang menyerupai sabun. Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat yang menimbulkan busa jika dikocok dalam air dan pada konsentrasi yang rendah sering menyebabkan hemolisis sel darah merah. Dalam larutan yang sangat encer saponin sangat beracun untuk ikan dan tumbuhan yang mengandung saponin telah digunakan sebagai racun ikan selama beratus-ratus tahun. Beberapa saponin juga bekerja sebagai antimikroba. Senyawa saponin dapat bersifat antibakteri dengan merusak membran sel. Rusaknya membran menyebabkan substansi penting keluar sel dan juga dapat mencegah masuknya bahan-bahan penting ke dalam sel. Jika fungsi membran sel dirusak maka akan mengakibatkan kematian sel (Monalisa *et al*, 2011). Oesman *et al* 2010 menyatakan bahwa saponin adalah senyawa polar yang keberadaannya dalam tumbuhan dapat diekstraksi dengan pelarut semi polar dan polar.

7.3 Tanin. Secara kimia terdapat dua jenis tanin, yaitu:

a. Tanin terkondensasi atau flavolan

Tersebar luas dalam tumbuhan angiospermae, terutama pada tumbuhan-tumbuhan berkayu. Nama lainnya adalah proantosianidin karena bila direaksikan dengan asam panas, beberapa ikatan karbon-karbon penghubung satuan terputus dan dibebaskanlah monomer antosianidin. Kebanyakan proantosianidin adalah prosianidin karena bila direaksikan dengan asam akan menghasilkan sianidin. Proantosianidin dapat dideteksi langsung dengan mencelupkan jaringan tumbuhan ke dalam HCl 2M mendidih selama setengah jam yang akan menghasilkan warna merah yang dapat diekstraksi dengan amil atau butil alkohol. Bila digunakan jaringan kering hasil tanin agak berkurang karena terjadinya pelekatan tanin pada tempatnya di dalam sel.

b. Tanin yang terhidrolisis

Terbatas pada tumbuhan berkeping dua. Terutama terdiri atas dua kelas, yang paling sederhana adalah depsida galoiglukosa. Pada senyawa ini glukosa dikelilingi oleh lima gugus ester galoil atau lebih. Jenis kedua, inti molekul berupa senyawa dimer asam galat, yaitu asam heksa hidroksidifenat yang berikatan dengan glukosa. Bila dihidrolisis menghasilkan asam angelat. Cara deteksi tanin terhidrolisis adalah dengan mengidentifikasi asam galat/asam elagat dalam ekstrak eter atau etil asetat yang dipekatkan (Harborne,1987).

7.4 Steroid /Terpenoid. Steroid adalah terpenoid yang kerangka dasarnya terbentuk dari sistem cincin siklopentana prehidrofenantrena. Steroid merupakan golongan senyawa metabolik sekunder yang banyak dimanfaatkan sebagai obat. Hormon steroid pada umumnya diperoleh dari senyawa-senyawa steroid alam.

Terpenoid merupakan komponen-komponen tumbuhan yang mempunyai bau dan dapat diisolasi dari bahan nabati dengan penyulingan yang disebut minyak atsiri. Minyak atsiri yang berasal dari bunga pada awalnya dikenal dari penentuan struktur secara sederhana, yaitu dengan perbandingan atom hidrogen dan atom karbon dari senyawa terpenoid yaitu 8:5 dan dengan perbandingan tersebut dapat dikatakan bahwa senyawa tersebut adalah golongan terpenoid.

B. Simplisia

1. Pengertian Simplisia

Simplisia adalah bahan baku alami yang digunakan untuk membuat ramuan obat tradisional yang belum mengalami pengolahan apapun kecuali proses pengeringan. Ditinjau dari asalnya, simplisia digolongkan simplisia nabati dan simplisia hewani. Simplisia hewani berasal dari hewan baik yang masih utuh organ-organnya maupun zat-zat yang dikandungnya yang berguna sebagai obat dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia nabati berasal dari tanaman baik yang masih utuh bagian-bagiannya maupun zat-zat nabati yang dipisahkan dari tanaman dan belum berupa zat kimia murni (Said 2009).

2. Pengumpulan simplisia

Simplisia yang digunakan adalah simplisia nabati dan bagian yang digunakan adalah daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) banyak dipelihara sebagai tanaman hias atau pagar hijau yang memiliki aroma bunga harum. Kacapiring termasuk tumbuhan perdu yang berumur tahunan serta banyak memiliki cabang, ranting maupun daun yang lebat. Tanaman kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) dipergunakan atau dimanfaatkan apabila tumbuhan tersebut memiliki daun setelah penanaman, tidak perlu menunggu beberapa bulan untuk dipanen ataupun dipergunakan (Herbie 2015).

3. Pengeringan Simplisia

Pembuatan simplisia dengan cara pengeringan dimaksudkan untuk menurunkan kandungan air dalam bahan. Jika kadar air dalam bahan masih tinggi dapat mendorong enzim melakukan aktifitasnya mengubah kandungan kimia yang ada dalam bahan menjadi produk lain yang mungkin tidak lagi memiliki efek farmakologi seperti senyawa aslinya. Hal ini tidak akan terjadi jika bahan yang telah dipanen segera dikeringkan sehingga kadar airnya rendah. Beberapa enzim merusak kandungan kimia yang telah lama dikenal antara lain hidrolase, oksidase, dan polimerase. Pengeringan dilakukan sedapat mungkin tidak merusak kandungan senyawa aktif dalam simplisia (Suyanti 2013).

Proses pemanasan selama pengeringan perlu diperhatikan, karena suhu yang tidak terkontrol dapat menyebabkan kerusakan pada bahan. Beberapa senyawa kimia yang mudah rusak karena panas diantaranya terpenoid, hidrokarbon, minyak atsiri, seskuiterpen lakton, senyawa-senyawa yang memiliki ikatan rangkap dan lain-lain (Ma'mun *et al.* 2006). Pada proses pengeringan simplisia bertujuan agar simplisia awet, dan dapat digunakan dalam jangka waktu yang lama (Suyanti *et al.* 2013)

4. Tahap Pembuatan Simplisia

Tahapan pembuatan simplisia sebagai berikut :

4.1 Pengumpulan bahan baku. Panen daun atau herba dilakukan pada saat proses fotosintesis berlangsung maksimal, yaitu ditandai dengan saat-saat

tanaman mulai berbunga mulai masak. Untuk pengambilan pucuk daun, dianjurkan diambil pada saat warna pucuk daun berubah menjadi daun tua (Gunawan & Mulyani 2004).

4.2 Sortasi basah. Kegiatan sortasi perlu dilakukan untuk membuang bahan lain yang tidak berguna atau berbahaya. Misalnya rumput, kotoran binatang, bahan-bahan yang busuk, dan benda lain yang bisa mempengaruhi kualitas simplisia (Suharmiati & Maryani 2004).

4.3 Pencucian. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah dan kotoran yang melekat atau menempel pada bahan simplisia. Simplisia yang mudah larut dalam air diharapkan pencucian dilakukan secepat mungkin. Pencucian tidak dapat membersihkan simplisia dari semua mikroba karena air pencucian yang digunakan juga biasanya masih mengandung jumlah mikroba. Cara sortasi dan pencucian sangat mempengaruhi jenis dan jumlah awal mikroba pada simplisia (Prasetyo & Inorih 2013).

4.4 Pengeringan. Tujuan pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama. Mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik dapat mencegah penurunan mutu atau kerusakan simplisia. Air yang masih tersisa dalam simplisia dengan kadar tertentu dapat menjadi media pertumbuhan kapang dan jasad renik lainnya hal yang perlu diperhatikan dalam proses pengeringan adalah suhu pengeringan, kelembapan udara, aliran udara, waktu pengeringan dan luas permukaan bahan (Depkes 1995).

Pengeringan simplisia dilakukan dengan menggunakan sinar matahari atau menggunakan alat pengering. Hal-hal yang perlu diperhatikan selama proses pengeringan adalah suhu pengeringan, kelembapan udara, aliran udara, waktu pengeringan dan luas permukaan bahan. Mengeringkan bahan simplisia tidak dianjurkan menggunakan alat atau bahan plastik karena kurang menyerang air (Suharmiati & Maryani 2004).

4.5 Sortasi kering. Sortasi kering merupakan tahapan akhir dalam penyiapan simplisia. Sortasi kering bertujuan untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tumbuhan yang tidak diinginkan atau pengotor-

pengotor lain yang masih tertinggal pada simplisia kering tersebut. Simplisia kemudian disimpan dalam wadah tertutup baik dan kedap udara yang bertujuan agar simplisia dapat tahan lama, terhindar dari lembab, dan bebas dari kontaminasi mikroba.

4.6 Pemeriksaan mutu. Pemeriksaan mutu fisis secara tepat meliputi : kurang kering atau mengandung air, termakan serangga atau hewan lain, ada tidaknya pertumbuhan kapang dan perubahan warna atau perubahan bau. Analisis bahan meliputi penetapan jenis konstituen (zat kandungan), kadar konstituen (kadar abu, kadar sari, kadar air, kadar logam), dan standarisasi simplisia. Kemurnian mutu simplisia meliputi kromatografi kinerja tinggi, lapis tipis, kolom, kertas, dan gas untuk menentukan senyawa atau komponen kimia tunggal dalam simplisia hasil metabolit primer dan sekunder tanaman (Gunawan 2004).

C. Metode Penyarian

1. Pengertian Penyarian

Penyarian adalah proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut dari suatu serbuk simplisia sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut. Terdapat beberapa metode penyarian dengan pelarut cair antara lain cara dingin yaitu maserasi dan perlokasi, serta cara panas yaitu refluks, sokletasi, digesti, infusa dan dekdok (Riza 2012).

2. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan zat aktif dari jaringan tanaman atau hewan dari bahan inaktif dan inert dengan menggunakan pelarut yang selektif dalam prosedur ekstraksi yang standar. Salah satu ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi secara refluks. Ekstraksi dengan cara refluks pada dasarnya ekstraksi berkesinambungan. Bahan yang akan diekstraksi direndam dengan cairan penyari dalam labu alas bulat yang dilengkapi dengan alat penegak, lalu dipanaskan sampai mendidih. Cairan penyari akan menguap, uap tersebut akan diembunkan dengan pendingin tegak dan akan kembali menyari zat aktif dalam simplisia tersebut demikian seterusnya. Ekstraksi ini biasanya dilakukan 3 kali dan setiap kali diekstraksi selama 4 jam (Handa *et al.* 2008).

3. Pelarut

Pelarut adalah suatu zat untuk melarutkan zat farmasi lain atau suatu obat dalam preparat larutan. Pemilihan pelarut yang akan digunakan dalam ekstraksi dari bahan mentah obat tertentu berdasarkan pada daya larut zat aktif dan zat tidak aktif (Ansel 2008).

Pemilihan cairan penyari harus mempertimbangkan banyak faktor, cairan penyari yang baik harus memenuhi kriteria murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, mudah menguap dan tidak mudah terbakar, selektif tidak mempengaruhi zat berkhasiat, dan diperbolehkan oleh peraturan. Penyarian dapat menggunakan penyari etanol 96%, etanol, etanol-air dan air.

D. Hewan Uji

1. Sistematika hewan uji

Taksonomi tikus putih (Krinke 2000) Kingdom : Animalia; Kelas : Mamalia; Sub kelas : Placentalia; Filium : Chordata; Sub filium : Vertebrata; Bangsa : Rodentia; Suku : Muridae; Marga : Rattus; Jenis : *Rattus novergus*

2. Biologi hewan uji

Hewan laboratorium atau hewan percobaan adalah hewan yang sengaja dipelihara dan diternakkan untuk dipakai sebagai hewan model guna mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratorium. Tikus termasuk hewan mamalia, oleh sebab itu dampaknya terhadap suatu perlakuan mungkin tidak jauh berbeda dibanding dengan mamalia lainnya. Selain itu, penggunaan tikus sebagai hewan percobaan juga didasarkan atas pertimbangan ekonomis dan kemampuan hidup tikus hanya 2-3 tahun dengan lama reproduksi 1 tahun.

Kelompok tikus laboratorium pertama-tama dikembangkan di amerika serikat antara tahun 1877 dan 1893. Keunggulan tikus putih dibandingkan tikus liar antara lain lebih cepat dewasa, tidak memperlihatkan perkawinan musiman, dan umumnya lebih cepat berkembang biak. Kelebihan lainnya sebagai hewan laboratorium adalah sangat mudah ditangani, dapat ditinggal sendirian dalam kandang asal dapat mendengar suara tikus lain dan berukuran cukup besar

sehingga memudahkan pengamatan. Secara umum, berat badan tikus laboratorium lebih ringan dibandingkan berat badan tikus liar. Biasanya pada umur empat minggu beratnya 35-40 g, dan berat dewasa rata-rata 200-250 g, tetapi bervariasi tergantung pada galur.

Terdapat beberapa galur tikus yang sering digunakan dalam penelitian. Galur-galur tersebut antara lain : Wistar, Sprague-dawley, long evans, dan Holdzman. Keuntungan utamanya adalah ketenangan dan kemudahan penanganannya (Smith & Mangkoewidjojo 1988).

3. Karakteristik hewan uji

Terdapat tiga galur atau varietas tikus yang memiliki kekhususan tertentu yang bisa digunakan sebagai hewan percobaan yaitu galur Sprague dawley berwarna albino putih, berkepala kecil, dan ekornya lebih panjang dari badannya, galur Wistar ditandai dengan kepala besar dan ekornya lebih pendek, dan galur long evans yang lebih kecil daripada tikus putih dan memiliki warna hitam pada kepala dan tubuh bagian depan (Malole & Pramono 1989).

Tikus yang digunakan dalam penelitian adalah galur Sprague Dawley berjenis kelamin jantan berumur kurang lebih 2 bulan. Tikus Sprague Dawley dengan jenis kelamin betina tidak digunakan Karena kondisi hormonal yang sangat fluktuatif pada saat mulai beranjak dewasa, sehingga dikhawatirkan akan memberikan respon yang berbeda dan dapat mempengaruhi hasil penelitian (Kesenja 2005). Tikus putih galur ini mempunyai daya tahan terhadap penyakit dan cukup agresif dibandingkan dengan galur lainnya (Harkness & Wagner 1983).

4. Teknik memegang dan penanganannya

Tikus cenderung menggigit jika ditangkap atau dipegang lebih-lebih jika takut. Tikus sebaiknya ditangkap dengan memegang ekor pada ekor pada dekat pangkalnya (bukan ujungnya), diangkat dan diletakkan diatas ram kawat, lalu ditarik pelan-pelan dan dengan cepat dipegang tengkuknya dengan ibu jari dan jari telunjuk dengan menggunakan tangan kiri, kaki belakang tikus dipegang bersama ekor dengan jari kelingking. Sambil menunggu sesaat sebelum tikus diletakkan diatas ram kawat dengan tetap memegang ekor tikus supaya tidak membalik pada tangan pemegang (Harminta 2004).

E. Diabetes Mellitus

1. Definisi Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) adalah gangguan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia yang berhubungan dengan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein yang disebabkan oleh penurunan sekresi insulin atau penurunan sensitifitas insulin, atau keduanya yang menyebabkan komplikasi kronis mikrovaskuler, makrovaskuler, dan neuropati.

Kriteria diagnosis diabetes mellitus adalah kadar glukosa puasa ≥ 126 mg/dL atau pada 2 jam setelah makan ≥ 200 mg/dL atau HbA1c $\geq 8\%$. Jika kadar glukosa 2 jam setelah makan > 140 mg/dL tetapi lebih kecil dari 200 mg/dL dinyatakan glukosa toleransi lemah (Sukandar *et al.* 2008)

Tabel 1. Kriteria diabetes mellitus

Waktu Pemeriksaan	Pemeriksaan	Bukan DM	Belum pasti DM	DM
Kadar glukosa darah sewaktu (mg/dL)	Plasma Vena	< 100	100-199	≥ 200
	Darah kapiler	< 90	90-199	≥ 200
Kadar glukosa darah puasa (mg/dL)	Plasma Vena	< 100	100-125	≥ 126
	Darah kapiler	< 90	90-99	≥ 100

Sumber : American Diabetes Association (ADA) (2014).

2. Klasifikasi Diabetes Mellitus

Klasifikasi dari jenis-jenis diabetes mellitus yaitu sebagai berikut :

2.1 DM tipe 1. Diabetes mellitus tipe 1 disebut juga diabetes mellitus tergantung insulin (insulin-dependent diabetes mellitus/IDDM), adalah diabetes yang disebabkan oleh gangguan autoimun dimana terjadi penghancuran sel-sel β pankreas penghasil insulin. Pasien biasanya berusaha dibawah 30 tahun, mengalami onset akut. Penyakit ini tergantung pada terapi insulin, dan cenderung lebih mudah mengakami ketosis (Rubenstein 2007).

2.2 DM tipe 2. Diabetes tipe 2 umumnya terjadi pada usia dewasa (diatas 40 tahun), meskipun memerlukan insulin tapi tidak tergantung insulin seumur hidup. Dalam banyak kasus diabetes tipe 2 ada hubungan dengan obesitas dan resistensi insulin pada jaringan peripheral. Walaupun pada awalnya bisa dikendalikan dengan diet dan obat hipoglikemik oral, banyak pasien yang akhirnya memerlukan insulin tambahan, sehingga menjadi penyandang diabetes tipe 2 yang membutuhkan insulin (Rubenstein 2007).

2.3 DM gestasional. Pada wanita hamil dengan penyakit gula regulasi glukosa yang ketat adalah penting sekali untuk menurunkan resiko akan keguguran spontan, cacat-cacat dan *overweight* bayi atau kematian perinatal (Rubenstein 2007).

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

3. Gejala Diabetes Mellitus

Diagnosis untuk diabetes mellitus berdasarkan gejala-gejala berupa polidipsi, polifagi, dan poliuria. Hasil pemeriksaan darah yang menunjukkan kadar glukosa darah tinggi (Mansjoer *et al* 1999). Diagnosis DM dapat dilakukan dengan cara yaitu tes kadar glukosa oral. Tes kadar glukosa darah plasma puasa dan uji toleransi glukosa oral. Tes kadar glukosa darah plasma puasa : penderita dikatakan DM bila kadar glukosa plasmanya lebih dari 140mg/dL yang menunjukkan 2 kali pemeriksaan, uji toleransi glukosa oral : hasil yang normal menunjukkan kadar glukosa pada keadaan puasa kurang dari 115 mg/dL. Kadar glukosa plasma 2 jam melebihi 200 mg/dL (Wooley & Wheland 1995).

4. Manifestasi klinik

Pasien dengan DM tipe 2 sering asimtomatik. Munculnya komplikasi dapat mengindikasikan bahwa pasien telah menderita DM selama bertahun-tahun, umumnya muncul neuropati. Pada diagnosis umumnya terdeteksi adanya alergi, poliuria, nokturia, dan polidipsia sedangkan penurunan bobot badan secara signifikan jarang terjadi (Sukandar *et al.* 2009).

5. Komplikasi Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus yang tidak terkontrol dengan baik dapat menimbulkan komplikasi akut dan kronis. Berikut ini akan diuraikan beberapa komplikasi yang sering terjadi dan harus diwaspadai (Depkes 2005).

5.1 Komplikasi kronik. Komplikasi jangka panjang biasanya terjadi setelah tahun ke-5 berupa : nefropati, retinopati, dan neuropati (Heriyannis 2012).

Nefropati diabetika (ND) merupakan salah satu komplikasi paling serius dari penyakit DM yang sebagian besar dapat menyebabkan gagal ginjal tahap-akhir. Prevalensi ND kira-kira 15-25% terjadi pada penderita DM tipe 1 dan 25-40% pada penderita DM tipe 2 (Joko *et al.* 2010).

Retinopati diabetik adalah salah satu komplikasi mikrovaskuler DM yang merupakan penyebab utama kebutaan pada orang dewasa. Kebutuan akibat retinopati DM menjadi masalah kesehatan yang diwaspadai di dunia karena kebutaan akan menurunkan kualitas hidup dan produktivitas penderita yang akibatnya menimbulkan beban sosial masyarakat (Ratna S 2011).

Neuropati merupakan salah satu komplikasi jangka panjang dari DM pada pembuluh darah kecil (mikroangiopati). Neuropati terdiri dari : neuropati perifer, otonom, proksimal dan fokal. Neuropati dapat bersifat polineuropati dan mono neuropati. Gejala umum neuropati perifer meliputi : distalarestesia, nyeri seperti kesakitan/terbakar, atau seperti tertusuk dan kaki terasa dingin. Manifestasi lain meliputi berkurangnya sensasi proteksi : nyeri, suhu, sentuhan gerakan (Eko E *et al.* 2013).

5.2 Komplikasi akut. Komplikasi jangka pendek (akut) yang sering terjadi adalah hipoglikemia dan ketoasidosis (Heriyannis 2012). Pada hipoglikemia, kadar glukosa plasma penderita kurang dari 50 mg/dL, walaupun pada orang-orang tertentu yang sudah menunjukkan gejala hipoglikemia pada kadar glukosa plasma diatas 50 mg/dL. Kadar glukosa darah yang terlalu rendah menyebabkan sel-sel otak tidak dapat pasokan energi sehingga tidak dapat berfungsi bahkan dapat rusak (Depkes 2005).

Hipoglikemia lebih sering terjadi pada penderita diabetes tipe 1, yang dapat dialami 1-2 kali perminggu. Dari hasil survei yang pernah dilakukan di Inggris diperkirakan 2-4% kematian pada penderita diabetes tipe 1 disebabkan oleh serangan hipoglikemia. Pada penderita diabetes tipe 2, serangan hipoglikemia lebih jarang terjadi, meskipun penderita tersebut mendapat terapi insulin (Depkes 2005).

Ketoasidosis diabetik (KAD) adalah keadaan dekompensasi kekacauan metabolik yang ditandai oleh trias hiperglikemia, asidosis, dan ketosis, terutama

disebabkan oleh defisiensi insulin absolut atau relatif. KAD dan *Hiperosmular Hyperglycemia State* (HHS) adalah 2 komplikasi akut metabolik diabetes mellitus yang paling serius dan mengancam nyawa. Kedua keadaan tersebut dapat terjadi pada Diabetes Mellitus 1 dan 2, meskipun KAD lebih sering dijumpai pada DM tipe 1. KAD mungkin merupakan manifestasi awal dari DM tipe 1 atau mungkin merupakan akibat dari peningkatan kebutuhan insulin pada DM tipe 1 pada keadaan infeksi, trauma, infark miokard, atau kelainan lainnya (Wira G 2010).

6. Antidiabetik oral

Obat untuk diabetes mellitus disebut antidiabetik oral (OAD) dibagi dalam berbagai golongan :

6.1. Golongan sulfonilurea. Sulfonilurea menstimulasi sel-sel β dari pulau Langerhans sehingga sekresi insulin ditingkatkan. Contoh obat golongan ini adalah tolbutamid, klorpropamida, glibenklamida, glipizida, glikidon, dan glimepiride (Tjay & Rahardja 2002).

Mekanisme kerja dari sulfonilurea adalah pelepasan insulin dari sel β , pengurangan kadar glukagon dalam serum dan efek ekstra pankreas untuk memperkuat kerja insulin pada jaringan targetnya (Katzung 1997).

Dosis awal yang dianjurkan sebaiknya dikurangi pada pasien lansia yang sudah mengalami kompromi fungsi renal dan liver. Dosis bisa dititrasi tiap 1-2 minggu (interval lebih panjang untuk chlorpropamide) untuk mendapatkan target glisemi (Dipiro 2008).

6.2. Meglitinide. Serupa dengan sulfonilurea, meglitinide menurunkan glukosa dengan merangsang sekresi insulin pankreas, tapi pelepasan insulin adalah tergantung glukosa dan akan hilang pada konsentrasi glukosa darah rendah. Ini bisa mengurangi potensi untuk hipoglisemi parah. Agen ini menghasilkan pelepasan insulin fisiologis lebih banyak dan lebih hebat menurunkan glukosa post-prandial dibandingkan dengan sulfonilurea durasi panjang sedangkan Rerata pengurangan HbA1C adalah 0,6-1 % (Dipiro 2008).

6.3. Biguanide. Mekanisme primer obat ini dengan mengurangi produksi glukosa hati melalui pengaktifan enzim *AMP-activated* protein kinase. Mekanisme mayor dengan penghambatan glukoneogenesis di ginjal, perlambatan

penyerapan glukosa di saluran cerna serta peningkatan konversi glukosa di eritrosit (Katzung 2012).

6.4. Inhibitor alfa glukosidase. Akarbose dan miglitol adalah inhibitor kompetitif alfa glukosidase usus serta mengurangi penyimpanan kadar glukosa paska makan dengan menunda pencernaan dan penyerapan tepung dan disakarida (Katzung *et al* 2012).

7. Stress oksidatif pada diabetes

Stress oksidatif adalah ketidakseimbangan antara radikal bebas atau peroksidan dan antioksidan yang dipicu oleh adanya dua kondisi umum yaitu kurangnya antioksidan serta kelebihan radikal bebas. Stress oksidatif dapat menyebabkan kerusakan oksidatif mulai dari tingkat sel, jaringan hingga ke organ tubuh, dan mengakibatkan terjadinya percepatan proses penuaan serta munculnya berbagai pathogenesis penyakit termasuk kanker (Benhar *et al.* 2002).

Stress oksidatif dan gangguan pertahanan oksidan merupakan keistimewaan DM yang terjadi sejak awal penyakit. Stress oksidatif memiliki kontribusi perburukan dan perkembangan kejadian komplikasi. Beberapa mengungkapkan penurunan status antioksidan dalam plasma dan serum sampel dibandingkan kontrol berdasarkan usia. Fenomena ini terjadi sejak anak-anak serta berjalan secara progresif dan memburuk sesuai perjalanan waktu dan berkembangnya komplikasi (Nuttal *et al.* 1999).

Glikasi protein nonenzimatik pada keadaan hiperglikemika menyebabkan produksi berbagai pereduksi diantaranya glukosa, glukosa-6-fosfat, dan fruktosa akan meningkat melalui proses glikolisis. Glukosa berperan sebagai gula pereduksi memiliki sifat 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 lurus merupakan aldehid (Rahbani-Nobar *et al.* 1999). Aldehid merupakan senyawa yang mampu berkaitan secara kovalen sehingga terjadi modifikasi protein. Modifikasi protein dapat dibangkitkan dalam tubuh melalui berbagai mekanisme enzimatik dan nonenzimatik (Anderson *et al.*

1999). Reaksi pengikatan aldehid pada protein disebut sebagai reaksi glikasi. Proses glikasi pada hewan dengan diabetes dapat teramati dengan luas pada berbagai organ dan jaringan termasuk ginjal, hati, otak, paru-paru dan saraf (Oldfield *et al.* 2001). Perubahan kimia secara keseluruhan dikenal sebagai reaksi Maillard (Beckman *et al.* 2001). Reaksi ini terdiri dari 4 tahap, meliputi kondensasi nonenzimatik gula pereduksi, aldehid atau ketosa dengan gugus amino bebas dari protein atau asam nukleat membentuk glikosilamin. Reaksi ini dikenal dengan satu serta secara ilmiah bersifat reversible dan terjadi dalam beberapa jam (kurang dari 24 jam). Kemudian 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 bersifat toksik bagi jaringan tetapi masih reversible. Kemudian pada fase ketiga, penataan ulang dan dehidrasi berganda produk Amadori menjadi amino atau senyawa karbonil reaktif 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 & Sudaryanti 1998; Carr & frei 1999; Soesilowati 2003).

F. Glibenklamid

1. Sifat fisika dan kimia glibenklamid

Glibenklamid merupakan obat golongan sulfonilurea generasi kedua yang diindikasikan dalam pengobatan oral untuk pasien diabetes mellitus tipe II. Glibenklamid atau gliburid diketahui juga sebagai *5-cloro-N-(4-N-(cyclohexylcarbamoyl) sulphamoyl)phenitil)-2-metoxybenzamide* yang secara kimia merupakan obat hipoglikemik oral. Kelarutan glibenklamid adalah praktis tidak larut dalam air dan dalam eter, sukar larut dalam methanol, dan larut sebagian dalam kloroform (Ashcroft 1992).

2. Mekanisme kerja

Glibenklamid bekerja terutama dalam peningkatan sekresi insulin. Mekanisme kerja glibenklamid yaitu dengan merangsang sekresi hormon insulin dari granul sel-sel β Langerhans pankreas. Interaksi dengan *ATP-sensitive K channel* pada membrane sel-sel β menimbulkan depolarisasi membrane dan keadaan ini akan membuka kanal Ca. setelah terbukanya kanal Ca, maka ion Ca^{2+} akan masuk kedalam sel β kemudian merangsang granula yang berisi insulin dan akan terjadi sekresi insulin (Suherman 2007).

Glibenklamid bersamaa dengan ekstrak daun salam memberikan potensiasi dalam menurunkan kadar glukosa darah, senyawa-senyawa yang terkandung dalam daun salam seperti saponin, fenolik, flavonoid, saponin, dan tannin memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang dapat menangkap radikal bebas yang dihasilkan dari reaksi oksidasi aloksan serta menurunkan stress oksidatif yang terjadi (Lelono *et al.* 2013).

3. Interaksi obat

Efek hipoglikemia glibenklamid meningkat seiring dengan pemberian beta bloker, H_2 -bloker, derivat kumarin, sulfonamide, tetrasiklin, salisilat, kloramfenikol, klorfibrat, dan MAO-inhibitor. Glibenklamid berpotensi menyebabkan efek antikoagulan warfarin. Kortikosteroid, fenotiazin, hormone estrojen dan kontrasepsi oral menyebabkan penurunan efek glibenklamid (anonim 2008).

4. Dosis dan aturan pakai

Dosis awal sehari 1 tablet sesudah makan pagi, setiap 7 hari ditingkatkan dengan sehari $\frac{1}{2}$ -1 tablet sampai kontrol metabolit yang optimal tercapai. Dosis awal untuk orang tua sehari 2,5 mg, dosis tertinggi sehari 3 tablet dalam dosis terbagi (ISO 2016).

5. Efek samping

Efek samping dari glibenklamid antara lain meliputi mual dan muntah, ikhterus kolestasis, agranulositosis, anemia aplastik dan hemolitik, reaksi hipersensitifitas umum dan reaksi dermatologis (Katzung 1997).

G. Antioksidan

1. Pengertian

Antioksidan adalah senyawa yang mampu menangkap atau meredam dampak negatif oksidan dalam tubuh. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan bisa dihambat (Sashikumar *et al.* 2009). Aktivitas antioksidan suatu senyawa dapat diukur dari kemampuannya meredam radikal bebas (Giorgio *et al.* 2000; Shinta *et al.* 2014). Radikal bebas yang biasa dipakai sebagai model dalam mengukur peredaman antioksidan adalah DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) karena cepat, sederhana dan mudah digunakan (Marxen, *et.al* 2007). Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat radikal bebas sehingga antioksidan dapat mencegah penyakit-penyakit yang dihubungkan dengan radikal bebas seperti karsinogenesis, kardiovaskular, dan penuaan (Gutteridge & Halliwell 2000).

Penderita diabetes memerlukan asupan antioksidan dalam jumlah besar karena peningkatan radikal bebas akibat hiperglikemia (Baynes, *et.al.*, 1999; Shinta, 2014). Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan sehingga mempunyai sifat tidak stabil, paramagnetik dan sangat reaktif. Sifat radikal bebas mirip dengan suatu oksidan yang mempunyai kecenderungan untuk menangkap elektron. Radikal bebas dapat menimbulkan perubahan DNA antara lain hidroksilasi timin dan sitosin, permukaan inti purin dan pirimidin, serta putusya rantai fosfodiester DNA. Perubahan DNA menimbulkan mutasi yang dapat menyebabkan kanker. Radikal bebas dapat merusak protein karena dapat bereaksi dengan asam amino sehingga protein kehilangan fungsi biologisnya (Sies 1993; Erawaty 2012).

2. Klasifikasi Antioksidan

Antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua bagian, yaitu antioksidan primer atau alami dan antioksidan sekunder atau sintetis

2.1 Antioksidan Primer atau alami. Antioksidan adalah zat yang dapat mencegah atau menghambat proses oksidasi sehingga membentuk senyawa yang lebih stabil. Antioksidan golongan Polifenol adalah kelompok yang paling banyak

terdapat dalam buah-buahan, sayuran, tanaman polongan, biji-bijian, teh, rempah-rempah dan anggur.

Berikut adalah pengelompokan antioksidan primer (Hurrell, 2003): Antioksidan mineral adalah kofaktor antioksidan enzim. Keberadaannya mempengaruhi metabolisme makromolekul kompleks seperti karbohidrat. Contoh: selenium, tembaga, besi, seng dan mangan. Antioksidan vitamin, dibutuhkan untuk fungsi metabolisme tubuh. Contoh: vitamin C, vitamin E, vitamin B. Fitokimia adalah senyawa fenolik, yang bukan vitamin maupun mineral. Senyawa yang termasuk ke dalam golongan fitokimia adalah senyawa flavonoid. Flavonoid adalah senyawa fenolik yang memberi warna pada buah, biji-bijian, daun, bunga dan kulit. Sebagai contoh katekin adalah senyawa antioksidan paling aktif pada teh hijau dan hitam, karotenoid adalah zat warna dalam buah-buahan dan sayuran, β karoten terdapat pada wortel dapat dikonversi menjadi vitamin A, likopen banyak terdapat dalam tomat dan zeaxantin banyak pada bayam.

2.1 Antioksidan Sekunder atau Sintetik. Senyawa antioksidan sintetik memiliki fungsi menangkap radikal bebas dan menghentikan reaksi berantai berikut adalah contoh antioksidan sintetik: *Butylated hydroxyl anisole (BHA)*, *Butylated hydroxytoluene (BHT)*, *Propyl gallate (PG)* dan *metal chelating agent (EDTA)*, *Tertiary butyl hydroquinone (TBHQ)*, *Nordihydro guaretic acid (NDGA)*. Antioksidan utama pada saat ini digunakan dalam produk makanan adalah monohidroksi atau polihidroksi senyawa fenol dengan berbagai substituen pada cincin (Hamid, A et al. 2010)

3. Jenis Antioksidan Alami

3.1 Vitamin C. Asam askorbat atau vitamin C adalah antioksidan monosakarida yang ditemukan pada tumbuhan. Asam askorbat adalah komponen yang dapat mengurangi dan menetralkan oksigen reaktif, seperti hidrogen peroksida (Antioksidan & Pencegahan Kanker 2007; Ortega 2006).

3.2 Flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa fenol yang dimiliki oleh sebagian besar tumbuhan hijau dan biasanya terkonsentrasi pada biji, buah, kulit buah, kulit kayu, daun, dan bunga (Miller 1996). Flavonoid memiliki kontribusi

yang penting dalam kesehatan manusia. (Hertog 1992) menyarankan agar setiap hari manusia mengkonsumsi beberapa gram flavonoid. Flavonoid diketahui berfungsi sebagai antimutagenik dan antikarsinogenik, selain itu memiliki sifat sebagai antioksidan, anti peradangan, anti alergi, dan dapat menghambat oksidasi LDL (Low Density Lipoprotein) (Rahmat, 2009).

3.3 Polifenol. Karakteristik antioksidan yang berasal dari bahan pangan dilihat dari kandungan polifenol. Polifenol merupakan salah satu kelompok yang paling banyak dalam tanaman pangan, dengan lebih dari 8000 struktur fenolik dikenal saat ini (Harborne, 1993). Polifenol adalah produk sekunder dari metabolisme tanaman.

3.4 Vitamin E. Vitamin E merupakan vitamin yang larut dalam lemak dan memiliki sifat antioksidan, diantara vitamin E, yang paling banyak dipelajari adalah β tokoferol karena memiliki ketersediaan hayati yang tinggi. Tokoferol dapat melindungi membran sel dari oksidasi oleh radikal bebas pada reaksi rantai peroksidasi lipid. Tokoferol dapat menghambat radikal bebas dan mencegah tahap reaksi propagasi. Reaksi ini menghasilkan radikal tokoferosil yang dapat diubah kembali ke bentuk kurang aktif melalui pemberian elektron dari antioksidan lainnya, seperti askorbat dan retinol (Herrera & Barbas 2001).

4. Mekanisme Kerja Antioksidan

Radikal bebas adalah molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya, radikal bebas sangat reaktif dan tidak stabil, sebagai usaha untuk mencapai kestabilannya radikal bebas akan bereaksi dengan atom atau molekul di sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini dalam tubuh dapat menimbulkan reaksi berantai yang mampu merusak struktur sel, bila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya. Untuk meredam aktivitas radikal bebas diperlukan antioksidan. Antioksidan adalah senyawa yang dapat mendonorkan elektronnya (pemberi atom hidrogen) kepada radikal bebas, sehingga menghentikan reaksi berantai, dan mengubah radikal bebas menjadi bentuk yang stabil.

Antioksidan pada makanan digunakan untuk mencegah atau menghambat proses oksidasi yang terjadi pada produk makanan misalnya lemak, terutama yang

mengandung asam lemak tidak jenuh, dapat teroksidasi sehingga menjadi tengik, selain itu berguna untuk mencegah reaksi *browning* pada buah dan sayuran (Hamid *et al.* 2010).

Pada tahap inisiasi terjadi pembentukan radikal bebas (R^*) yang sangat reaktif, karena (RH) melepaskan satu atom hidrogen, hal ini dapat disebabkan adanya cahaya, oksigen atau panas. Pada tahap propagasi, radikal (R^*) akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi (ROO^*). Radikal peroksi selanjutnya akan menyerang RH (misalnya pada asam lemak) menghasilkan hidroperoksida dan radikal baru. Hidrogen peroksida yang terbentuk bersifat tidak stabil dan akan terdegradasi menghasilkan senyawa-senyawa karbonil rantai pendek seperti aldehida dan keton (Nugroho, 2007).

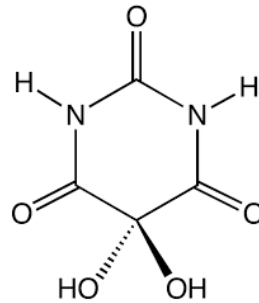
Tanpa adanya antioksidan, reaksi oksidasi lemak akan berlanjut sampai tahap terminasi, sehingga antar radikal bebas dapat saling bereaksi membentuk senyawa yang kompleks. Antioksidan memberikan atom hidrogen atau elektron pada radikal bebas (R^* , ROO^*), mengubahnya ke bentuk yang lebih stabil RH. Sementara turunan radikal antioksidan (A^*) memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal semula R^* (Yuswantina; Aulia, 2009).

Sistem antioksidan glutathion adalah sistem proteksi endogen yang utama, karena glutathion langsung terlibat dan berpartisipasi aktif dalam penghancuran senyawa reaktif oksigen (ROS) dan juga mempertahankan bentuk aktif dari vitamin C dan E. glutathion sebagai antioksidan intraseluler disebut juga master antioksidan karena glutathion mengatur kerja antioksidan lainnya. Glutathion menetralkan radikal bebas tersebut dan dibuang melalui urin dan empedu (Sugiyanto 2008).

H. Diabetogenik

Pemberian aloksan adalah cara yang cepat untuk menghasilkan kondisi diabetik eksperimental (hiperglikemik) pada binatang percobaan. Aloksan dapat diberikan secara intravena, intraperitoneal atau subkutan. Aloksan dapat menyebabkan diabetes melitus tergantung insulin pada binatang tersebut (aloksan diabetes) dengan karakteristik mirip dengan diabetes mellitus tipe 1 pada manusia.

Aloksan bersifat toksik selektif terhadap sel beta pankreas yang memproduksi insulin karena terakumulasinya aloksan secara khusus melalui transporter glukosa yaitu GLUT2 (Suharmiati 2009). Struktur aloksan dapat dilihat pada gambar 3 :



Gambar 2. Struktur kimia aloksan

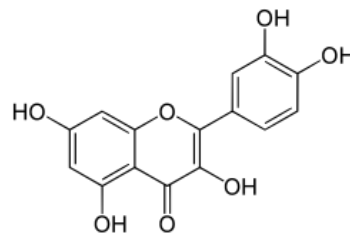
Aloksan secara cepat dapat mencapai pankreas, aksinya diawali oleh pengambilan yang cepat oleh sel β Langerhans. Pembentukan oksigen reaktif merupakan faktor utama pada kerusakan sel tersebut. Pembentukan oksigen reaktif diawali dengan proses reduksi aloksan dalam sel β Langerhans. Aloksan mempunyai aktivitas tinggi terhadap senyawa seluler yang mengandung gugus SH, glutation tereduksi (GSH), sistein dan senyawa sulfhidril terikat protein (misalnya *SH-containing enzyme*). Hasil dari proses reduksi aloksan adalah asam dialurat, yang kemudian mengalami reoksidasi menjadi aloksan, menentukan siklus redoks untuk membangkitkan radikal superoksida (Wilson *et al.*, 1984; Szkudelski 2001; Walde *et al.* 2002).

Faktor lain selain pembentukan oksigen reaktif adalah gangguan pada homeostatis kalsium intraseluler. Aloksan dapat meningkatkan konsentrasi ion kalsium bebas sitosolik pada sel β Langerhans pankreas. Efek tersebut diikuti oleh beberapa kejadian : influks kalsium dari cairan ekstraseluler, mobilisasi kalsium dari simpanannya secara berlebihan, dan eliminasinya yang terbatas dari sitoplasma. Influks kalsium akibat aloksan tersebut mengakibatkan depolarisasi sel β Langerhans, lebih lanjut membuka kanal kalsium tergantung voltase dan semakin menambah masuknya ion kalsium ke sel. Pada kondisi tersebut, konsentrasi insulin meningkat sangat cepat, dan secara signifikan mengakibatkan gangguan pada sensitivitas insulin perifer dalam waktu singkat. Selain kedua faktor tersebut di atas, aloksan juga diduga berperan dalam

penghambatan glukokinase dalam proses metabolisme energi (Szkudelski 2001; Walde *et al.* 2002).

I. Kuersetin

Kuersetin dikategorikan sebagai *flavonol*, salah satu dari enam subclass senyawa flavonoid. Kuersetin adalah aglikon. Aglikon merupakan komponen bukan gula sedangkan glikon adalah komponen gula. Berbagai flavonol dibuat oleh penempatan deferensial kelompok fenolik-OH dan gula (glikon). Semua flavonol, termasuk kuersetin memiliki kesamaan yaitu *3-hydroxyflavone* (Kelly 2011). Kuersetin memiliki banyak manfaat bagi kesehatan manusia antara lain antioksidan, antiinflamasi, antiplatelet, antikanker, antivirus, dan antihistamin (Paulsen 2003). Kuersetin dalam tanaman terdapat dalam berbagai bentuk glikosida dan dapat pula bentuk aglikonnya (Erlund 2002). Kuersetin mampu meningkatkan aktivitas enzim-enzim antioksidan seperti SOD (*superoksida dismutase*), *gluthation peroxidase* dan katalase sehingga memiliki efek protektif terhadap sel β pankreas (Youl *et al* 2010). Struktur kimia dari kuersetin dapat dilihat pada gambar 2 :



Gambar 3. Struktur kimia kuersetin

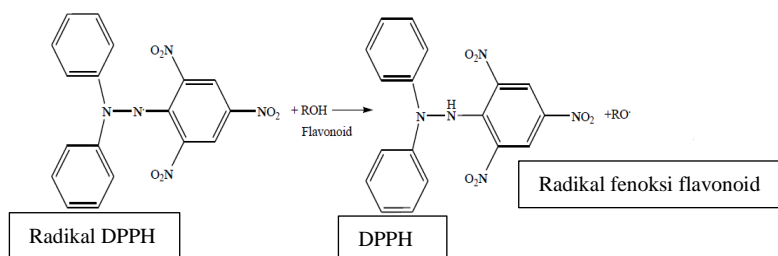
Terdapat penelitian yang menunjukkan bahwa kuersetin dapat meningkatkan sekresi insulin dan melindungi sel β pankreas dari kerusakan oksidatif yaitu (Hendrawati 2017) mengatakan bahwa efek perlindungan kombinasi kuersetin dan omega-3 terhadap sel β pankreas terhadap tikus diabetes mellitus tipe-2 dengan dosis kombinasi kuersetin 80 mg/Kg BB/ hari dan omega-3 400 mg/Kg BB/hari mampu menurunkan tingkat kerusakan sel β pankreas paling baik secara bermakna jika dibandingkan kombinasi dosis kecil maupun tanpa kombinasi.

J. Metode Uji Antioksidan In Vitro

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

1. Metode *DPPH*

Metode *DPPH* merupakan metode yang cepat, sederhana, dan tidak membutuhkan biaya yang tinggi dalam menentukan kemampuan antioksidan menggunakan radikal bebas *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)*. Metode ini sering digunakan untuk menguji senyawa yang berperan sebagai *free radical scavengers* mengevaluasi aktivitas antioksidannya, serta mengkuantifikasi jumlah kompleks radikal-antioksidan yang terbentuk. *DPPH* dapat digunakan untuk sampel yang berupa padatan maupun cairan (Prakash *et al.* 2001).



Gambar 4. Mekanisme penghambatan radikal bebas *DPPH*

Gugus kromofor dan auksokrom pada radikal bebas *DPPH* memberikan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 517 nm sehingga menimbulkan warna ungu. Warna *DPPH* akan berubah dari ungu menjadi kuning seiring penambahan antioksidan yaitu saat elektron tunggal pada *DPPH* berpasangan dengan hydrogen dari antioksidan. Hasil dekolorisasi oleh antioksidan setara dengan jumlah elektron yang tertangkap (Dehpour *et al.* 2009)

2. Metode *ABTS*

Metode *ABTS* (*2,2-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid*) merupakan *substrate peroxidase* yang dapat dioksidasi oleh H_2O_2 (hydrogen peroksida) membentuk radikal kation. Metode ini digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada makanan atau minuman. Secara kimia, reagen *ABTS* bersifat stabil, larut dalam air, dan lipid. Aktivitas penghambatan oleh antioksidan

terlihat dari semakin hilangnya warna *ABTS* yang diukur absorbansinya dengan spektrofotometer (Halliwell 2000).

3. Metode *FRAP*

Prinsip metode *FRAP* (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) adalah berdasarkan kerja dari reduksi analog ferroin, kompleks Fe^{3+} dari tripiridiltriazin $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{3+}$ menjadi kompleks Fe^{2+} . Fe^{2+} jika ditambahkan antioksidan pada suasana asam akan berwarna biru. Hasil pengujian diinterpretasikan dengan peningkatan absorbansi pada panjang gelombang 593 nm (Michael 2002).

4. Metode *TRAP*

Prinsip metode *TRAP* (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*) adalah berdasarkan pengukuran penggunaan oksigen selama reaksi oksidasi lipid terkontrol yang diinduksi oleh hasil dekomposisi dari *AAPH* (*2-2'-Azobis (2-aminidipropana) hidroklorida*) untuk mengukur aktivitas antioksidan.

K. Enzim Glutation Peroksidase

Aktivitas enzim glutathione peroksidase mampu mereduksi 70% peroksida organik dan lebih dari 90% H_2O_2 . Enzim glutathione peroksidase yang ditemukan dalam sitoplasma tersebut merupakan tetramer, dan mengandung selenosistein pada sisi aktifnya. Enzim ini bersifat nukleofilik, yang sangat mudah terionisasi dan mengakibatkan terlepasnya proton.

Aktivitas enzim glutathione peroksidase juga ditemukan dalam mitokondria, plasma, dan saluran pencernaan. Dalam sitoplasma, enzim glutathione peroksidase bekerja pada membran fosfolipid yang teroksidasi sehingga dikenal juga sebagai hydroperoxide glutathione peroxidase. Enzim glutathione peroksidase juga dapat langsung mereduksi hidropoksida kolesterol, ester kolesterol, lipoprotein, dan fosfolipid yang teroksidasi dalam membran sel. Aktivitas enzim tersebut dapat juga diinduksi oleh keadaan hiperoksia (Asikin, 2001).

Enzim glutathione peroksidase bersama glutathione reduktase (suatu flavoprotein) dan NADPH merupakan bagian dari siklus redoks glutathione yang berperan untuk mempertahankan kadar glutathione. Kelainan pada siklus tersebut bermanifestasi pada penyakit anemia hemolitik.

Pada penderita nekrosis hati dan penyakit degeneratif, aktivitas glutathion peroksidase rendah karena terjadi defisiensi selenium. Sementara pada penderita alergi, aktivitas glutathion peroksidase sel darah merah meningkat 2 kali dibandingkan dengan kontrol, yaitu 16 U/g Hb. Aktivitas enzim ini juga dapat diinduksi oleh antioksidan sekunder isoflavon.

L. Metode Uji Antioksidan In Vivo Terhadap Glutathion Peroksidase

Glutathion 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 *selenocystein*.

Metode pemeriksaan yang dilakukan adalah metode enzimatik dengan menggunakan glutathion peroksidase. Glutathion peroksidase (GPx) mengkonversi glutathion tereduksi (GSH) menjadi glutathion teroksidasi (GSSH) sekaligus mengurangi hidroperoksida lipid ke beberapa koresponden alkohol atau hydrogen peroksida bebas ke air. Beberapa isozim telah ditemukan di berbagai lokasi seluler dan spesifitas substrat yang berbeda. Rendahnya GPx telah berkorelasi dengan gangguan terkait radikal bebas. Dalam glutathion Assay, GPx mereduksi *cumene Hydroperoxide* saat terjadi perubahan GSH ke GSSH. Selanjutnya GSSH yang dihasilkan direduksi menjadi GSH oleh GR dengan mengonsumsi NADPH. Penurunan NADPH (biasanya diukur pada panjang gelombang 340 nm) sebanding dengan aktivitas GPx (Biovision 2012)

M. Spektrofotometer UV-Vis dan Absorbansi

Spektrofotometer UV-Vis merupakan alat analisis sampel dengan menggunakan prinsip-prinsip absorbansi radiasi gelombang elektromagnetik oleh bahan untuk panjang gelombang sinar ultraviolet sampai sinar yang tampak. Fungsi spektrofotometer UV-Vis adalah untuk menentukan kandungan zat organik dan anorganik secara kualitatif dan kuantitatif dalam suatu larutan. Prinsip kerjanya berdasarkan penyerapan cahaya atau energi radiasi oleh suatu larutan.

Jumlah cahaya atau energi yang diserap memungkinkan pengukuran jumlah zat penyerap dalam larutan (Teti 1985).

Absorbansi adalah banyaknya jumlah cahaya atau energi radiasi yang diserap oleh partikel yang terdapat pada larutan. Besarnya absorbansi dinyatakan dalam hukum Lambert-Beer. Hukum tersebut menyatakan bahwa jumlah radiasi cahaya tampak, sinar ultraviolet, dan cahaya-cahaya lain diserap atau ditransmisikan oleh suatu larutan (Gandhimathi *et al.* 2012).

N. Landasan Teori

Salah satu tanaman yang memiliki potensi sebagai antioksidan alami untuk pengobatan diabetes mellitus adalah daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis). Daun kacapiring merupakan tanaman yang tumbuh di Madiun Jawa Timur. Penggunaan daun kacapiring oleh masyarakat Madiun masih bersifat pemanfaatan secara tradisional. Bagian kacapiring yang sering dimanfaatkan sebagai pengobatan adalah bagian daunnya. Daun kacapiring mempunyai kandungan flavonoid.

Antioksidan yang meningkat didalam tubuh dapat menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tak reaktif yang relatif stabil. Senyawa antioksidan mampu mengontrol kadar glukosa darah dan mencegah komplikasi diabetes mellitus. Hal ini dilihat dari adanya aktivitas antioksidan dan hipoglikemik dari senyawa aktif dari golongan flavonoid pada tanaman.

Penyakit yang berhubungan dengan radikal bebas adalah diabetes mellitus. 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. Jumlah produksi dari senyawa oksigen yang semakin meningkat mengakibatkan terjadinya stress oksidatif yang berkontribusi pada pemburukan dan perkembangan kejadian komplikasi pada penyakit diabetes mellitus.

Pengujian antioksidan pada daun kacapiring dapat dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo*. Pada pengujian secara *in vitro* dapat menggunakan metode *DPPH* ketika bereaksi dengan senyawa antioksidan akan berubah menjadi *DPPH* hidrasin yang berwarna kuning dengan tingkat perubahan warna dari ungu menjadi warna kuning menunjukkan bahwa radikal bebas *DPPH* menjadi *DPPH* hidrasin yang stabil yang dinyatakan dalam IC_{50} yaitu konsentrasi dari antioksidan yang dapat meredam atau menghambat 50 % radikal bebas. Pengujian secara *in vivo* dapat dilakukan dengan status oksidan endogen salah satunya terhadap enzim glutation peroksidase berfungsi sebagai antioksidan yang mengandung selenium dimana mengubah H_2O_2 jika kadar glukosa tinggi sedangkan aktivitas glutation peroksidase rendah maka dapat terjadi gangguan metabolisme lipid karena aktivitas lemak yang tinggi menyebabkan retensi di reseptor insulin yang ada di sel-sel tubuh. Enzim glutation peroksidase pada jaringan hepar tikus hiperglikemia yang diinduksi dengan aloksan serta melihat dosis efektif dapat meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase paling kuat. Enzim glutation peroksidase berperan penting dalam melindungi sel, melalui peroksida organik yang terbentuk dalam oksidasi lemak dan asam lemak.

O. Hipotesis

Berdasarkan uraian sebelumnya, dapat disusun hipotesis sebagai berikut :

Pertama, ekstrak etanol daun kacapiring memiliki aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas *DPPH* yang dinyatakan dalam nilai IC_{50} .

Kedua, ekstrak etanol daun kacapiring meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase pada tikus yang diinduksi aloksan.

Ketiga, ekstrak etanol daun kacapiring 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 daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) yang diambil dari Madiun, Jawa Timur.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) dalam keadaan kering.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini adalah aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol daun kacapiring terhadap radikal bebas *DPPH*.

Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah aktivitas dari ekstrak etanol daun kacapiring dalam berbagai variasi dosis terhadap aktivitas enzim glutathion peroksidase pada tikus jantan diabetes.

Variabel utama ketiga pada penelitian ini adalah tikus putih jantan jalur 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 daun kacapiring yang diberikan pada tikus dengan berbagai variasi dosis.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah aktivitas enzim glutathion peroksidase pada hewan uji setelah diberi perlakuan menggunakan ekstrak etanol daun kacapiring pada kelompok uji, kontrol negatif, dan kontrol positif, serta aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas *DPPH*.

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

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) merupakan daun yang diperoleh dari Madiun, Jawa Timur, dengan kondisi segar masih berwarna hijau dan dipetik dalam keadaan bebas dari penyakit.

Kedua, serbuk daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) merupakan serbuk yang berasal dari daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* Ellis) yang telah dikeringkan, digiling, dan diayak dengan ayakan no mesh 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) adalah ekstrak kental yang diperoleh dari hasil refluks serbuk daun kacapiring dengan pelarut etanol 96%, selanjutnya dipekatkan menggunakan *vacum evaporator* hingga diperoleh ekstrak pekat dari daun kacapiring.

Keempat, aktivitas antioksidan secara *in vitro* dengan menggunakan metode penangkapan radikal bebas *DPPH*. Aktivitas antioksidan merupakan kemampuan dari ekstrak etanol daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) dalam menangkap radikal bebas *DPPH* yang dinyatakan dengan nilai *IC₅₀*.

Kelima, tikus hiperglikemia adalah tikus jantan yang berumur 2-3 bulan dengan berat sekitar 180-220 g yang mengalami hiperglikemia akibat induksi aloksan dengan kadar glukosa darah > 200 mg/dL.

Keenam, glutation merupakan antioksidan yang berperan dalam fungsi imun dan diekspresikan secara genetik oleh urutan gen yang membentuk protein enzim *glutation peroksidase* (GPx1). Aktivitas glutation peroksidase ditetapkan dari data supernatant hati menggunakan enzim glutation peroksidase.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1. Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) dari Madiun, Jawa Timur.

1.2. Bahan uji farmakologi. Bahan uji farmakologi yang digunakan pada penelitian ini adalah glibenklamide, aloksan (Sigma Aldrich), NaCl 0,9%, air suling, phosphate buffer, GSH, *glutation peroksidase assay kit (GPx Assay Buffer, NADPH (lyophilized), Glutathione Reductase, Glutathione (GSH, lyophilized), Cumene Hydroperoxide, GPx Positive Control (lyophilized), DPPH (1,1 difenil-2-pikrihidrazil)*, kuersetin, etanol 96 % dan etanol 96% p.a.

2. Alat

Alat yang dipakai untuk membuat simplisia daun kacapiring adalah penghalus yang berfungsi untuk menghancurkan dan menghaluskan daun kacapiring, oven, mesin penggiling, ayakan nomor mesh 40. Alat penyari untuk daun kacapiring yang digunakan antara lain alat-alat gelas, peralatan refluks, *vakum rotary evaporator*. Alat yang digunakan untuk mengukur kadar air daun kacapiring adalah *sterling-bidwell*, alat-alat gelas, timbangan elektrik neraca digital serta batang pengaduk. Alat yang digunakan untuk perlakuan pada hewan uji yaitu timbangan, spuit oral, jarum suntik, pipa kapiler dan kandang tikus. Alat untuk pengujian glutathion peroksidase yaitu lemari beku -80°C , spektrofotometer UV-Vis, tabung EDTA LOT, setrifugase eppendorf, *microsentrifugase tube eppendorf*, *Mikropipet Eppendorf* dan vortex.

3. Hewan uji

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih jalur Wistar kelamin jantan dengan umur 2-3 bulan serta berat badan rata-rata 180-220 g sebanyak 30 ekor tikus yang sudah di induksi aloksan dengan kadar gula darah > 200 mg/dL dan 5 ekor tikus sehat. Semua tikus dipelihara dengan perlakuan yang sama, mendapat diet yang sama, ukuran kandang yang sesuai dengan temperatur $21-24^{\circ}\text{C}$.

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

Pengambilan darah pada bagian ekor tikus pada saat masih hidup tanpa anastesi karena untuk mencegah terjadinya pengaruh pelarut anastesi pada organ

dalam tikus seperti hati dan akan diambil darah secara berulang untuk uji kadar glukosa. Terlebih dahulu ekor tikus digosok-gosok atau dihangatkan dengan air hangat agar pembuluh darah dapat dilakukan dengan jarum suntik pada setiap ekor tikus pengambilan darah selalu dilakukan pembilasan dengan kapas berakohol dari setiap ekor tersebut sebelum dan sesudah pengambilan darah. Uji aktivitas enzim glutation peroksidase, tikus dibunuh secara *cervical dislocation* (dislokasi leher) dengan memposisikan tikus pada papan bedah menggunakan *pins* dan pastikan tubuh tikus terfiksasi dengan baik pada papan sehingga memudahkan tahap pembedahan. Kemudian cukur bulu tikus pada bagian perut hingga leher lalu bersihkan sisa bulu dengan kapas, bedah mulai dari bagian perut menggunakan gunting bengkok sampai pada bagian leher lalu ambil dan pisahkan masing-masing organ menggunakan gunting lurus dan pinset (organ yang diambil : hepar) pastikan organ yang diambil tidak tercampur dengan organ lain.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi daun kacapiring

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) yang bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis). Yang dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada pada daun kacapiring yang dibuktikan di laboratorium Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret (UNS).

2. Pengambilan dan pembuatan serbuk daun kacapiring

Sampel penelitian yang digunakan adalah daun kacapiring yang diperoleh dari Madiun, Jawa Timur. Sampel daun kacapiring yang diperoleh disortasi basah lalu di cuci. Kemudian sampel dikering anginkan dibawah sinar matahari, lalu dilakukan sortasi kering dan diserbukkan.

3. Penetapan kadar air ekstrak daun kacapiring

Ekstrak ditimbang 5 gram, dimasukkan ke dalam labu kering. Dimasukkan lebih kurang 200 ml toluena jenuh air ke dalam labu, pasang rangkaian alat. Dimasukkan toluena jenuh air ke dalam tabung penerima melalui pendinginan

sampai leher alat penampung. Labu dipanaskan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluena mulai mendidih, atur penyulingan dengan kecepatan lebih kurang dari 2 tetes tiap detik, hingga sebagian besar air tersuling, kemudian naikan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima didinginkan sampai suhu ruang. Volume air dibaca setelah air dan toluena memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b (Depkes 2008).

4. Pembuatan ekstrak etanol daun kacapiring

Serbuk daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) ditimbang 50 g secara refluks dengan 100 ml pelarut etanol 96 % sampai serbuk simplisia terendam kurang lebih 2 cm diatas permukaan simplisia atau 2/3 dari volume labu, kemudian labu alas bulat dipasang kuat pada statif pada waterbath lalu kondesor dipasang pada labu alas bulat yang dikuatkan dengan klem dan statif. Aliran air panas (water bath) dijalankan sesuai dengan suhu 78,5°C. Setelah 4 jam dilakukan penyarian filtratnya ditampung pada wadah penampung dan ampasnya ditambah lagi dengan etanol 96 % dan dikerjakan seperti semula ekstraksi dilakukan 3-4 jam. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan dengan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50°C, kemudian hasilnya disebut ekstrak etanol daun kacapiring.

5. Susut pengeringan ekstrak daun kacapiring

Ekstrak ditimbang secara seksama sebanyak 1 gram sampai 2 gram dalam botol timbang dangkal tertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Sebelum ditimbang ekstrak diratakan dalam botol timbang, dengan menggoyangkan botol hingga lapisan setebal kurang lebih 5 mm sampai 10 mm. kemudian dimasukkan dalam ruang pengering, biarkan botol dalam keadaan tertutup mendingin dalam eksikator pada suhu kamar. Kemudian dikeringkan kembali pada suhu penetapan hingga bobot tetap dan dinyatakan dalam % bobot per bobot (Depkes RI 2000).

$$\text{susut pengeringan} = \frac{\text{berat sebelum pengeringan} - \text{berat akhir}}{\text{berat sebelum pemanasan}} \times 100 \%$$

6. Bobot jenis ekstrak kental 1 % daun kacapiring

Ditimbang piknometer dengan volume tertentu dalam keadaan kosong. Piknometer yang akan digunakan dikalibrasi terlebih dahulu dengan aquadest pada suhu 25°C. Kemudian piknometer diisi penuh dengan air dan ditimbang ulang. Kerapatan air dapat ditetapkan. Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak kental yang telah diencerkan dengan etanol 96 % sehingga konsentrasi ekstrak kental tersebut 1 %. Kemudian piknometer dikosongkan dan diisi penuh dengan ekstrak kental 1% kemudian ditimbang. Melalui berat ekstrak yang mempunyai volume tertentu sehingga dapat ditetapkan kerapatan ekstrak. Melalui berat ekstrak yang mempunyai volume tertentu sehingga dapat ditetapkan kerapatan ekstrak. Bobot jenis ekstrak ditetapkan dengan rumus sebagai berikut :

$$BJ \text{ ekstrak cair} = \frac{\text{bobot ekstrak kental 1\%}}{\text{bobot air}} \times B_j \text{ air}$$

7. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun kacapiring

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk memastikan kebenaran zat kimia yang terkandung di dalam daun kacapiring. Identifikasi senyawa meliputi senyawa flavonoid, saponin, minyak atsiri dan polifenol.

Pada identifikasi senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun kacapiring berdasarkan reaksi warna menggunakan tabung reaksi dan bahan-bahan seperti berikut :

7.1 Identifikasi flavonoid. Sebanyak 0,1 sampel dimasukkan kedalam gelas piala kemudian ditambahkan 10 ml aquades dipanaskan sampai mendidih selama 5 menit. Setelah itu, disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan serbuk Mg 0,1, HCl pekat 5 tetes dan 20 tetes amilalkohol kemudian dikocok dengan kuat. Uji positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amilalkohol. (Sarker 2006)

7.2 Identifikasi saponin. Sebanyak 0,1 gr sampel dimasukkan kedalam gelas piala kemudian ditambahkan 10 ml air panas dan dididihkan selama 5 menit. Setelah itu, disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat dimasukkan kedalam tabung reaksi tertutup kemudian dikocok selama ± 10 detik

dan dibiarkan selama 10 menit, ditambahkan 1 ml HCL 2M. Adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil (Robinson 1995).

7.3 Identifikasi Tanin. Sebanyak 0,1 gr sampel ditambahkan dengan 10 ml air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring. Sebagian filtrat yang diperoleh ditambahkan dengan larutan FeCl_3 1% 5 tetes. Hasil positif ditunjukkan oleh terbentuknya warna hijau kehitaman (Ratna & Tria 2009).

7.4 Identifikasi Triterpenoid/Steroid. Sebanyak 0,1 gr sampel dilarutkan dengan metanol kemudian di uapkan diatas waterbath. Filtrat digerus kemudian dilarutkan dengan 2 ml kloroform dalam tabung reaksi, lalu ditambah dengan anhidra asetat sebanyak 20 tetes, ditambah dengan asam asetat 10 tetes selanjutnya larutan ditetesi dengan H_2SO_4 pekat \pm 3 tetes melalui dinding tabung reaksi. Jika hasil yang diperoleh berupa cicin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpen, sedangkan munculnya warna hijau menunjukkan adanya steroid (Harbone 1987).

8. Uji aktifitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH

8.1 Penyiapan larutan DPPH 80 $\mu\text{g/ml}$. Larutan peraksi DPPH 80 $\mu\text{g/ml}$ dibuat dengan cara menimbang 8 mg serbuk DPPH yang kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml dan ditambahkan etanol 96 % p.a ke dalam labu takar sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 80 $\mu\text{g/ml}$.

8.2 Penyiapan larutan ekstrak daun kacapiring. Pembuatan larutan stok ekstrak daun kacapiring dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$. Dibuat dengan cara menimbang ekstrak kental secara teliti kemudian dilarutkan dengan etanol 96 % p.a sampai larut dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, selanjutnya ditambah etanol 96 % p.a sampai tanda batas. Kemudian dibuat larutan seri konsentrasi ekstrak daun kacapiring 20 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 60 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, dan 100 $\mu\text{g/ml}$.

8.3 Penyiapan larutan kuersetin. Pembuatan larutan stok kuersetin dibuat dengan konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$. Dengan cara menimbang 5 mg kuersetin kemudian dilarutkan dengan etanol 96 % p.a sampai larut dan dimasukkan dalam labu ukur 100 ml, kemudian ditambah etanol 96 % p.a sampai tanda batas. Lalu

dibuat larutan dengan seri konsentrasi 2 µg/ml, 4 µg/ml, 6 µg/ml, 8 µg/ml, dan 10 µg/ml.

8.4 Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH untuk uji aktivitas antioksidan dari ekstrak daun kacapiring dilakukan dengan 2 ml larutan *DPPH* 80 µg/ml lalu ditambah 2 ml etanol 96 % p.a dikocok sampai homogen dan diamati serapan pada rentang 500-525 nm dengan menggunakan blanko etanol 96 % p.a.

8.5 Penentuan *operating time*. Penentuan *operating time* dilakukan dengan 2 ml larutan *DPPH* 80 µg/ml ditambah dengan 2 ml etanol 96 % p.a, dikocok sampai homogen dan diamati serapannya pada panjang gelombang 517 nm, dibaca mulai dari menit 0 sampai menit didapatkan nilai absorbansi yang stabil pada menit tertentu. Pada penentuan *operating time* dapat ditentukan dari grafik antara waktu pembacaan dan absorbansi.

8.6 Uji aktivitas antioksidan. Setiap konsentrasi larutan dipipet sebanyak 2 ml, kemudian ditambahkan dengan 2 ml larutan pereaksi *DPPH* 80 µg/ml dalam vial, kemudian dikocok, dibiarkan pada tempat gelap selama 30 menit lalu diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan (517 nm). Percobaan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Pengamatan terhadap larutan kontrol dari 2 ml metanol ditambah 2 ml *DPPH* 80 µg/ml.

8.7 Analisis data. Hasil pengukuran absorbansi yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung prosentase aktivitas penangkapan radikal bebas dari berbagai konsentrasi uji. Harga IC_{50} dihitung dari persamaan regresi linier antara probit dari persen (%) peredaran radikal (% radikal) versus logaritma berbagai konsentrasi uji. Rumusan prosentase uji sebagai berikut :

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

9. Uji aktivitas antioksidan terhadap glutathion peroksidase

9.1. Penentuan dosis glibenklamid. Dosis glibenklamid pada manusia dengan berat badan 70 kg adalah 5 mg. pemberian pada manusia 70 kg dikonversikan pada tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018. Diperoleh dosis glibenklamid 0,09 mg/ 200 g BB tikus.

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

9.3. Ekstrak etanol daun kacapiring. Dosis yang diberikan pada tikus mengacu pada dosis pemakaian daun kacapiring menurut jurnal penelitian terdahulu dengan dosis yang diberikan kepada tikus dalam penelitian ini yaitu dosis I 250 mg/kgBB, dosis II 500 mg/kgBB, dan dosis III 1 g/kgBB pemberian ekstrak etanol daun kaca piring tergantung berdasarkan berat badan masing-masing dari tikus.

9.4. Pembuatan Bahan uji. Pembuatan bahan uji yang terdiri dari :

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

9.4.2. Kuersetin. Suspensi kuersetin 4 mg/ml dibuat dengan cara melarutkan serbuk kuersetin sebanyak 4 mg dalam CMC Na 0,5 % sampai volume 100 ml.

9.4.3. CMC Na 0,5 %. Larutan CMC Na dengan 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 hingga homogen.

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

9.4.5. Ekstrak etanol daun kacapiring. Suspensi ekstrak etanol daun kacapiring dalam CMC Na 0,5% dibuat dengan cara mensuspensikan sejumlah gram bahayang telah ditimbang seksama kedalam CMC Na 0,5% disesuaikan dengan volume maksimal yang bisa diberikan pada tikus.

9.5 Penentuan hewan uji. Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan galur Wistar dan tidak cacat dengan berat antara 180-250 gram sebanyak 30 ekor yang kemudian dibagi menjadi 6 kelompok, dengan masing-masing

kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Tikus-tikus tersebut kemudian adaptasi selama satu minggu dan diinduksi aloksan hingga hiperglikemia dengan kadar gula darah > 200 mg/dL.

9.6 Perlakuan hewan uji. Tikus yang telah diadaptasi dengan lingkungan sekitar kemudian ditimbang. Rancangan penelitian dilakukan terhadap 7 kelompok tikus masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus yang meliputi 6 kelompok tikus diabetes dan 1 kelompok tikus sebagai kontrol normal.

Kelompok 1 : kontrol tikus hiperglikemia

Kelompok 2 : kontrol pembanding tikus diberikan glibenklamid 0,45 mg/KgBB

Kelompok 3 : kontrol pembanding tikus diberikan kuersetin 4 mg/200 g BB tikus

Kelompok 4 : tikus diberikan ekstrak etanol daun kacapiring dengan dosis 125 mg/KgBB

kelompok 5 : tikus diberikan ekstrak etanol daun kacapiring dengan dosis 250 mg/KgBB

Kelompok 6 : tikus diberikan ekstrak etanol daun kacapiring dengan dosis 500 mg/KgBB

Kelompok 7 : kelompok tikus normal

Perlakuan sesuai kelompok dilakukan selama 14 hari. Pada hari ke 15 dilakukan pemeriksaan aktivitas antioksidan terhadap glutathion peroksidase.

9.7 Prosedur uji hiperglikemia 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.

9.8 Pemeriksaan aktivitas antioksidan dilihat dari aktivitas GPx. Pemeriksaan kadar GPx supernatant jernih hati dilakukan dengan *Glutathion*

Peroxidase Assay Kit merek *Bio Vision* disimpan pada suhu -20°C dan terlindung dari sinar matahari langsung.

9.8.1 Preparasi sampel. Hati segar tikus $\pm 1,25$ gram dicacah dalam kondisi dingin dalam 5 ml larutan *Phosphat buffer saline* (PBS) yang mengandung 11,5 gram/L KCl. Homogenate disentrifugase dengan 4.000 rpm selama 10 menit sebanyak 2 kali hingga diperoleh supernatant jernih. Supernatant diambil untuk pengujian sedangkan sedimennya dibuang.

9.8.2 Pengukuran aktivitas GPx. Dipipet sebanyak 200 μl supernatan hati lalu ditambah dengan 200 μl buffer phosphate 0,1 M dengan 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). Setelah itu diinkubasi kembali 10 menit pada suhu 37°C , 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. perubahan laju serapan Selama konversi NADPH menjadi NADP^+ diukur dengan spektrofotometri pada $\lambda = 340$ nm selama 3 menit. Aktivitas GSH-Px dinyatakan sebagai μmol NADPH yang dioksidasi menjadi NADP^+ menit $^{-1}$ mg $^{-1}$ protein dengan koefisien ekstrinsik ($6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) untuk NADPH. Perhitungannya adalah sebagai berikut :

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

Keterangan :

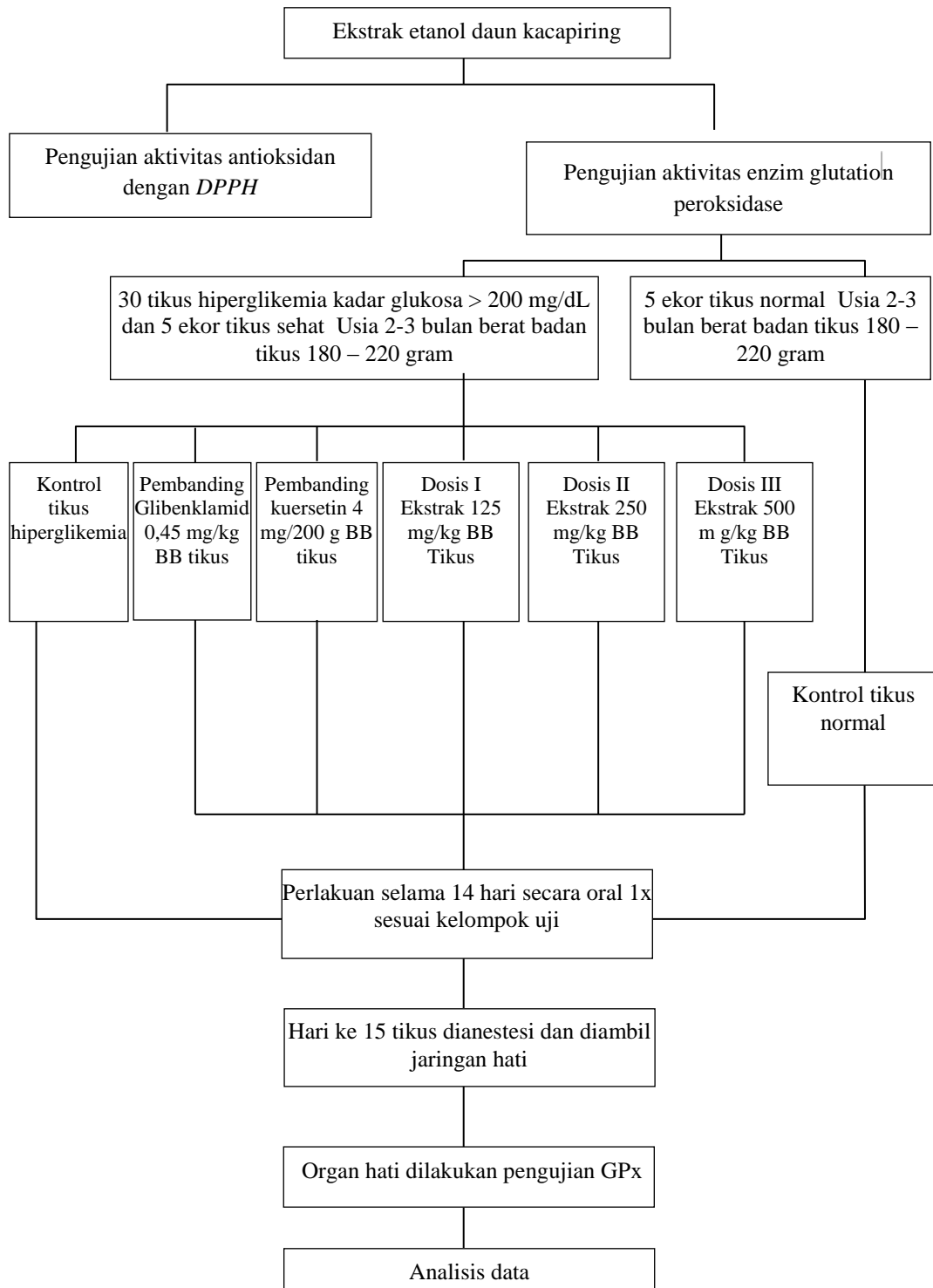
Abs	: Absorbansi
Vt	: volume total
6,22	: koefisien ekstrinsik dari NADPH
2	: 2 mol GSH yang setara dengan 1 mol NADPH
1000	: perubahan menjadi mili unit
Vs	: volume sampel

E. Analisa Statistik

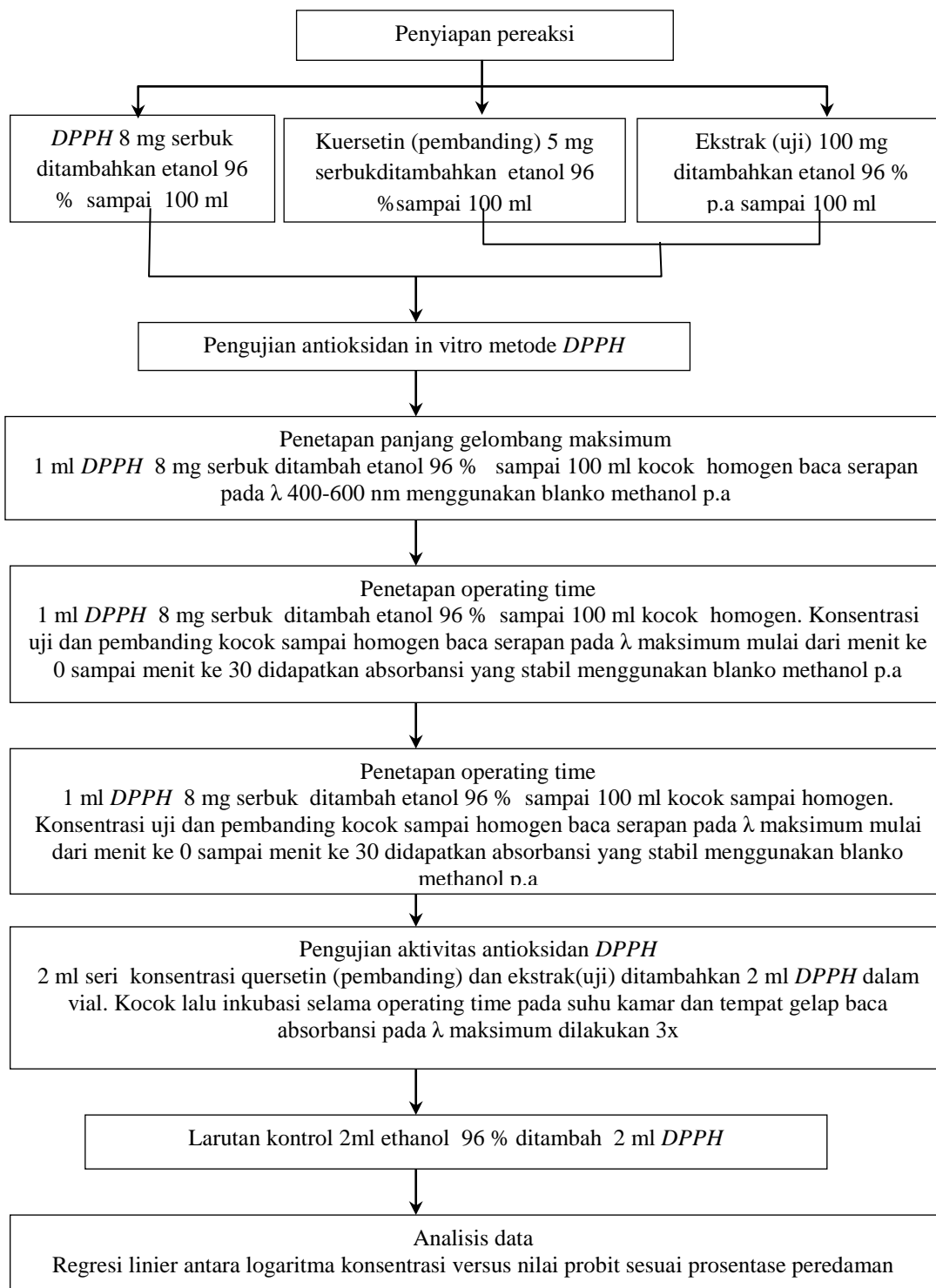
Analisa statistik yang pertama digunakan dalam penelitian ini adalah untuk melihat apakah data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak yang dengan menggunakan uji distribusi normal (*Saphiro Wilk*). Jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$), analisa data dilanjutkan dengan uji parametric (*One Way ANOVA*) untuk

mengetahui perbedaan yang nyata diantara perlakuan uji. Jika hasil uji *One Way ANOVA* dan uji *Lavene Statistik* menunjukkan hasil normal ($p > 0,05$), selanjutnya dilakukan uji *Post Hoc* untuk melihat aktivitas glutation peroksidase yang efektif diantara kelompok perlakuan. Tetapi jika hasil data tidak homogeny ($P, 0,05$), maka dilakukan uji non parametric menggunakan uji *Mann-Whitney*.

F. Skema Penelitian



Gambar 5. Skema penelitian



Gambar 6. Skema pengujian antioksidan DPPH

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi Daun Kacapiring

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

Berdasarkan surat determinasi dengan nomor 255/UN27.9.6.4/Lab/2017 menyatakan bahwa tanaman yang dipakai adalah daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J.Ellis). Hasilnya sebagai berikut : 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-31b-403b-404b-405b-414a-415a-416b-417b-418a-419a _____ **162. Rubiaceae.**

1a-2b-4c-10b-13b-14b-15b-16b-17b-18b-19b-20b-21b-38b-51b-52b-53b-22a-56b-57b-58b-62a-63a _____ **31. Gardenia**
1a _____ *Gardenia jasminoides* J. Ellis

B. Pembuatan serbuk daun kacapiring

Daun kacapiring diperoleh dari Madiun, Jawa Timur pada bulan desember 2017. Daun kacapiring berwarna hijau tua dengan 7,5 kg dibersihkan menggunakan air mengalir dengan tujuan menghilangkan kotoran yang masih menempel. Daun kacapiring dikeringkan dengan cara dikering anginkan selama 7 hari. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air sehingga mencegah timbulnya jamur yang dapat menyebabkan terjadinya perubahan kimia dan dapat menurunkan mutu khasiat dari daun kacapiring. Setelah melalui proses pengeringan didapatkan berat kering sebesar 3,125 kg. Daun kacapiring yang telah kering dibuat serbuk dengan menggunakan alat penggilingan. Kemudian 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 penyarian dapat berlangsung efektif.

Penentuan berat kering terhadap berat basah dilakukan dengan cara menimbang daun kacapiring yang masih basah, selanjutnya hasilnya dibandingkan dengan berat daun kacapiring yang sudah kering. Hasil persentase berat kering terhadap berat basah daun kacapiring dapat dilihat pada tabel 2 dibawah ini :

Tabel 2. Rendemen pengeringan daun kacapiring

Simplisia	Berat basah (Gram)	Berat kering (Gram)	Rendemen (%)
Daun kacapiring	7500	3125	41,67

Daun kacapiring sebanyak 7500 g dikeringkan dan setelah dikeringkan beratnya 3125 g diperoleh prosentase berat kering terhadap berat basah adalah 41,67 %. Hasil perhitungan % rendemen dapat dilihat pada lampiran 11.

C. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kacapiring

Daun kacapiring dilakukan dengan metode refluks menggunakan pelarut etanol 96%. Alasan menggunakan pelarut etanol 96% yaitu untuk menghasilkan ekstrak yang kental (murni) sehingga mempermudah untuk proses identifikasi. Dilakukan ekstraksi menggunakan perbandingan serbuk daun kacapiring dengan jumlah pelarut sebanyak 1:10 selama 3 jam dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Hasil ekstraksi disaring dengan kain flannel serta kertas saring lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer

Keuntungan dengan metode refluks dimana ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dengan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dan adanya pendingin balik. Ekstraksi dapat berlangsung dengan efisien dan senyawa dalam sampel secara lebih efektif dapat ditarik oleh pelarut.

Karakteristik ekstrak daun kacapiring yang diperoleh dari hasil refluks dapat dilihat pada tabel 3 dibawah ini

Tabel 3. Karakteristik ekstrak daun kacapiring

Bentuk	Warna	Bau	Rasa
Daun Kacapiring	Coklat	Khas	Pahit

Ekstrak kental kemudian ditimbang untuk dihitung % rendemen ekstrak etanol daun kacapiring. Hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel 4 di bawah ini.

Tabel 4. Rendemen ekstrak etanol daun kacapiring

Berat serbuk (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
500	129,25	25,85

Ekstrak kental yang didapatkan dari 500 gram serbuk daun kacapiring sebesar 129,25 gram dan diperoleh rendemen ekstrak sebesar 25,85 %. Hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 12.

D. Penetapan Kadar Air Serbuk dan Ekstrak Etanol Daun Kacapiring

Serbuk dan ekstrak daun kacapiring yang diperoleh dilakukan penetapan kadar air dengan cara destilasi menggunakan rangkaian alat *Sterling-Bidwell*. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak bertujuan agar mutu dan khasiat serbuk dan ekstrak daun kacapiring tetap terjaga. Persyaratan kadar air suatu serbuk simplisia yaitu kurang dari 10% (Anonim 1986). Pelarut yang digunakan yaitu xylena karena memiliki titik didih yang lebih tinggi dan berat jenis yang lebih kecil dibandingkan air selain itu xylena tidak bercampur dengan air. Hasil penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun kacapiring dapat dilihat pada tabel 5 dan 6 di bawah ini.

Tabel 5. Penetapan kadar air serbuk daun kacapiring

Berat Serbuk (g)	Volume Terbaca (mL)	Kadar Air (%)
25	1,2	4,8
25	1,3	5,2
25	1,2	4,8
Rata – Rata		4,93

Tabel 6. Penetapan kadar air ekstrak daun kacapiring

No	Berat ekstrak (gr)	Volume terbaca (ml)	Kadar air (%)
1	15	1,4	7
2	15	1,5	7,5
3	15	1,4	7
	Rata-rata		7,16

E. Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun kacapiring

Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun kacapiring dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Penetapan susut pengeringan pada serbuk dan ekstrak dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui

kadar dari kandungan serbuk dan ekstrak yang dapat menguap dalam serbuk dan ekstrak. Hasil penetapan susut pengeringan tidak boleh lebih dari 10 % karena dapat mempengaruhi mutu dari serbuk dan ekstrak tersebut. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun kaca piring dapat dilihat pada tabel 7 dan 8.

Tabel 7. Penetapan susut pengeringan serbuk daun kacapiring

No.	Bobot serbuk (gram)	Kadar susut pengeringan (%)
1	2	5,9
2	2	5,4
3	2	5,9
Rata-rata		5,7

Tabel 8. Penetapan susut pengeringan ekstrak daun kacapiring

No.	Bobot ekstrak (gram)	Kadar susut pengeringan (%)
1	2	8,5
2	2	8,5
3	2	8,5
Rata-rata		8,5

F. Penetapan Bobot Jenis Serbuk Etanol Daun Kacapiring

Penetapan berat jenis ditentukan dengan menggunakan piknometer. Piknometer yang akan digunakan dikalibrasi terlebih dahulu dengan aquadest pada suhu 25°C. piknometer diisi penuh dengan air dan ditimbang ulang. Kerapatan air dapat ditetapkan. Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak kental yang telah diencerkan dengan etanol 96 % sehingga konsentrasi ekstrak kental tersebut 1 %. Kemudian piknometer dikosongkan dan diisi penuh dengan ekstrak kental 1% kemudian ditimbang. Melalui berat ekstrak yang mempunyai volume tertentu sehingga dapat ditetapkan kerapatan ekstrak. Ekstrak kental daun kacapiring dengan konsentrasi 1 % memiliki berat jenis sebesar 0.922. Hasil perhitungan berat jenis ekstrak daun kacapiring ekstrak daun kacapiring dapat dilihat pada lampiran 16.

G. Identifikasi Kandungan Kimia Daun Kacapiring

Serbuk dan ekstrak etanol daun kacapiring yang diperoleh kemudian dianalisis kandungannya dengan menggunakan metode reaksi kimia. Senyawa ekstrak etanol daun kacapiring yang diidentifikasi yaitu flavonoid, saponin, tannin, steroid/triterpenoid. Data dilihat pada lampiran 9 dan 10

Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak etanol daun kacapiring dilakukan untuk mengetahui kebenaran kandungan kimia yang terdapat dalam daun kacapiring.

Tabel 9. Identifikasi reaksi kimia serbuk dan ekstrak daun kacapiring

No	Kandungan	Reaksi	Hasil	Serbuk	Ekstrak
1	Flavonoid	0,1 g ekstrak ditambah 10 ml air suling dipanaskan ± 5 menit lalu disaring. Filtrat lalu ditambah dengan 0,1 g ditambah asam klorida pekat 5 tetes ditambah amil alkohol 20 tetes. Achmad (1986) menyatakan hasil merah jingga atau kuning jingga pada lapisan amil alkohol	Merah jingga pada lapisan amil alkohol	√	√
2	Saponin	0,1 g ekstrak ditambah 10 ml air suling dipanaskan ± 5 menit lalu disaring. Filtrat lalu dikocok kuat-kuat. Robinson (1995) hasil buih yang tidak hilang pada waktu 1-10 menit	.Buih selama 10 menit	√	√
3	Tannin	0,1 g ekstrak ditambah 10 ml air suling dipanaskan ± 5 menit lalu disaring. Filtrat ditambah besi (III) klorida 1% sebanyak 5 tetes. Robinson (1995) hasil warna larutan akan berubah menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman	Terbentuk warna biru kehitaman	√	√
4	Steroid/ Triterpenoid	0,1 g ekstrak ditambah methanol 10 tetes lalu diaupkan diatas WB. Kemudian serbuk ditambah kloroform 2 ml disaring lalu diambil filtratnya ditambah asam acetat 10 tetes dan asam sulfat 3 tetes lewat dinding tabung reaksi. Setyowati <i>et al</i> (2014) Hasil warna hijau .	Warna hijau	√	√

Keterangan :

√ = hasil positif

- = hasil negative

H. Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap Radikal Bebas DPPH

1. Hasil pengukuran panjang gelombang Maksimum

Terlebih dahulu dilakukan pengukuran panjang gelombang radikal bebas DPPH terhadap aktivitas antioksidan sampel ekstrak daun kacapiring dan kuersetin sebagai pembanding. Panjang gelombang yang digunakan untuk pengukuran adalah panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang yang memiliki absorpsi yang paling tinggi. Pemilihan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk meminimalkan kesalahan pada saat pengukuran sehingga yang diperoleh data yang akurat. 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). Pada hasil pengukuran panjang gelombang maksimum *DPPH* adalah 519 nm dengan absorbansi 0,847 Hasil penetapan panjang gelombang maksimum *DPPH* dapat dilihat pada lampiran no. 22

2. Penetapan *operating time*

Penentuan *operating time* untuk menentukan kestabilan absorbansi senyawa *DPPH* setelah direaksikan dengan senyawa uji. Hasil pengukuran *operating time* ekstrak daun kacapiring stabil dimulai dari menit ke-25 sampai menit ke-30. *Operating time* kuersetin dimulai dari menit ke-26 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 no. 23.

3. Hasil pengujian aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas *DPPH*

Pengujian persen peredaman larutan uji (ekstrak etanol daun kacapiring) dengan metode *DPPH*. Pengujian dilakukan dengan 3 kali replikasi. Kuersetin digunakan sebagai pembanding dalam pengujian ini karena Kuersetin merupakan glikosida flavonoid yang terbukti memiliki aktivitas antioksidan.

Penambahan larutan uji yang mengandung senyawa aktif yang mampu meredam radikal bebas akan menurunkan konsentrasi *DPPH* yang diikuti dengan menurunnya serapan dari *DPPH* karena senyawa aktif dalam larutan uji memberikan atom hydrogen kepada radikal *DPPH* sehingga tereduksi menjadi *DPPH-H* 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 10. Konsentrasi larutan uji terhadap nilai rata-rata % inhibisi kuersetin dan ekstrak etanol daun kacapiring.

No	Bahan	Konsentrasi Larutan Uji				
		2 µg/ml	4 µg/ml	6 µg/ml	8 µg/ml	10 µg/ml
1	Kuersetin	21.093±	28.462±	44.939±	58.323±	70.267±
		0.07	0.127	0.264	0.219	0.127
		20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml	80 µg/ml	100 µg/ml
2	Ekstrak daun kacapiring	22.024±	32.28±	40.018±	47.207±	55.311±
		0.316	0.275	0.705	0.691	0.506

Hasil uji statistik menggunakan *independent samples t-test* untuk membandingkan nilai rata-rata IC_{50} kuersetin dengan nilai rata-rata IC_{50} ekstrak etanol daun kacapiring menunjukkan kedua nilai tersebut berbeda secara signifikan ($p < 0,05$). Hasil uji statistik dapat dilihat pada lampiran 25.

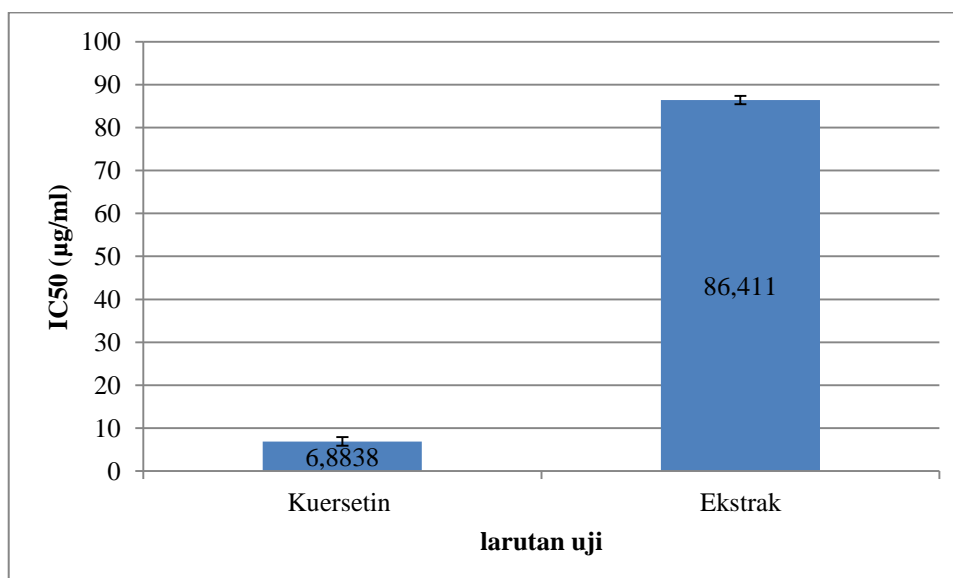
Pengukuran nilai absorbansi peredaman radikal bebas *DPPH* dilakukan terhadap ekstrak etanol daun kacapiring dan kuersetin sebagai pembanding yang dibuat dengan beberapa seri konsentrasi, setelah mereaksikan larutan uji dengan *DPPH* lalu didiamkan selama 30 menit pada tempat gelap karena larutan campuran *DPPH* mudah bereaksi dengan cahaya dan oksigen sehingga dapat mengalami degradasi. Untuk menghindari atau meminimalisir hal tersebut maka larutan campuran *DPPH* harus ditutup dengan aluminium foil dan disimpan di tempat yang gelap. Inkubasi dilakukan selama 30 menit untuk memberikan waktu agar pengikatan elektronnya maksimal (antioksidan menangkap elektron yang tidak berpasangan dari radikal bebas). Proses inkubasi pada senyawa untuk mengoptimalkan terjadinya reaksi yang stabil antara senyawa aktif dengan *DPPH* (Nelson 2008). Kemudian diukur absorbansinya meskipun telah diketahui dari sejumlah literatur (Blois, 1958; Lu & Foo, 2000; Zhu *et al.* 2002) bahwa panjang gelombang serapan maksimum *DPPH* yaitu pada λ 517 nm, tetapi tetap perlu untuk dilakukan penentuan dikarenakan panjang gelombang serapan maksimum dapat mengalami perubahan (pergeseran) dikarenakan perbedaan kondisi percobaan yang dilakukan. Perubahan tersebut dapat berupa perbedaan instrumen, waktu pengukuran, pelarut, iklim, maupun individu yang melakukan. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 519 nm sesuai dengan hasil yang diperoleh dari pengukuran panjang gelombang maksimum *DPPH*.

Standar dalam analisis spektrofotometri sangat diperlukan untuk mendeteksi keberadaan suatu senyawa. Kurva kalibrasi atau kurva standar dalam pengujian spektrofotometri, didasarkan pada hukum Lambert dimana grafik konsentrasi dengan absorbansi akan membentuk suatu garis lurus. Data yang diperoleh berupa % peredaman dari semua seri konsentrasi larutan uji kemudian data dianalisis probit dan hitung nilai IC_{50} dengan persamaan regresi linier berdasarkan rumus $Y = a+bx$. Hasil dinyatakan efektif sebagai antioksidan jika

semakin kecil harga IC_{50} maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Aktivitas peredaman radikal bebas biasanya dinyatakan sebagai persen peredaman dari *DPPH* yang dinyatakan sebagai konsentrasi yang menyebabkan hilangnya 50 % aktivitas *DPPH*.

Dalam melakukan penelitian ini sangat diperlukan ketelitian dalam memipet volume larutan uji sehingga diperoleh data yang linier. 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 (Kurniawan 2008).

Kuersetin banyak digunakan sebagai pembanding dalam pengujian antioksidan secara *in vitro* karena senyawa ini merupakan antioksidan dari golongan flavonoid yang cukup efektif dalam meredam aksi destruksi radikal bebas yang dilakukan dengan cara mendonorkan atom hydrogen pada radikal bebas sehingga radikal bebas tersebut menjadi stabil. 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). Kuersetin dipercaya dapat melindungi tubuh dari beberapa jenis penyakit degeneratif dengan mencegah terjadinya proses peroksidasi lemak.



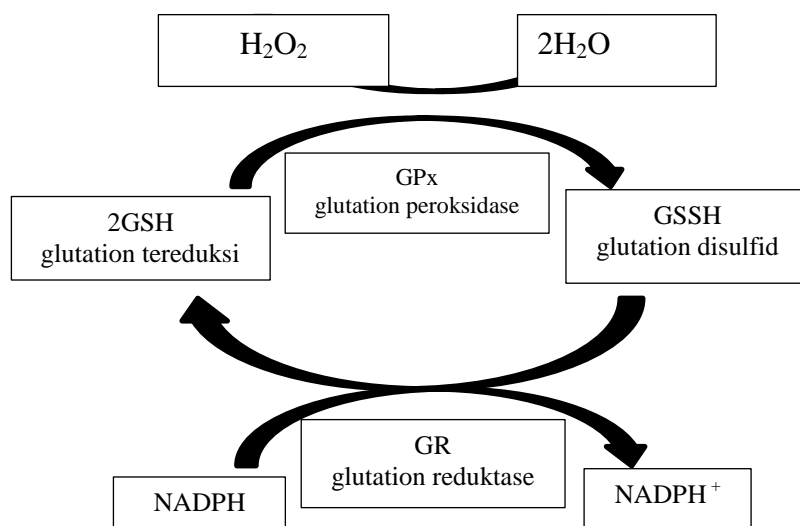
Gambar 7. Aktivitas antioksidan larutan uji berdasarkan nilai IC_{50}

Secara spesifik senyawa dapat dikatakan antioksidan sangat kuat jika nilai $IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$, kuat $50-100 \mu\text{g/ml}$, sedang $101-250 \mu\text{g/ml}$, lemah $250-500 \mu\text{g/ml}$, dan tidak aktif $>500 \mu\text{g/ml}$ (Jun *et al* 2003). Nilai IC_{50} ekstrak etanol daun kacapiring adalah $86,411 \mu\text{g/ml}$ dan nilai IC_{50} kuersetin adalah $6,831 \mu\text{g/ml}$.

Supendi (2012) menyatakan bahwa ekstrak etanol 95 % daun kacapiring memiliki nilai IC_{50} dengan $IC_{50} 94,559 \mu\text{g/ml}$ sehingga mampu meredam radikal bebas dan dikategorikan sebagai antioksidan kuat. Pada penelitian ini diperoleh IC_{50} ekstrak etanol 96 % daun kacapiring adalah $86,441 \mu\text{g/ml}$ sehingga termasuk ke dalam kelompok antioksidan kuat karena mengandung senyawa-senyawa flavonoid, tannin, saponin, dan triterpenoid/steroid yang mampu meredam radikal bebas sedangkan nilai IC_{50} kuersetin yang diperoleh adalah sebesar $6,838 \mu\text{g/ml}$ yang termasuk kedalam golongan antioksidan sangat kuat hasil perhitungan nilai IC_{50} dapat dilihat pada lampiran 14 dan 15.

I. Uji Aktivitas Terhadap Enzim GPx

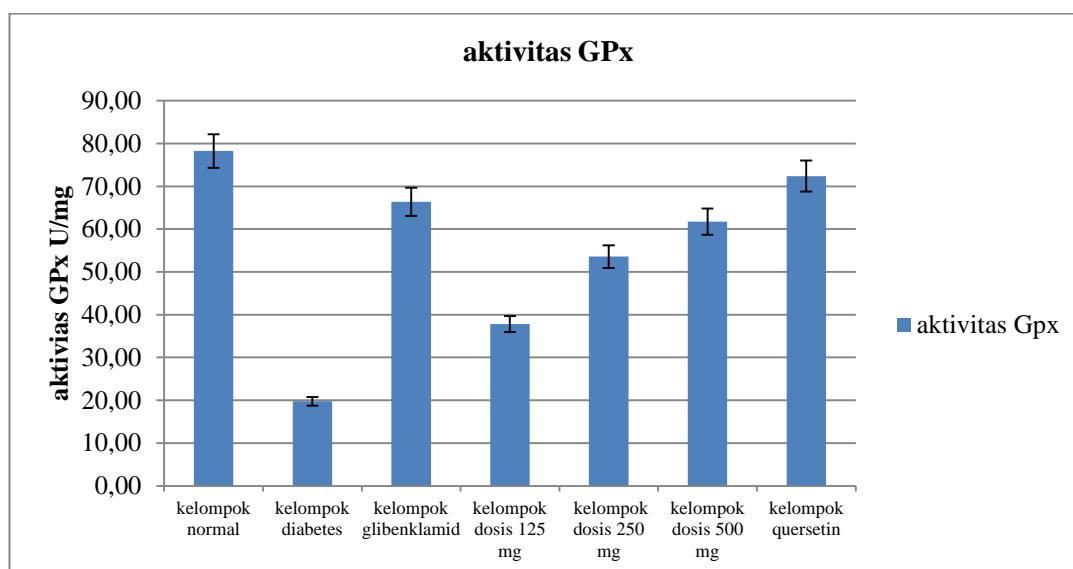
Ekstrak etanol daun kacapiring dilakukan uji aktivitas terhadap enzim glutation peroksidase secara *in vivo* dengan cara mengukur aktivitas glutation peroksidase pada homogenate hati tikus, setelah diberi ekstrak etanol daun kacapiring selama 14 hari dengan dosis sebesar 125 mg/Kg BB tikus, 250 mg/Kg BB tikus, 500 mg/Kg BB tikus.



Gambar 8. Aktivitas Enzim GPx

GPx mengkatalisi reaksi perubahan GSH menjadi GSSH, sekaligus mengurangi jumlah hydrogen 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 hydrogen peroksidase saat terjadi oksidasi glutathion tereduksi (GSH) menjadi glutathion disulfide (GSSH). Selanjutnya GSSH yang dihasilkan direduksi menjadi GSH, reaksi tersebut dikatalisis oleh glutathion reduktase (GR) dengan mengkonsumsi NADPH. Penurunan NADPH (biasanya diukur pada panjang gelombang 340 nm) sebanding dengan aktivitas GPx (Biovision 2012).



Gambar 9. Aktivitas GPx (U/mg) seluruh kelompok perlakuan

Tabel 11. Analisa perbedaan signifikansi kelompok variasi dosis ekstrak terhadap kelompok kontrol.

Kelompok uji	N	Aktivitas GPx
Kontrol normal	5	78.25± 3.07
Kontrol hiperglikemia	5	19.76±1.86
Glibenklamid 5 mg	5	66.37±2.73
Kuersetin 4 mg	5	72.39±1.84
Dosis 125 mg	5	37.81 ±2.94 abcd
Dosis 250 mg	5	53.56 ±2.08 abcd
Dosis 500 mg	5	61.74 ±2.11 abd

Keterangan :

- a : berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol normal
- b : berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol negatif
- c : berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol glibenklamid
- d : berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol kuersetin

Pada kelompok normal hasil rata-rata pengukuran aktivitas GPx menunjukkan nilai yang tertinggi yaitu 78,25 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 & Suhartono 2005). Pada keadaan fisiologis, *reactive oxygen species* (ROS) membantu menjaga homeostatis (Robertson 2004). Pada kondisi normal terjadi keseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan endogen sehingga tidak terjadi keseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan endogen sehingga tidak terjadi peroksidan endogen sehingga tidak terjadi peroksidase lipid yang merupakan proses perusakan oksidasi asam lipid tidak jenuh rantai panjang (*polyunsaturated fatty acids*) pada membrane sel (Gustika 2013).

Kelompok kontrol negatif menunjukkan aktivitas GPx yang paling rendah yaitu 19,75 U/mg dan berbeda signifikan ($p < 0,05$) jika dibandingkan kelompok normal, kelompok glibenklamid, kelompok kuersetin, 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, glukasi protein dan aktivitas 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. 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 (Monnoy & Meyra 2013).

Rata-rata pengukuran kadar enzim GPx pada kelompok kontrol glibenklamid adalah 66,57 U/mg dibandingkan dengan kontrol hiperglikemia menunjukkan perbedaan kadar yang signifikan ($P < 0,05$) berdasarkan analisis statistik. Perlakuan glibenklamid pada tikus diabetes tidak mempengaruhi aktivitas GSH-PX. Ling *et al* 2006 menyatakan bahwa pemberian glibenklamid pada penderita diabetes hanya mampu memperbaiki sekresi insulin untuk menurunkan kadar glukosa darah. Peningkatan aktivitas GPx pada kelompok glibenklamid jauh dari nilai normal karena mekanisme kerja glibenklamid sebagai antidiabetes bukan melalui jalur autooksidasi.

Rata-rata hasil pengukuran kadar enzim GPx pada kontrol kuersetin adalah 72,39 U/mg dibandingkan dengan kontrol hiperglikemia menunjukkan perbedaan kadar yang signifikan ($p < 0,05$) berdasarkan analisis statistik. Kuersetin digunakan sebagai pembanding karena merupakan golongan flavonoid yang sering ditemukan dalam tumbuhan dan diketahui memiliki banyak aktivitas biologis khususnya antioksidan (Sofyan *et al* 2008). Aktivitas GPx pada kelompok kuersetin dapat mencegah terjadinya hiperglikemia dan menormalkan kembali kadar glukosa darah pada tikus yang diinduksi aloksan. Kuersetin dapat mengontrol kadar glukosa darah puasa dan hiperglikemia dengan mekanisme utama penurunan kadar glukosa darah diperantarai oleh aktivitas inhibisi pada enzim alfa-glukosidase sehingga absorpsi dari glukosa dapat diperlambat.

Hasil pengukuran rata-rata kadar GPx semua kelompok ekstrak etanol daun kacapiring (lampiran 26) menunjukkan terjadinya peningkatan dibandingkan dengan rata-rata kadar kelompok negatif, pada kelompok ekstrak etanol daun kacapiring dengan dosis 125 mg, 250 mg, dan 500 mg/Kg BB karena pengaruh pemberian ekstrak secara oral selama 14 hari. Berdasarkan hasil statistik (lampiran 17) pada kelompok dosis 500 mg/Kg BB efektif untuk meningkatkan aktivitas enzim GPx karena tidak berbeda bermakna dengan kontrol glibenklamid tetapi lebih rendah daripada kuersetin. Hasil ini membuktikan bahwa ekstrak etanol daun kacapiring memiliki kemampuan untuk meningkatkan aktivitas GPx dan menghentikan reaksi tersebut mengandung senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dan antihiperglikemia.

Noviarini 2018 menyatakan bahwa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan ekstrak daun kacapiring dosis 500 mg memiliki efek penurunan kadar gula darah tikus. Sesuai dengan penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun kacapiring dosis 500 mg mampu menurunkan kadar gula darah yang diinduksi aloksan serta mampu meningkatkan aktivitas GPx.

Tubuh manusia dapat menghasilkan senyawa antioksidan endogen seperti SOD (*Superoxide Dismutase*), GPx (Glutation Peroxidase) dan katalase yang berperan dalam melindungi tubuh dari serangan radikal bebas. Namun jumlah antioksidan endogen tersebut terbatas dengan adanya senyawa flavonoid, saponin, tannin dan triterpenoid/steroid yang terkandung dalam ekstrak etanol daun kacapiring yang mampu meningkatkan aktivitas GPx karena senyawa-senyawa 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 mengkatalisi reaksi perubahan glukosa dan galaktosa menjadi bentuk-bentuk poliolnya. Polioliol-polioliol tersebut berimplikasi dalam diabetes neuropati, katarak dan galaktosemia (Linder 2006). Flavonoid dapat mencegah reaksi oksidasi salah satunya adalah reaksi glikosiasi yang selanjutnya akan menghasilkan *advanced glycation end products* (AGEs) dan senyawa karbonil. Ikatan AGEs dengan reseptor (RAGE) memicu timbulnya ROS (Sundoyo *et al.* 2006).

Hasil yang diperoleh antara mengujian DPPH diperoleh hasil IC_{50} ekstrak daun kacapiring masuk dalam range kuat sedangkan untuk pengujian pada enzim glutathione peroxidase pada dosis 500 mg/ Kg bb tikus mampu meningkatkan kerja enzim glutathione peroxidase hal ini dapat terjadi karena pada tubuh terdapat enzim endogen yaitu GPx tetapi dalam jumlah kecil sehingga pada penambahan ekstrak daun kacapiring mampu meningkatkan aktivitas enzim GPx tetapi berbeda dengan pengujian dengan DPPH hasil dari IC_{50} ekstrak daun kacapiring yang diperoleh hanya mampu menunjukkan bahwa daun kacapiring mengandung antioksidan.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian ini yaitu :

Pertama, ekstrak etanol daun kacapiring memiliki aktivitas antioksidan dalam menangkal radikal bebas *DPPH*.

Kedua, ekstrak etanol daun kacapiring 125 mg, 250 mg, dan 500 mg mampu meningkatkan aktivitas enzim glutathion peroksidase pada tikus yang diinduksi aloksan.

Ketiga, dosis ekstrak etanol daun kacapiring yang efektif dalam meningkatkan aktivitas enzim glutathion peroksidase adalah dosis 500 mg/Kg BB tikus.

B. Saran

Dalam penelitian ini masih banyak kekurangan, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai :

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan metode dan parameter lain yang terkait efek antioksidan pada ekstrak etanol daun kacapiring

Kedua, perlu dilakukan lebih lanjut untuk melihat senyawa apa saja yang berperan dalam menghambat radikal bebas *DPPH* dan aktivitas enzim glutathion peroksidase.

DAFTAR PUSTAKA

- [ADA]. American Diabetes Association. 2007. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Care*. Hlm. 31-42.
- [BPOM RI]. Badan Pemeriksaan Obat dan Makanan RI. 2008. *Acuan sediaan herbal*. Volume ke-4. Jakarta
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan RI. 1989. *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hlm 1-12.
- [Depkes RI]. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standart Umum Ekstrak tumbuhan Obat*. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. Jakarta. Hlm 5-12.
- [Depkes RI]. Departemen Kesehatan RI. 1979. *Farmakope Indonesia*. Ed ke-3. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes RI]. Departemen Kesehatan RI. 1995. *Farmakope Indonesia*. Ed ke-4. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hlm 449-450.
- [Depkes RI]. Departemen Kesehatan RI. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia*. Jakarta.
- [Depkes RI]. Departemen Kesehatan RI. 2005. *Pharmaceutical Care untuk penyakit diabetes mellitus*. Direktorat jendral bina kefarmasian dan alat kesehatan. Jakarta. Hlm. 7-41.
- [Ditjen POM]. Dirjen Jendral Pemeriksaan Obat dan Makanan. 2000. *Metode Analisis PPOM*. Jakarta : Departemen Kesehatan RI.
- [Kemkes RI]. Kementerian Kesehatan RI. 2014. *Waspada Diabetes*. Infodatin. Hlm. 1-3.
- [WHO]. World Health Organization. 2015. *Diabetes fakta dan Angka*.
- Achmad S.A. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam*. Jakarta: Karnunika
- Adnyana LK, Andrajati R, Setiadi AP, Sigit JL, Sukandar EY. 2008. *Iso Farmakoterapi*. Buku ke-1. Jakarta: ISFI. 26-73
- Anief. 1997. *Ilmu Meracik Obat dan Teori Praktik*. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press. Hlm. 169-171.
- Ansel. 2008. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Ed ke-4. Jakarta: Universitas Indonesia Press.

- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Roards K. *Methods for Testing Antioxidant Activity*. Analyst. 2002. 127: 183-128.
- Apriyani R. 2012. *Uji penghambatan aktivitas alfa glukosidase dan identifikasi golongan senyawa dari fraksi yang aktif pada ekstrak kulit batang Cinnamomum burmanii (ness & T. ness) blume*. [Skripsi]. Depok. Fakultas Farmasi UI.
- Baroroh F, Aznam N, Susanti H. 2011. *Uji Efek Antihiperlipemik Ekstrak Etanol Daun Kacapiring (Gardenia jasminoides Ellis) Pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar*. [Jurnal Ilmiah Kefarmasian]. Yogyakarta. Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan.
- Baynes JW & Thrope SR. 1999. *Role of Oxidative Stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm*. Diabetes J. 48: 1-9.
- Benhar M, Engelberg D, levitski A. 2002. *Reactive oxygen species (ros), stress-activated kinases and stress signaling in cancer*. EMBO reports. 3: 420-5.
- Blois M.S.1958. Antioxidant Determinations by the Use of A Stable Free Radical, *Nature*. **181**:1199-1200.
- Bio Vision. 2012. Glutathione Peroksidase Activity Assay Kit. [Catalog #K762-100]. <http://www.biovision.com> (Januari 2018).
- Dalimartha S. 2005. *Tanaman Obat di Lingkungan Sekitar*. Jakarta: Penerbit Puspa Swara.
- Dehpour AA, Ebrahimzadeh MA, Fazel NS, and Mohammad NS. 2009, *Antioxidant Activity of Methanol Extract of Ferula Assafoetida and its Essential Oil Composition*. Grasas Aceites. 60: 405-412.
- Djami R & anelia T. 2009. *Penapisan fitokimia, uji BSLT, dan uji Antioksidan ekstrak methanol spesies papilionaceae*. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. 7: 65-71.
- Endriyanto E, Hasneli Y, Dewi YI. 2013. *Efektifitas senam kaki diabetes mellitus dengan Koran terhadap tingkat sensitifitas kaki pada pasien DM tipe 2*. Jurnal ilmiah.
- Erlund I. 2012. *Chemical Analysis and Pharmacokinetic of the Flavonoids Quersetin, hesperitin and Narigenin In Humans*. University of Hensinki. 21
- Gandhimathi R, Vijayaraj S, and Jyothirmaie MP. 2012. *Analytical Process of Drugs by Ultraviolet (UV) Spectroscopy- A Review*. International Journal of Pharmaceutical Research & Analysis. 2: 72-78.

- Giorgio P. 2000. *Flavonoid and Antioxidant*. Natural Product J, 63: 1035-1043.
- Gotera W, & Budiyas DGA. 2010. *Penatalaksanaan ketoasidosis diabetic (KAD)*. J Peny. 11: 126-138.
- Gunawan & Mulyani. 2004. *Ilmu Obat dalam (Farmakognosis)*. Jilid I. Depok: Penebar Swadaya.
- Gutteridge JM & Halliwell B. 2000. *Free Radical and Antioxidants*. New York: Annals New York Academy of Science.
- Halliwell B & Gutteridge JMC. 2000. *Free Radical in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press.
- Hamid AA, Aiyelaagbe OO, Usman LA, Ameen OM, Lawal A. 2010. Antioxidants: Its medicinal and pharmacological Applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*. Nigeria. Vol. 4 (8) : 142-151.
- Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, and Rakesh DD. 2008. *Extraction Tecnologies for Medicinal and Aromatic Plants*. ICS UNIDO. Trieste: 21-22.
- Handayani SM. 2010. *Ekstraksi minyak jeruk purut (Citrus hystrix D.C) dengan pelarut etanol dan H-heksan jurnal kompetensi teknik kimia*. Univrsitas Negeri Semarang. Vol. 2: No. 2:1.
- Harbone JB. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Ed II. Padmawinata K, Sudiro I, Sofia N, penerjemah ; Bandung: ITB. Terjemahan dari : *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techiques of Plants Analysis*. Hlm 60-69.
- Harmita M. 2005. *Buku Ajar Analisis Hayati*. Ed 2. Jakarta: Departemen Ramasi FMIPA UI.
- Hendrawati A. 2017. Efek Perlindungan Kombinasi Kuersetin dan Omega-3 Terhadap sel β Pankreas Tikus Diabetes Melitus Tipe-2. Vol. 7. Hlm. 1-8.
- Herbie T. 2015. *Kitab tanaman berkhasiat obat 226 tumbuhan obat untuk penyembuhan penyakit dan kebugaran tubuh*. Yogyakarta. Octopus publishing house.
- Hermani & Raharjo M. 2004. *Tanaman Berhasiat Antioksidan*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Hery Winarsi. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Heryannis H. 2012. *Diabetes Mellitus tipe 1*. Malang. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya.

- Joko S, Rahajoe SA, Sadewa AH, Madiyan M. 2010. *Polimorfisme gena reseptor MCP-1 (CCR2) sebagai faktor resiko nefropati diabetika pada penderita diabetes mellitus tipe 2 di RSUD PROF. DR. Margono Soekarjo dan RSUD Sardjito*. *Mandala of health* 4:8-17.
- Jun *et al.* 2003. Comparison of antioxidant activities of isoflavones from kudzu root (*Pueraria lobata* O). *Journal food Science Institute of Technologist* 68:2117-2122
- Kalt W, Forney CF, Martin A, and Prior RL. 1999. *Antioxydant Capacity, Vitamin C, Phenolics and Anthocyanins after fresh storage of small fruits*. *J. Agric. Food Chem.* 47: 463-464.
- Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M. 1999. *Beneficial Effect of in Diabetes : Possible protection of pancreatic beta cell against glucose toxicity*. *Diabetes*. 48: 2398-2406
- Katzung BG, 1997. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Jakarta. EGC. Hlm. 654-665
- Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. 2012. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Ed ke- 12. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Kelly GS. 2011. Quercetin Alternative Medicine Review. 16 : 2
- Krinke GJ. 2000. *The Laboratory Rat*. San Diego. Academic Press. Hall : 150-152
- Kurniawan D. 2008. Regresi linier. <http://ineddeni.wordpress.com>
- Lu Y & Foo L.Y. 2000. Antioxidant and Radical Scavenging Activities of Polyphenols from Apple Pomace, *Food Chemistry*. **68**:81-85.
- Linder MC. 2006. Biokimia Nutrisi dan Metabolisme. *UI Press*. Jakarta:265-278.
- Ma'mun. 2006. *Teknik pembuatan simplisia dan ekstrak porwoceng. Laporan pelaksanaan penelitian tanaman obat dan aromatik*. Hal 314-321.
- Maheshu MV & Jayadev R. (2009). *In Vitro Antioxidant Activity of Methanolic Extract of Berberia Tinctona Lesch Root and Root Bark*. India. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*. 3(2), 53-58.
- Marxen K, Vanselow KH, Lippemeier S & Hansen UP. 2007. *Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extract of some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurement*. *Sensors J.* 7 (10): 2080-2095.

- 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.
- Molyneux P. 2001. *The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazil (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity*. Songklanakarin J. Sci. Technol. 26: 211-219.
- Monroy ML, Mejia CF. 2013. Oxidative stress in diabetes Mellitus and the role of vitamins with antioxidant actions. *Mexico Ntech*, 9:210-215.
- Nofritasari B. 2006. *Pengaruh pemberian infus daun kaca piring (Gardenia jasminoides Ellis) terhadap kadar glukosa darah tikus wistar yang diberi beban glukosa*. [artikel ilmiah]. Semarang. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Nuttal SL, Dunne F, Kendal MJ, Martin U. 1999. *Age Independent Oxydativesterss in Elderly Patient with Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus*. Q J Med. 92: 33-38.
- Noviarini TU. 2018. Aktivitas ekstrak daun kacapiring (Gardenia jasminoides J. Ellis) terhadap penurunan kadar gula darah dan gambaran histopatologi pancreas pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi aloksan. [Skripsi]. Surakarta. Universitas Setia Budi Surakarta.
- Panjuantiningrum F. 2010. *pengaruh pemeberian buah naga merah (H.Polyrhyzus) terhadap kadar glukosadarah tikus putih yang diinduksi aloksan*. [skripsi]. Surakarta. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.
- Prakash A, Rigelhof F, and Miller E. 2001. *Antioxidant Activity*. Medallion Laboratories Analithycal Progress. 19: 1-4.
- Prasetyo IE. 2013. *Pengelolaan Budidaya Tanaman Obat-Obatan*. Bengkulu: Badan Penerbitan Fakultas Pertanian. UNIB.
- Rahbani NME, Rahimi PA, Adi BF, MIRhashemi SM. 1999. *Total antioxidant capacity, superoxide dismute and glutathione peroksidase in diabetic patients*. Medical journal of Islamic Academy of Science 12:109-14.
- Ratna S. 2011. *Ratinopati Diabetik*. Jindon med assoc. 61:333-334.
- Ratna Djamil dan Tria Anelia. 2009. Penapisan Fitokimia, Uji BSLT, dan Uji Antioksidan Ekstrak Metanol Beberapa Spesies Papilionaceae. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* (vol.7 nomor 2 tahun 2009). Hlm. 65-71.
- Redha, A. 2010. Flavonoid : Struktur, Sifat Antioksidan dan Perannya Dalam Sistem sistem Biologis. *Jurnal Berlian*. 9: 196-202.

- Rees DA and Alcolado JC. 2005. *Animal models of diabetes mellitus*. Diabetic Medicine. 22 : 359-370.
- Rinawati Y, Yulinah ES, Maria I. 2000. *Uji efek antipiretik daun beluntas (Pluchea indica (L) Less), daun kacapiring (Gardenia jasminoides Ellis), dan daun ubi jalar (Ipomoea batatas (L)) pada tikus putih jantan galur Sparague Dwaley*. [Skripsi]. Bandung. ITB.
- Robinson T. 1991. *The Organic Constituents of Higher Plants*. 6th Edition. Department of Biochemistry. University of Massachusetts
- Rubenstein T, Wayne D, Bradley. 2007. *Lecture Notes Kedokteran Klinis*. Jakarta: penerbit Erlangga.
- Sagar B, Kedare S. 2011. J Food Sci Technol 48 (4):412-422
- Sarker, Satyajit D., Zahid Latif, & Alexander I. Gray (Ed). (2006). *Natural Products Isolation*. Totowa : Humana Press.
- Sen S, Chakraborty R, Sridhar R, Biplab D. 2010. *Free Radicals, Antioxidants, Diseases and Phytomedicines : Current Status and Future Prospect*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and research. 3: 1 -21.
- Setiawan B, Suhartono E. 2005. *Stress oksidatif dan peran antioksidan pada diabetes mellitus*. Majalah Kedokteran Indonesia. Hlm 86-91.
- Setyowati W.A.E., Ariani, S.R.D., Ashadi, Mulyani, B., Rahmawati, C.P. 2014. *Skrining Fitokimia dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Metanol Kulit Durian (Durio zibethinus murr.) Varietas Petruk*. Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia VI. Prodi Pendidikan Kimia Jurusan FMIPA FKIP Universitas Surakarta.
- 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.
- Smith MS. 1998. *Pemeliharaan, Pembiakan dan penggunaan hewan percobaan di Daerah Tropis*. Ed ke-1. Jakarta. UI Press. Hal : 37-39
- Sudirman S. 2011. *Aktivitas antioksidan dan komponen bioaktif kangkung air (Ipomoea aquatic Forsk)*. Bogor. Intitut Pertanian Bogor.
- Suharmiati MH. 2004. *Khasiat dan Manfaat Daun Dewa dan Sambung Nyawa*. Deok. Penerbit PT AgroMedia Pustaka.

- Suherman SK. 2007. *Insulin dan Antidiabetik Oral*. Dalam : Gunawan, S.G. *farmakologi dan terapi*. Jakarta. Ed ke-5. Balai Penerbit FKUI.
- Sukandar, Prof. Dr. Elin Yulinah. 2008. *ISO Farmakoterapi*. Jakarta. PT. ISFI.
- Sundoyo, Ari W. 2006. *Buku ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Edisi IV jilid II. Jakarta: Pusat Penerbit Departemen Ilmu Penyakit Dalam. FKUI.
- Supendi. 2012. *Analisis fitokimia dan uji aktifitas antioksidan dari daun kacapiring (Gardenia jasminoides Ellis) dan daun beluntas (Plucea indica Less)*. [Skripsi]. Samarinda. Politeknik Pertanian Negeri Samarinda.
- Suyanti, Mukarlina, dan Rizalinda. 2013. *Respon pertumbuhan steak pucuk keji beling (Strobilanthes crispus BI) dengan pemberian IBA (Indole Butyric Acid)*. *Jurnal protobiont*. 2 (2) :26-3.
- Szkudelski T. 2008. *The mechanism of alloxan and streptozocin action in B cells of the rat pancreas*.
- Szkudelski, T. 2001. *The Mechanism Of Alloxan And Streptozotocin Action In β Cells Of The Rat Pancreas*. *Physiology Research*. 50: 536-54.
- Tenda JA, Ezekiel I, Dikko AAU, Goji ADT. 2011. Effect of ethanolic leaves extract of moringa oleifera on blood glucose levels of streptozotocin induced diabetics and normoglycemic wistar rats. *Br J Pharm Toxicol* 2:1-4.
- Thomas ANS. 1989. *Tanaman obat tradisional*. Kanisius.11 : 43.
- Toripah, Jemy A, & Frenly W. (2014). *Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Total Fenolik Ekstrak Daun Kelor (Moringa Oleifera Lam)*. *Pharmacon J*. 3(4). Simanjuntak L.
- Triyati T. 1985. *Spektrofotometer Ultra-Violet dan Sinar Tampak serta Aplikasinya dalam Oseanologi*. Oseana. 10: 39-47.
- Ueno Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiyat, Sumi T, Sumi H, Osawa T. 2002. *Dietary glutathione protects rats from diabetic and neuropathy and neurophaty*. *J. Nutr*. 132: 897-900.
- Vimala S, Adenan MI, Ahmad AR and shahdan R. 2003. *Nature's choice to wellness: Antioxidant Vegetables/Ulam*. Kuala Lumpur: Forest Research Intitute Malaysia.
- Voight R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Yogyakarta. diterjemahkan oleh Soendari Noerono, Gadjah Mada University Press. 563, 576.

- Walde SS, Dohle C, Schott-Ohly P, Gleichmann H. 2002. *Molecular target structures in alloxan-induced diabetes in mice*. Life Sciences. 71 : 1681–1694.
- Widiowati W. 2008. Potensi antioksidan sebagai antidiabetes. *Jurnal kedokteran Marantha* 7(2).
- Wijayakusuma H. 2000. *Tumbuhan Berkhasiat Obat Indonesia*. Jilid I. Jakarta. Presatasi Gema Insani. Hlm. 71-75.
- Wijayanti D. 2008. *Pengaruh pemberian ekstrak daun kaca piring (Gardenia jasminoides Ellis) terhadap penurunan kadar glukosa darah pada tikus putih*. [Skripsi]. Surabaya. Fakultas Farmasi Universitas Widya Mandala.
- Willamson G. 2004. *Common Features in the Pathways of Absorbtion and Metabolism of Flvonoids*. Boca Raton. CRC Press. 21-23.
- William RJ, Spencer JP & Rice Evans C. 2004. *Flavonids : Antioxidants or Signaling Molecules Free Radic* . Biol Med. 36: 838-849.
- Wilson GL, Patton NJ, McCord JM, Mullins DW, Mossman BT. 1984. *Mechanisms of streptozotocin- and alloxan-induced damage in rat β cells*. Diabetologia. 27: 587-591.
- Youl E, Bardy G, Magous R. 2010. *Quersetin Potentiates Insulin Secretion and Protects INS-1 Pancreatic β -Cell Against Oxidative Damage via the ERK 1/2 Patway*. Br J Pharmacol. 161: 799-814.
- Zhu Q.Y, Hackman R.M, Ensunsa, J.L, Holt R.R, & Keen C.L. 2002, Antioxidative Activities of Oolong Tea, *J.Agric.Food Chem.* **50**:6929-6934.

L

A

M

P





Q

R

A

N

Lampiran 1. Surat Determinasi tanaman kacapiring

	
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	: 255/UN27.9.6.4/Lab/2017
Hal	: Hasil Determinasi Tumbuhan
Lampiran	: -
Nama Pemesan	: Bety Kurnia Kumalasari
NIM	: 20144207A
Alamat	: Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta
HASIL DETERMINASI TUMBUHAN	
Nama Sampel	: <i>Gardenia jasminoides</i> J. Ellis Synonym : <i>Gardenia augusta</i> Merr. <i>Gardenia florida</i> L. <i>Gardenia grandiflora</i> Lour.
Familia	: Rubiaceae
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-31b-403b-404b-405b-414a-415a-416b-417b-418a-419a _____ 162. Rubiaceae 1a-2b-4c-10b-13b-14b-15b-16b-17b-18b-19b-20b-21b-38b-51b-52b-53b-55a-56b-57b-58b-62a-63a _____ 31. Gardenia 1a _____ <i>Gardenia jasminoides</i> J. Ellis	
Deskripsi Tumbuhan :	
Habitus : perdu, menahun, tumbuh tegak, tinggi 1-2 m. Akar : tunggang, bercabang, putih kotor atau putih kekuningan hingga coklat kekuningan. Batang : segiempat ketika muda tetapi berbentuk bulat ketika dewasa, berkayu, bercabang-cabang, permukaan gundul dan licin, ranting atau cabang mudanya tertutup lapisan hars yang mengkilat, coklat keabu-abuan. Daun : tunggal, bersilang-berhadapan, jarang dalam bentuk karangan 3 daun; helaian daun berbentuk elips atau elips-bulat telur terbalik atau memanjang-lanset, panjang 4.5-13 cm, lebar 2-5 cm, ujung daun tumpul atau runcing hingga meruncing pendek, tepi daun rata atau sedikit bergelombang, pangkal daun runcing, pertulangan daun menyirip, kedua permukaan daun gundul dan licin, permukaan atas daun berwarna hijau tua dan mengkilap, permukaan bawah daun hijau muda, daging daun seperti kertas; panjang tangkai daun 1-5 mm, permukaan gundul; daun penumpu bulat telur, panjang 0.75-1.5 cm, bertepi rata, hijau kekuningan, permukaan gundul, daun penumpu yang terletak di bawah karangan bunga selalu cukup tinggi dan tumbuh menjadi satu yang disebut ochrea. Bunga : bunga tunggal, di ujung batang atau cabang, panjang tangkai bunga 2-10 mm, berbau harum; tabung kelopak kecil dan pendek, berusuk, tepi berbagi hingga pangkal menjadi 6 taju yang panjang, bentuk garis lanset, panjang 2-3 cm, hijau; mahkota bunga berbentuk terompet, tabung mahkota bulat, panjang 2.5-4 cm, kehijauan, bagian kerongkongan tabung mahkota berambut, pinggir taju mahkota berwarna putih cerah, keenam taju mahkota paling luar berbentuk bulat telur terbalik, panjang 6-9 cm, yang lainnya makin ke dalam makin pendek; benangsari tidak terlalu berkembang; tangkai putik tidak terlalu berkembang, kepala putik tebal, bakal buah steril. Buah : berkayu, pecah secara tidak teratur. Biji : berbiji banyak, pipih, merah.	
Kepala Lab. Program Studi Biologi	Surakarta, 20 Desember 2017
 Dr. Tetri Widiyani, M.Si. NIP. 19711224 200003 2 001	Penanggungjawab Determinasi Tumbuhan  Suraman, S.Si., M.Si. NIP. 19800705 200212 1 002
 Kepala Program Studi Biologi FMIPA UNS	

Lampiran 2. Surat ethical Clearence

3/9/2018

Form A2



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 : 312 / III / HREC / 2018

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

Maret University Of Surakarta, after reviewing the proposal design, herewith to certify
 Surakarta, setelah menilai rancangan penelitian yang diusulkan, dengan ini menyatakan

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

**EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN KACAPIRING (*Gardenia jasminoides* Ellis) TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH DAN
 AKTIVITAS ENZIM GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS HIPERGLIKEMIA**

Principal investigator : BETY KURNIA KUMALASARI
 Peneliti Utama : 20144207A

Location of research : Gedung PAU Universitas Gadjah Mada
 Lokasi Tempat Penelitian

Is ethically approved
 Dinyatakan layak etik

Issued on : 09 Mar 2018
 Chairman
 Ketua

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

Lampiran 3. Surat keterangan telah melakukan penelitian di Laboratorium Gizi (Hewan Coba) di Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada



UNIVERSITAS GADJAH MADA
 Pusat Studi Pangan dan Gizi
 Jln. Teknik Utara, Berek, YOGYAKARTA 55281
 Telp. 0274 589242, 6492282 Web : www.cfns.uum.ac.id
 Email : cfns@ugm.ac.id

SURAT KETERANGAN BEBAS PEMINJAMAN

Menerangkan bahwa yang tersebut di bawah ini :

Nama : Bety Kurnia Kumalasari
 Nomor Mahasiswa : 20144207A
 Jurusan : SI - FARMASI
 Fakultas : FARMASI
 Universitas : UNIVERSITAS SETIA BUDI SURAKARTA
 Alamat rumah : Jlg. Raya Kandungan No.06 KARE, Pt. 19 P.W.09
 Kab. Madiun

Tidak mempunyai pinjaman peralatan dan bon bahan di laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) Universitas Gadjah Mada.

Yogyakarta, 3 Mei 2018

Teknisi,
 Laboratorium Mikrobiologi

M. Agus S.

Teknisi,
 Laboratorium Kimia dan Biokimia

Purwati.

Teknisi,
 Laboratorium Gizi

Yuli Yanto

Teknisi,
 Laboratorium Rekayasa Pangan

Suci

Mengetahui,
 Sekretaris,

Dr. Ir. Setyastuti Purwanti, SU

NIP. 195203021979032001

Lampiran 4. Sertifikat Pelatihan Dasar Penanganan Hewan Coba yang diselenggarakan oleh Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada



Lampiran 5. Foto tanaman kacapiring



Lampiran 6. Foto serbuk dan ekstrak daun kacapiring**Pengeringan daun kacapiring****serbuk daun kacapiring****Ekstrak kental daun kacapiring**

Lampiran 7. Gambar alat dan bahan**Alat Refluks****Evaporator****Spektrofotometri Uv-Vis****Moisture Balance**



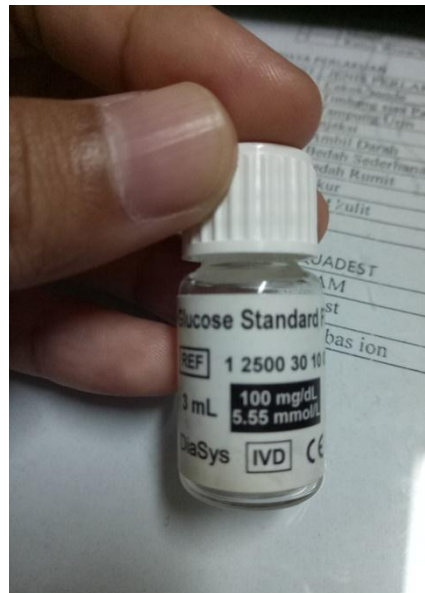
Sentrifuge



sterling bidwell



Kit Assay GOD-PAP



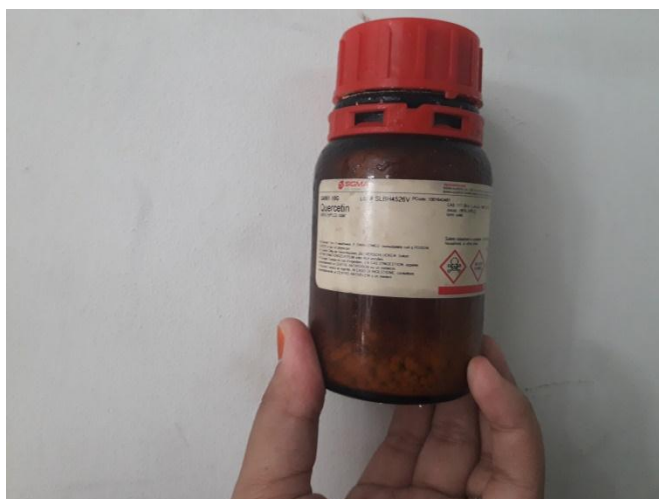
Glukosa Standart



Aloksan



Na CMC

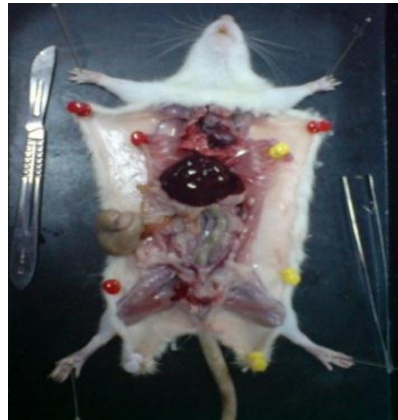


Kuersetin

Lampiran 8. Foto perlakuan pada hewan uji



Kelompok hewan uji







Pembedahan







Organ hati tikus

Lampiran 9. Hasil identifikasi senyawa kimia serbuk daun kacapiring

No	Kandungan	Reaksi	Hasil	Gambar	Pustaka	Kesimpulan
1	Flavonoid	0,1 g serbuk ditambah 10 ml air suling dipanaskan ± 5 menit lalu disaring. Filtrat lalu ditambah dengan 0,1 g ditambah asam klorida pekat 5 tetes ditambah amil alkohol 20 tetes	Merah jingga pada lapisan amil alkohol		Merah jingga atau kuning jingga pada lapisan amil alkohol	positif
2	Saponin	0,1 serbuk ditambah 10 ml air suling dipanaskan ± 5 menit lalu disaring. Filtrat lalu dikocok kuat-kuat.	Buih selama 10 menit		Buih yang tidak hilang pada waktu 1-10 menit.	Positif
3	Tannin	0,1 g serbuk ditambah 10 ml air suling dipanaskan ± 5 menit lalu disaring. Filtrat ditambah besi (III) klorida 1% sebanyak 5 tetes	Terbentuk warna biru kehitaman		Warna larutan akan berubah menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman	Positif
4	Steroid/triterpenoid	0,1 g serbuk ditambah methanol 10 tetes lalu diaapkan diatas WB. Kemudian serbuk ditambah kloroform 2 ml disaring lalu diambil filtratnya ditambah asam acetat 10 tetes dan asam sulfat 3 tetes lewat dinding tabung reaksi.	Warna hijau		Warna hijau	Positif

Lampiran 10. Hasil identifikasi senyawa kimia ekstrak daun kacapiring

No	Kandungan	Reaksi	Hasil	Gambar	Pustaka	Kesimpulan
1	Flavonoid	0,1 g ekstrak ditambah 10 ml air suling dipanaskan ± 5 menit lalu disaring. Filtrat lalu ditambah dengan 0,1 g ditambah asam klorida pekat 5 tetes ditambah amil alkohol 20 tetes	Merah jingga pada lapisan amil alkohol		Merah jingga atau kuning jingga pada lapisan amil alkohol	positif
2	Saponin	0,1 g ekstrak ditambah 10 ml air suling dipanaskan ± 5 menit lalu disaring. Filtrat lalu dikocok kuat-kuat.	Buih selama 10 menit		Buih yang tidak hilang pada waktu 1-10 menit.	Positif
3	Tannin	0,1 g ekstrak ditambah 10 ml air suling dipanaskan ± 5 menit lalu disaring. Filtrat ditambah besi (III) klorida 1% sebanyak 5 tetes	Terbentuk warna biru kehitaman		Warna larutan akan berubah menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman	Positif
4	Steroid/ triterpenoid	0,1 g ekstrak ditambah methanol 10 tetes lalu diaupkan diatas WB. Kemudian serbuk ditambah kloroform 2 ml disaring lalu diambil filtratnya ditambah asam acetat 10 tetes dan asam sulfat 3 tetes lewat dinding tabung reaksi.	Warna hijau		Warna hijau	Positif

Lampiran 11. Hasil perhitungan presentase rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun kacapiring

Simplisia	Bobot basah (Kg)	Bobot kering (Kg)	Rendemen (%)
Daun kacapiring	7,5	3,125	41,67

Perhitungan rendemen

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak (gram)}}{\text{berat serbuk (gram)}} \times 100 \%$$

$$\text{Rendemen} = \frac{3,125}{7,5} \times 100 \%$$

$$\text{Rendemen} = 41,67 \%$$

Lampiran 12. Hasil perhitungan presentase rendemen serbuk terhadap ekstrak kental daun kacapiring

Simplisia	Bobot serbuk (Gram)	Bobot ekstrak (Gram)	Rendemen (%)
Daun kacapiring	500	129,25	25,85

Perhitungan rendemen

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak (gram)}}{\text{berat serbuk (gram)}} \times 100 \%$$

$$\text{Rendemen} = \frac{129,25}{500} \times 100 \%$$

$$\text{Rendemen} = 25,85 \%$$

Lampiran 13. Hasil penetapan kadar air serbuk kering daun kacapiring

Hasil penetapan kadar air serbuk kering daun kacapiring

No	Berat serbuk (gr)	Volume terbaca (ml)	Kadar air (%)
1	25	1,2	4,8
2	25	1,3	5,2
3	25	1,2	4,8
	Rata-rata		4,93

- Kadar air 1 = $\frac{1,2 \text{ ml}}{25 \text{ gram}} \times 100 \%$
= 4,8 %

- Kadar air 2 = $\frac{1,3 \text{ ml}}{25 \text{ gram}} \times 100 \%$
= 5,2 %

- Kadar air 3 = $\frac{1,2 \text{ ml}}{25 \text{ gram}} \times 100 \%$
= 4,8 %

- Rata-rata kadar air serbuk daun kacapiring = $\frac{\text{kadar air 1} + \text{kadar air 2} + \text{kadar air 3}}{3}$
= $\frac{4,8 \% + 5,2 \% + 4,8 \%}{3}$
= 4,93 %

Lampiran 14. Hasil penetapan kadar air ekstrak daun kacapiring

Hasil penetapan kadar air ekstrak daun kacapiring

No	Berat ekstrak (gr)	Volume terbaca (ml)	Kadar air (%)
1	15	1,4	7
2	15	1,5	7,5
3	15	1,4	7
Rata-rata			7,16

- Kadar air 1 = $\frac{1,4 \text{ ml}}{20 \text{ gram}} \times 100 \%$
= 7 %

- Kadar air 2 = $\frac{1,5 \text{ ml}}{20 \text{ gram}} \times 100 \%$
= 7,5 %

- Kadar air 3 = $\frac{1,4 \text{ ml}}{20 \text{ gram}} \times 100 \%$
= 7 %

- Rata-rata kadar air serbuk daun kacapiring = $\frac{\text{kadar air 1} + \text{kadar air 2} + \text{kadar air 3}}{3}$
= $\frac{7 \% + 7,5 \% + 7 \%}{3}$
= 7,16 %

Lampiran 15. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun kacapiring

Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun kacapiring

No.	Bobot serbuk (gram)	Kadar susut pengeringan (%)
1	2	5,9
2	2	5,4
3	2	5,9
Rata-rata		5,7

$$\begin{aligned}\text{Rata-rata susut} &= \frac{\text{susut pengeringan 1} + \text{susut penegringan 2} + \text{susut pengeringan 3}}{3} \\ &= \frac{5,9 + 5,9 + 5,7}{3} \\ &= 5,7 \%\end{aligned}$$

Lampiran 16. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak daun kacapiring

Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak daun kacapiring

No.	Bobot ekstrak (gram)	Kadar susut pengeringan (%)
1	2	8,5
2	2	8,5
3	2	8,5
Rata-rata		8,5

Rata-rata susut pengeringan

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{susut pengeringan 1} + \text{susut pengeringan 2} + \text{susut pengeringan 3}}{3} \\ &= \frac{8,5 + 8,5 + 8,5}{3} \\ &= 8,5 \text{ \%} \end{aligned}$$

Lampiran 17. Hasil penetapan berat jenis ekstrak daun kacapiring

- Berat piknometer kosong = 27,621 gram
- Berat piknometer + air = 52,389 gram
- Berat air = (berat piknometer + air) – berat piknometer kosong
= (52,389-27,621) gram
= 24,768 gram

No	Berat pikno+ekstrak (gram)	Berat ekstrak (gram)	BJ
1	50,454	22,833	0,922
2	50,435	22,814	0,921
3	50,371	22,750	0,919
Rata-rata ±SD			0,921±0,002

- Berat ekstrak = (berat piknometer + ekstrak) – berat piknometer
= 53,286 – 27,621
= 25,665 gram
- BJ ekstrak = $\frac{\text{massa ekstrak}}{\text{massa air}}$

= $\frac{22,933 \text{ gram}}{24,768}$
= 0,922

Lampiran 18. Perhitungan dosis

1. Glibenklamid

Dosis terapi glibenklamid untuk manusia 70 Kg adalah 5 mg. faktor konversi dari manusia 70 Kg ke tikus dengan berat badan tikus 200 gram adalah 0,018.

$$\begin{aligned} \text{Dosis glibenklamid untuk tikus 200 g} &= 5 \text{ mg} \times 0,018 \\ &= 0,09 \text{ mg}/200 \text{ gr BB tikus} \\ &= 0,45 \text{ mg}/ \text{Kg Bb tikus.} \end{aligned}$$

Tablet glibenklamid ditimbang diperoleh hasil 0,201g = 201 mg. maka dosis glibenklamid tablet untuk tikus dengan berat badan 200 g adalah :

$$\begin{aligned} \text{Dosis glibenklamid tablet} &= \frac{0,09}{5 \text{ mg}} \times 201 \text{ mg} \\ &= 3,618 \text{ mg} \sim 3,6 \text{ mg}/200 \text{ gr BB tikus.} \end{aligned}$$

Suspense glibenklamid dibuat dalam konsentrasi 0,18 dengan menimbang 180 mg serbuk glibenklamid kemudian disuspensikan dengan CMC Na 0,5 % hingga volume 100 ml sampai homogen.

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi glibenklamid} &= 0,18 \text{ g}/100 \text{ ml} \\ &= 180 \text{ mg}/100 \text{ ml} \\ &= 1,8 \text{ mg}/\text{ml} \end{aligned}$$

Maka volume pemberian untuk tikus dengan berat badan 200 g adalah :

$$\begin{aligned} \text{Volume pemberian} &= \frac{3,6 \text{ mg}}{1,8 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} \\ &= 2 \text{ ml untuk 200 g BB tikus.} \end{aligned}$$

2. Aloksan

$$\begin{aligned} \text{Aloksan 1 \%} &= 1 \text{ gram} /100 \text{ ml} \\ &= 1000 \text{ mg}/100 \text{ ml} \\ &= 10 \text{ mg}/\text{ml} \end{aligned}$$

Larutan aloksan 1% dibuat sebagai penginduksi diabetes dibuat dengan cara melarutkan 1 gram aloksan monohidrat ke dalam 100 ml larutan NaCl 0,9 %.

Dosis aloksan monohidrat untuk tikus sebesar 150 mg/Kg Bb tikus yang diberikan secara intraperitoneal.

- Dosis aloksan 150 mg/ Kg BB tikus

$$150 \text{ mg/Kg BB tikus} = \frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 150 \text{ mg}$$

$$= 30 \text{ mg}/200 \text{ g BB tikus.}$$

- Volume pemberian aloksan

$$\text{Volume (ml)} = \frac{30 \text{ mg}}{10 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml}$$

$$= 3 \text{ ml untuk 200 gram BB tikus}$$

3. kuersetin

$$\text{kuersetin 0,1 \%} = 0,1 \text{ gram /100 ml}$$

$$= 100 \text{ mg}/100 \text{ ml}$$

$$= 1 \text{ mg/ml}$$

Larutan kuersetin 0,1% dibuat sebagai pembanding dibuat dengan cara melarutkan 0,1 g kuersetin ke dalam 100 ml larutan NaCl 0,9 %. Dosis kuersetin untuk tikus sebesar 4 mg/Kg Bb tikus.

- Dosis kuersetin 4 mg/ Kg BB tikus

$$4 \text{ mg/Kg BB tikus} = \frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 4 \text{ mg}$$

$$= 0,8 \text{ mg}/200 \text{ gram BB tikus.}$$

- Volume pemberian kuersetin

$$\text{Volume (ml)} = \frac{0,8 \text{ mg}}{1 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml}$$

$$= 0,8 \text{ ml} \sim 1 \text{ ml untuk 200 gram BB tikus.}$$

4. CMC Na 0,5 %

$$\text{Konsentrasi CMC Na0,5 \%} = 0,5 \text{ g /100 ml aquadest}$$

$$= 500 \text{ mg}/ 100 \text{ ml aquadest}$$

$$= 5 \text{ mg/ml}$$

Dibuat larutan stok 100 ml, maka :

$$\text{Stok CMC Na 0,5 \%} = \frac{100 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} \times 500 \text{ mg}$$

$$= 500 \text{ mg}/100 \text{ ml aquadest}$$

$$= 0,5 \text{ g}/ 100 \text{ ml aquadest}$$

Serbuk CMC Na 0,5 g ditimbang kemudian disuspensikan dengan aquadest panas ad 100 ml hingga homogen. Suspense ini digunakan sebagai kontrol

negatif dan suspending agent. Volume pemberian CMC Na 0,5 % untuk tikus yang memiliki berat 200 g dalam 1 ml.

5. Dosis ekstrak daun kacapiring

Dosis yang digunakan berdasarkan dosis empiris daun kacapiring pada manusia dewasa 70 Kg sebanyak 12 lembar daun kacapiring segar yang memiliki berat basah 12,87 g. Dosis ekstrak diperoleh setelah dilakukan proses ekstraksi dengan metode refluks, besarnya rendemen pengeringan yang diperoleh dikonversikan dengan dosis empiris manusia, kemudian dosis ekstrak dikonversikan ke tikus 200 gram dengan faktor konversi 0,018.

- Berat daun kacapiring basah = 7500 g
- Berat daun kacapiring setelah dioven = 3215 g
- Rendemen bobot kering = 41,67 %
- Pembuatan ekstrak : serbuk ditimbang sebanyak 20 g dimasukkan kedalam labu alas bulat 500 ml ditambahkan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1: 10 dan dilakukan proses pemanasan (refluks) selama 3 jam dan proses tersebut diulang sebanyak 3x untuk setiap kali sampel. Untuk 500 g serbuk yang direfluks didapat ekstrak kental sebanyak 129,25 g. Rendemen ekstrak = 25,85%
- Dosis empiris pada manusia 70 Kg = 12,87 g (berat basah)
- Berat kering dosis empiris = 5,33 g (berat kering)
- Dosis ekstrak pada manusia = rendemen ekstrak x berat kering dosis empiris

$$= \frac{25,85}{100} \times 5,33 \text{ g}$$

$$= 1,37778 \text{ g}$$

$$= 1,378 \text{ g/ 70 Kg BB}$$
- Dosis pada manusia dikonversikan ke tikus 200 g dengan faktor konversi 0,018.

$$\text{Dosis} = 1,378 \text{ g} \times 0,018$$

$$= 0,0248 \text{ g/200 g BB tikus}$$

$$= 0,124 \text{ g/Kg BB tikus}$$

$$= 124 \text{ mg/Kg BB tikus} \sim 125 \text{ mg/Kg BB tikus}$$

Setelah dilakukan orientasi dosis terhadap dosis empiris dan dua kali dosis empiris yaitu dosis 125 mg/ Kg BB tikus dan 250 mg/Kg BB tikus. Kedua dosis tersebut dapat menurunkan kadar gula darah pada tikus, namun dosis efektif yang didapat yaitu dosis 250 mg/Kg BB tikus. Maka, dosis yang dapat diberikan pada tikus adalah sebagai berikut :

- a. Dosis pertama ($1/2 \times \text{DE}$) = $1/2 \times 250 \text{ mg/Kg BB tikus}$
= 125 mg/Kg BB tikus
- b. Dosis kedua ($1 \times \text{DE}$) = $1 \times 250 \text{ mg/Kg BB tikus}$
= 250 mg/Kg BB tikus
- c. Dosis ketiga ($2 \times \text{DE}$) = $2 \times 250 \text{ mg/Kg BB tikus}$
= 500 mg/Kg BB tikus

Lampiran 19. Larutan uji DPPH dan Ekstrak**Ekstrak Daun Kacapiring 100 $\mu\text{g/ml}$** **Kuersetin 50 $\mu\text{g/ml}$** **Seri Konsentrasi Ekstrak Daun Kacapiring 20 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 60 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$** 

Seri Konsentrasi Kuersetin 2 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 6 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$



larutan ekstrak dengan DPPH



larutan kuersetin dengan DPPH



Lampiran 20. Radikal bebas *DPPH***Penimbangan *DPPH***

$$80 \mu\text{g/ml} = \frac{8,01 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

Untuk membuat larutan *DPPH* konsentrasi 80 $\mu\text{g/ml}$ maka ditimbang *DPPH* sebanyak 8,01 mg.

Pembuatan larutan *DPPH*

DPPH yang telah ditimbang menggunakan neraca elektrik sebanyak 8,01 mg, dilarutkan dengan etanol 96% p.a sampai tanda batas dalam labu takar 100 ml yang telah ditutupi dengan alumunium foil.

Lampiran 21. Kuersetin

Penimbangan Kuersetin

$$50 \mu\text{g/ml} = \frac{5,01 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

Untuk membuat larutan induk kuersetin 50 $\mu\text{g/ml}$ maka ditimbang sebanyak 5,01 mg.

Pembuatan larutan induk kuersetin

Kuersetin yang telah ditimbang menggunakan neraca elektrik sebanyak 5,01 mg, dilarutkan dengan etanol 96% p.a sampai tanda batas dalam labu takar 100 ml.

Pembuatan seri konsentrasi

Larutan induk kuersetin 50 $\mu\text{g/ml}$ dibuat seri konsentrasi 2 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 6 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$.

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Volume yang dipipet (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 $\mu\text{g/ml}$

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$50 \mu\text{g/ml} \times V1 = 2 \mu\text{g/ml} \times 50 \text{ ml}$$

$$V1 = 2 \text{ ml}$$

Larutan induk kuersetin 50 $\mu\text{g/ml}$ dipipet sebanyak 2 ml, 4 ml, 6ml, 8 ml, dan 10 ml kemudian masing-masing dilarutkan dengan etanol 96% p.a sampai tanda batas dalam labu takar 50 ml.

Lampiran 22. Ekstrak etanol daun kacapiring

Penimbangan ekstrak kental

$$1000 \mu\text{g/ml} = \frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{100,01 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

Untuk membuat larutan induk ekstrak etanol daun kacapiring konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$ maka ditimbang ekstrak sebanyak 100 mg.

Pembuatan larutan induk ekstrak kental

Ekstrak yang telah ditimbang menggunakan neraca elektrik sebanyak 100,01 mg, dilarutkan dengan etanol 96 % p.a sampai tanda batas dalam labu takar 100 ml.

Pembuatan seri konsentrasi

Larutan induk ekstrak 1000 $\mu\text{g/ml}$ dibuat seri konsentrasi 20 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 60 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, dan 100 $\mu\text{g/ml}$.

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Volume yang dipipet (ml)	Volume yang dibuat (ml)
20	1	50
40	2	50
60	3	50
80	4	50
100	5	50

Contoh perhitungan pembuatan konsentrasi 20 $\mu\text{g/ml}$

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1000 \mu\text{g/ml} \times V1 = 20 \mu\text{g/ml} \times 50 \text{ ml}$$

$$V1 = 1 \text{ ml}$$

Larutan induk 1000 $\mu\text{g/ml}$ dipipet sebanyak 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, dan 5 ml kemudian masing-masing dilarutkan dengan etanol 96% p.a sampai tanda batas dalam labu takar 50 ml.

Lampiran 23. Penetapan panjang gelombang maksimum *DPPH*

Panjang gelombang yang dipilih yaitu 519 nm dengan nilai absorbansi yang paling tinggi yaitu 0,847.

Lampiran 24. Penetapan operating time larutan uji

Waktu (detik)	Ekstrak etanol daun kacapiring	Kuersetin
0	0.595	0.608
60	0.589	0.569
120	0.574	0.540
180	0.563	0.535
240	0.555	0.526
300	0.547	0.518
360	0.533	0.501
420	0.521	0.498
480	0.508	0.484
540	0.495	0.480
600	0.486	0.475
660	0.469	0.463
720	0.446	0.454
780	0.421	0.442
840	0.397	0.431
900	0.388	0.425
960	0.379	0.406
1020	0.369	0.397
1080	0.347	0.382
1140	0.338	0.376
1200	0.319	0.369
1260	0.297	0.358
1320	0.285	0.342
1380	0.271	0.337
1440	0.264	0.325
1500	0.250	0.318
1560	0.244	0.305
1620	0.244	0.296
1680	0.244	0.296
1740	0.244	0.296
1800	0.244	0.296

Lampiran 25. Perhitungan IC_{50} kuersetin

Replikasi	Konsentrasi	Absorbansi	% Inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Replikasi 1	2	0.621	21.093	6.847
	4	0.563	28.463	
	6	0.435	44.727	
	8	0.327	58.450	
	10	0.235	70.140	
Replikasi 2	2	0.62	21.220	6.837
	4	0.564	28.335	
	6	0.434	44.854	
	8	0.327	58.450	
	10	0.234	70.267	
Replikasi 3	2	0.621	21.093	6.831
	4	0.562	28.590	
	6	0.431	45.235	
	8	0.33	58.069	
	10	0.233	70.394	

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

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{0.787 - 0.6211}{0.787} \times 100 \%$$

$$= 21.093 \%$$

Replikasi 1

$$a = 6.150$$

$$b = 6.404066$$

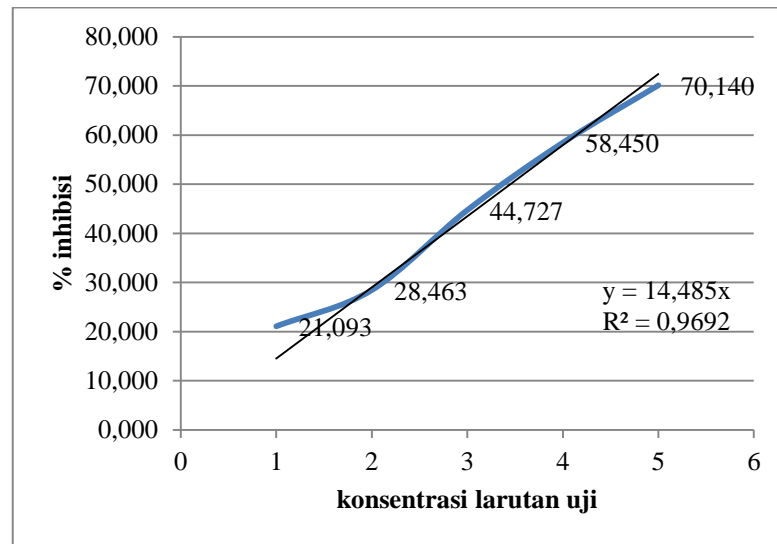
$$r = 0.983$$

$$y = a + bx$$

$$50 = 6.150 + 6.404 \cdot X$$

$$50 - 6.150 = 6.404 \cdot X$$

$$X = 6.847 \mu\text{g/ml.}$$



Replikasi II

$$a = 6.162$$

$$b = 6.410$$

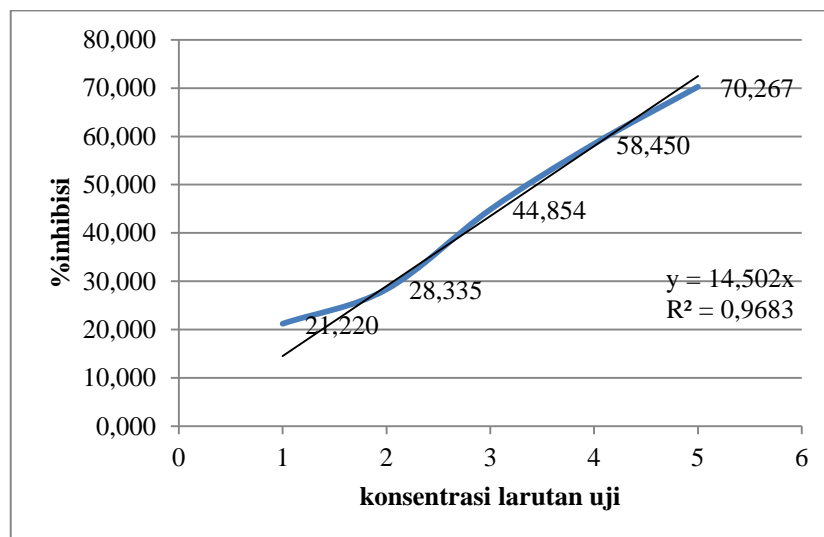
$$r = 0.983$$

$$y = a + bx$$

$$50 = 6.162 + 6.410 \cdot X$$

$$50 - 6.162 = 6.410 \cdot X$$

$$X = 6.837 \mu\text{g/ml}$$



Replikasi III

$$a= 6.251$$

$$b=6.404$$

$$r=0.983$$

$$y = a + bx$$

$$50 = 6.251 + 6.404 \cdot X$$

$$50 - 6.251 = 6.404 \cdot X$$

$$X = 6.831 \mu\text{g/ml}$$

$$\begin{aligned} \text{Rata-rata nilai } IC_{50} \text{ ekstrak daun kacapiring} &= \frac{6.847 + 6.8371 + 6.831}{3} \\ &= 6.838 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

Lampiran 26. Perhitungan IC_{50} ekstrak daun kacapiring

Replikasi	Konsentrasi	Absorbansi	% Inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Replikasi 1	2	0.569	21.841	87.381
	4	0.493	32.280	
	6	0.441	39.423	
	8	0.389	46.566	
	10	0.389	55.357	
Replikasi 2	2	0.565	22.390	85.321
	4	0.491	32.555	
	6	0.431	40.797	
	8	0.385	47.115	
	10	0.321	55.907	
Replikasi 3	2	0.569	21.841	86.535
	4	0.495	32.005	
	6	0.438	39.835	
	8	0.379	47.940	
	10	0.33	54.670	

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

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{0.728 - 0.569}{0.728} \times 100 \%$$

$$= 21.841\%$$

Replikasi 1

$$a = 14.698$$

$$b = 0.406$$

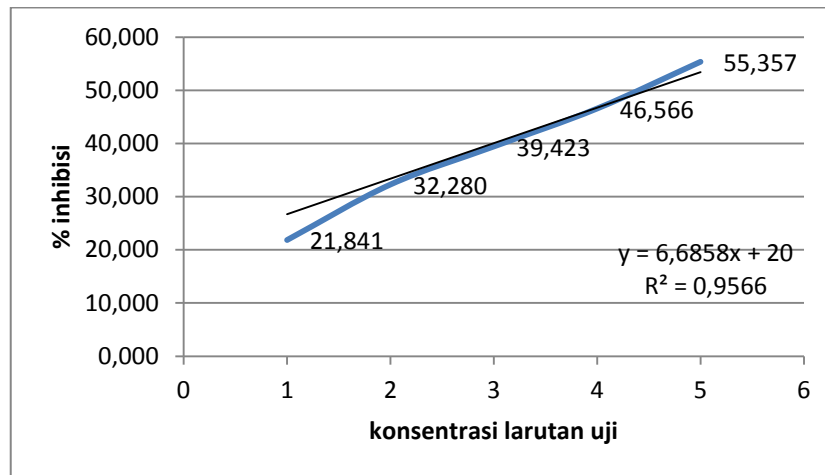
$$r = 0.9578$$

$$y = a + bx$$

$$50 = 14.698 + 0.406 \cdot X$$

$$50 - 14.698 = 0.406 \cdot X$$

$$X = 87,381 \mu\text{g/ml}$$



Replikasi II

$$a = 15.274$$

$$b = 0.407$$

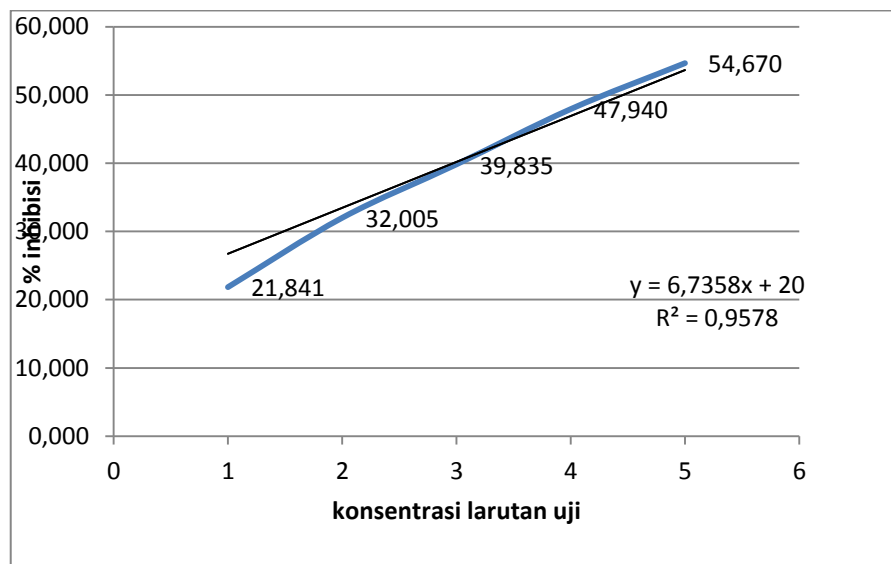
$$r = 0.9641$$

$$y = a + bx$$

$$50 = 15.274 + 0.407 \cdot X$$

$$50 - 15.274 = 0.407 \cdot X$$

$$X = 85.321 \mu\text{g/ml}$$



Replikasi III

$$a = 14.780$$

$$b = 0.407$$

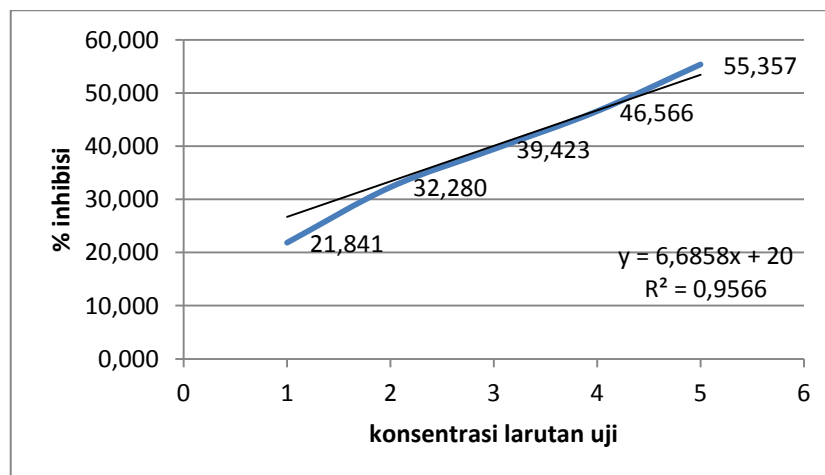
$$r = 0.9566$$

$$y = a + bx$$

$$50 = 14.780 + 0.407 \cdot X$$

$$50 - 14.780 = 0.407 \cdot X$$

$$X = 86.535 \mu\text{g/ml}$$



$$\text{Rata-rata nilai } IC_{50} \text{ ekstrak daun kacapiring} = \frac{87,381 + 85,321 + 86,535}{3}$$

$$= 86.411 \mu\text{g/ml}$$

Lampiran 27. Hasil uji statistik independent sampels t-test rata-rata nilai IC_{50} kuersetin dan ekstrak daun kacapiring

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
IC_{50} kuersetin	3	6.61000	.387991	6.162	6.837
IC_{50} ekstrak	3	86.41233	1.035464	85.321	87.381

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		ic50quersetin	ic50ekstrak
N		3	3
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	6.61000	86.41233
	Std. Deviation	.387991	1.035464
Most Extreme Differences	Absolute	.382	.214
	Positive	.279	.187
	Negative	-.382	-.214
Kolmogorov-Smirnov Z		.662	.370
Asymp. Sig. (2-tailed)		.773	.999

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Dari data uji one –sample Kolmogorov-smirnov diperoleh IC_{50} kuersetin dengan signifikasi = $0,773 > 0,05$ (H_0 diterima dan IC_{50} $0,999 > 0,05$. Disimpulkan data tersebut terdistribusi normal sehingga dapat dilakukan analisis independen sample t-test.

Group Statistics

kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
IC_{50} IC_{50} kuersetin	3	6.61000	.387991	.224007
IC_{50} ekstrak	3	86.41233	1.035464	.597825

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
<i>IC₅₀</i>	Equal variances assumed	1.871	.243	-125.001	4	.000	-79.802333	.638415	-81.574858	-78.029808
	Equal variances not assumed			-125.001	2.551	.000	-79.802333	.638415	-82.052287	-77.552380

Hasil lavene's test for equality of variances menunjukkan signifikasi = 0.243 > 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 *IC₅₀* kuersetin dan ekstrak adalah berbeda signifikan.

Lampiran 28. Hasil pengukuran GPx

kelompok	Kode hewan	absorbansi	Kadar (U/mg)	Kadar rata-rata ±SD
I	I.1	0.098	75.63	78.25± 3.07
	I.2	0.102	78.71	
	I.3	0.108	83.34	
	I.4	0.099	76.40	
	I.5	0.100	77.17	
II	II.1	0.027	20.84	19.76±1.86
	II.2	0.024	18.52	
	II.3	0.023	17.75	
	II.4	0.025	19.29	
	II.5	0.029	22.38	
III	III.1	0.087	67.14	66.37±2.73
	III.2	0.090	69.45	
	III.3	0.084	64.82	
	III.4	0.081	62.51	
	III.5	0.088	67.91	
IV	IV.1	0.054	41.67	37.81±2.94
	IV.2	0.049	37.81	
	IV.3	0.044	33.95	
	IV.4	0.051	39.36	
	IV.5	0.047	36.27	
V	V.1	0.071	54.79	53.56±2.08
	V.2	0.068	52.48	
	V.3	0.066	50.93	
	V.4	0.069	53.25	
	V.5	0.073	56.33	
VI	VI.1	0.080	61.74	61.74±2.11
	VI.2	0.077	59.42	
	VI.3	0.081	62.51	
	VI.4	0.078	60.19	
	VI.5	0.084	64.82	
VII	VII.1	0.092	71.00	72.39±1.84
	VII.2	0.095	73.31	
	VII.3	0.091	70.23	
	VII.4	0.097	74.86	
	VII.5	0.094	72.54	

$$\text{Rumus perhitungan GPx} = \frac{(\text{Absorbansi} \times 1,2 \times 2 \times 1000 \times 1)}{6.22 \times \text{vs}} \times 100 \%$$

$$\text{Contoh (sampel 1)} = \frac{(0.098 \times 1,2 \times 2 \times 1000 \times 1)}{6.22 \times 0.2 \times 10} \times 100 \%$$

$$= 75.63 \text{ U/mg.}$$

Lampiran 29. Hasil uji statistic One Way Annona kadar enzim GPx hati tikus

NPar Test

Tests of Normality

kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kadarenzimgp x kelompok normal	.240	5	.200 [*]	.859	5	.226
kelompok diabetes	.199	5	.200 [*]	.957	5	.784
kelompok glibenklamid	.212	5	.200 [*]	.965	5	.842
kelompok perlakuan 1	.106	5	.200 [*]	.999	5	1.000
kelompok perlakuan 2	.158	5	.200 [*]	.990	5	.980
kelompok perlakuan 3	.168	5	.200 [*]	.964	5	.833
kelompok quersetin	.174	5	.200 [*]	.974	5	.899

a. Lilliefors Significance Correction

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

Dari data output diatas maka dapat diketahui bahwa nilai sig dari masing-masing kelompok $>0,05$ (H_0 diterima) maka dapat disimpulkan bahwa data tersebut terdistribusi normal sehingga dapat dilanjutkan dengan pengujian annova

Test of Homogeneity of Variances

Kadar Enzim GPx

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.388	6	28	.880

H_0 diterima karena nilai $p > 0,05$

ANOVA

Kadar enzim GPx

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12768.685	6	2128.114	362.177	.000
Within Groups	164.525	28	5.876		
Total	12933.210	34			

Dari data annova diatas diketahui bahwa nilai $\text{sig} = 0,000 < 0,05$ (H_0 ditolak) maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan kadar enzim GPx yang signifikan pada setiap kelompok.

Kadar enzim GPx

Tukey HSD^a

kelompok	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
kelompok diabetes	5	19.7560					
kelompok perlakuan 1	5		37.8120				
kelompok perlakuan 2	5			53.5560			
kelompok perlakuan 3	5				61.7360		
kelompok glibenklamid	5				66.3660		
kelompok quersetin	5					72.3880	
kelompok normal	5						78.2500
Sig.		1.000	1.000	1.000	.070	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Pada kelompok perlakuan kamar 4 terdapat dua dosis yang efektif yaitu pada kelompok perlakuan 3 tidak berbeda signifikan artinya sama-sama efektif untuk menaikkan GPx pada kelompok kontrol positif yang tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 3.

Multiple Comparisons

Kadar enzim GPx
Tukey HSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kelompok normal	kelompok diabetes	58.49400 [*]	1.53309	.000	53.6308	63.3572
	kelompok glibenklamid	11.88400 [*]	1.53309	.000	7.0208	16.7472
	kelompok perlakuan 1	40.43800 [*]	1.53309	.000	35.5748	45.3012
	kelompok perlakuan 2	24.69400 [*]	1.53309	.000	19.8308	29.5572
	kelompok perlakuan 3	16.51400 [*]	1.53309	.000	11.6508	21.3772
	kelompok quersetin	5.86200 [*]	1.53309	.011	.9988	10.7252
kelompok diabetes	kelompok normal	-58.49400 [*]	1.53309	.000	-63.3572	-53.6308
	kelompok glibenklamid	-46.61000 [*]	1.53309	.000	-51.4732	-41.7468
	kelompok perlakuan 1	-18.05600 [*]	1.53309	.000	-22.9192	-13.1928
	kelompok perlakuan 2	-33.80000 [*]	1.53309	.000	-38.6632	-28.9368
	kelompok perlakuan 3	-41.98000 [*]	1.53309	.000	-46.8432	-37.1168
	kelompok quersetin	-52.63200 [*]	1.53309	.000	-57.4952	-47.7688
kelompok glibenklamid	kelompok normal	-11.88400 [*]	1.53309	.000	-16.7472	-7.0208
	kelompok diabetes	46.61000 [*]	1.53309	.000	41.7468	51.4732
	kelompok perlakuan 1	28.55400 [*]	1.53309	.000	23.6908	33.4172
	kelompok perlakuan 2	12.81000 [*]	1.53309	.000	7.9468	17.6732
	kelompok perlakuan 3	4.63000	1.53309	.070	-.2332	9.4932
	kelompok quersetin	-6.02200 [*]	1.53309	.008	-10.8852	-1.1588
kelompok perlakuan 1	kelompok normal	-40.43800 [*]	1.53309	.000	-45.3012	-35.5748
	kelompok diabetes	18.05600 [*]	1.53309	.000	13.1928	22.9192
	kelompok glibenklamid	-28.55400 [*]	1.53309	.000	-33.4172	-23.6908
	kelompok perlakuan 2	-15.74400 [*]	1.53309	.000	-20.6072	-10.8808
	kelompok perlakuan 3	-23.92400 [*]	1.53309	.000	-28.7872	-19.0608
	kelompok quersetin	-34.57600 [*]	1.53309	.000	-39.4392	-29.7128
kelompok perlakuan 2	kelompok normal	-24.69400 [*]	1.53309	.000	-29.5572	-19.8308
	kelompok diabetes	33.80000 [*]	1.53309	.000	28.9368	38.6632
	kelompok glibenklamid	-12.81000 [*]	1.53309	.000	-17.6732	-7.9468
	kelompok perlakuan 1	15.74400 [*]	1.53309	.000	10.8808	20.6072
	kelompok perlakuan 3	-8.18000 [*]	1.53309	.000	-13.0432	-3.3168
	kelompok quersetin	-18.83200 [*]	1.53309	.000	-23.6952	-13.9688
kelompok perlakuan 3	kelompok normal	-16.51400 [*]	1.53309	.000	-21.3772	-11.6508
	kelompok diabetes	41.98000 [*]	1.53309	.000	37.1168	46.8432
	kelompok glibenklamid	-4.63000	1.53309	.070	-9.4932	.2332
	kelompok perlakuan 1	23.92400 [*]	1.53309	.000	19.0608	28.7872
	kelompok perlakuan 2	8.18000 [*]	1.53309	.000	3.3168	13.0432
	kelompok quersetin	-10.65200 [*]	1.53309	.000	-15.5152	-5.7888
kelompok quersetin	kelompok normal	-5.86200 [*]	1.53309	.011	-10.7252	-.9988
	kelompok diabetes	52.63200 [*]	1.53309	.000	47.7688	57.4952

kelompok glibenklamid	6.02200 [*]	1.53309	.008	1.1588	10.8852
kelompok perlakuan 1	34.57600 [*]	1.53309	.000	29.7128	39.4392
kelompok perlakuan 2	18.83200 [*]	1.53309	.000	13.9688	23.6952
kelompok perlakuan 3	10.65200 [*]	1.53309	.000	5.7888	15.5152

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.