

BAB VI

RINGKASAN

Berdasarkan pola pertumbuhan penduduk Indonesia diperkirakan pada tahun 2020 sejumlah 128 juta penduduk Indonesia berusia di atas 20 tahun asumsi prevalensi sebesar 4% akan diperoleh 7 juta penduduk menderita diabetes mellitus. Berdasarkan data World Health Organization (WHO) pada tahun 1998, diperkirakan jumlah penderita diabetes mellitus akan meningkat 250% dari 5 juta penduduk pada tahun 1995 menjadi 12 juta penduduk pada tahun 2025 (Soegondo, 2007).

DM tipe 2 ditandai adanya resistensi jaringan terhadap kerja insulin, berakibat pada defisiensi sekresi insulin (Katzung, 2010). Resistensi insulin berperan penting dalam patogenesis DM tipe II. Manifestasi klinis dari resistensi insulin, intoleransi glukosa dan hiperinsulinemia adalah konsekuensi dari ketidakmampuan insulin untuk merangsang penyerapan glukosa dalam jaringan target insulin, seperti otot dan lemak (Garvey *et al.*, 1998).

Salah satu terapi pada DM tipe 2 adalah pemberian obat hipoglikemik oral. Golongan biguanida merupakan obat antidiabetes yang tidak menstimulasi pelepasan insulin dan tidak menurunkan gula darah pada orang sehat (Tjay & Rahardja, 2006). Golongan biguanida mempunyai efek penurunan kadar glukosa darah melalui produksi glukosa di hati yang menurun (glukoneogenesis), meningkatkan penggunaan glukosa pada jaringan adipose dan otot, menurunkan absorpsi glukosa di usus dan meningkatkan sintesis glikogen. Contoh obat

golongan ini adalah metformin (Nugroho, 2012). Efek samping yang sering terjadi dari penggunaan obat pada golongan biguanid adalah terjadinya anoreksia (Reid *et al.*, 2007)

Beberapa jenis obat diabetes mellitus saat ini cukup mahal dan pendistribusian obat yang belum optimal sampai keseluruhan pelosok tanah air, sehingga memerlukan pengelolaan yang lebih murah dan efektif untuk mengatasi pengendalian kadar glukosa pada penderita DM dengan terapi alternatif yakni menggali potensi lokal menggunakan tanaman obat (Hupatea, 1994). Pengobatan DM dengan bahan herbal banyak dicari terutama yang efektif, aman dan efek samping rendah.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Saravaanan dan Pari (2006) menyimpulkan bahwa pemberian ekstrak air kulit batang juwet dosis 300 mg/kgBB selama 30 hari dapat menurunkan kadar glukosa darah dan memiliki efek yang lebih besar dari pada pemberian glibenklamid 600 µg/kgBB. Penelitian yang dilakukan oleh Saraswaty (2010) menyebutkan bahwa kulit batang juwet memiliki aktivitas *alfa glukosidase*.

Berdasarkan hasil penelitian terdahulu tentang aktivitas antidiabetes kulit batang juwet, maka peneliti tertarik untuk menguji pengaruh fraksi etil asetat dari ekstrak etanol kulit batang juwet terhadap *glucose transporter* (GLUT-4) dalam proses insulin *signaling*, terutama pada jaringan otot paha (*soleus muscle*) tikus yang menderita DM tipe II resistensi insulin. Kulit batang juwet yang memiliki efektifitas mempercepat keluarnya glukosa dari sirkulasi, dengan cara mempercepat peredaran darah yang erat kaitannya dengan kerja jantung dan

dengan cara mempercepat filtrasi dan ekskresi ginjal sehingga produksi urin meningkat, laju ekskresi glukosa melalui ginjal meningkat sehingga kadar glukosa dalam darah menurun (Suryowinoto, 2005). Tanaman juwet memiliki efek α -amilase inhibisi, anti inflamasi, menurunkan stress oksidatif dan regenerasi sel β serta meningkatkan *uptake* glukosa (Krishna *et al.*, 2013; Chang & Shen, 2013).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian fraksi etil asetat dari ekstrak etanol kulit batang juwet dapat menurunkan kadar glukosa darah dan meningkatkan translokasi protein GLUT-4 jaringan otot tikus pada tikus yang mengalami DM tipe II resistensi insulin serta mengetahui besarnya dosis fraksi etil asetat dari ekstrak etanol kulit batang juwet memberikan efek paling optimal terhadap penurunan kadar glukosa darah dan peningkatan translokasi protein GLUT-4 jaringan otot tikus yang mengalami DM tipe II resistensi insulin.

Hewan uji yang digunakan yakni tikus putih galur wistar. Kelompok dibagi menjadi 7 kelompok yakni kontrol normal, kontrol negatif CMC Na 1%, kontrol positif (Metformin 45 mg/kgBB), fraksi etil asetat 25 mg/kg BB, fraksi etil asetat 50 mg/kg BB, fraksi etil asetat 100 mg/kg BB, ekstrak etanol 150 mg/kg BB. Masing-masing kelompok menggunakan 5 tikus.

Pengelompokan hewan uji dibagi menjadi 2 kelompok yakni kelompok normal (tanpa perlakuan) dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol normal diberikan pakan standart dan air, kelompok perlakuan diberikan makanan tinggi lemak (pakan pellet 80%, lemak babi 15%, kuning telur bebek 5%) dan fruktosa selama 50 hari. Tujuan pengelompokan adalah untuk membandingkan nilai

resistensi insulin tikus normal dan tikus yang diberikan pakan high fat diet-fruktosa. Setiap 5 hari sekali dilakukan penimbangan berat badan tikus dan kadar glukosa darah dilihat pada hari ke-30 dan 50. Tikus diberikan larutan uji 2x sehari selama 15 hari sesuai dengan dosis yang diberikan. Kadar glukosa darah tikus diuji pada hari ke-8 (T2) dan ke-15(T3). Tikus selanjutnya dibedah dan diambil jaringan otot paha (*soleus muscle*) dan dilakukan preparasi dan pengamatan secara imunohistokimia untuk mengamati translokasi protein GLUT-4.

Berdasarkan pengukuran kadar glukosa darah pada hari ke-0, 30 dan 50 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar glukosa darah lebih tinggi pada kelompok tikus yang diberi *high fat diet* dibandingkan dengan kelompok tikus normal. Hasil pengukuran rata-rata prosentase peningkatan berat badan tikus terjadi peningkatan berat badan tikus yang signifikan antara kelompok tikus yang diberi *high fat diet* dengan kelompok tikus normal.

Hasil analisis statistik dengan *independent sample t-test* menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) pada pemberian pakan *high fat diet* selama 50 hari. Sehingga mengindikasikan bahwa pemberian pakan *high fat diet* dan fruktosa menyebabkan kenaikan berat badan pada kelompok tikus *high fat diet* secara bermakna dibandingkan dengan kelompok tikus normal

Kenaikan kadar glukosa darah tikus setelah pemberian pakan *high fat diet* fruktosa dan kuning telur bebek p.o sampai pada hari ke-50 menunjukkan hasil berbeda bermakna dibandingkan tikus normal seperti yang ditampilkan pada. Hal ini membuktikan bahwa pemberian pakan *high fat diet* dan fruktosa dapat menginduksi terjadinya kondisi DM tipe II resistensi insulin.

Tikus yang dinyatakan resistensi insulin dilakukan pemberian larutan uji sesuai kelompok selama 15 hari. Pada hari ke-8 dan 15 dilihat hasil penurunan kadar glukosa darah. Penurunan kadar glukosa darah tertinggi pada kelompok fraksi etil asetat kulit batang juwet 100 mg/kg BB. Hasil analisa statistik dengan *uji independent sample test* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($P < 0.05$) antara tikus normal dengan tikus resistensi insulin pada peningkatan kadar glukosa darah selama 50 hari. Hal ini membuktikan bahwa pemberian pakan *high fat diet* dan fruktosa dapat menginduksi terjadinya kondisi DM tipe II resistensi insulin.

Pemeriksaan translokasi protein GLUT-4 pada jaringan otot dengan *Immunohistochemistry* (IHC). Nilai GLUT-4 dinyatakan dengan perhitungan dengan mengalikan luas area dengan intensitas warna.

Perhitungan translokasi Glut-4 dengan perkalian antara luas dan intensitas dianggap bersifat subjektif karena intensitas warna bisa dipengaruhi pencahayaan mikroskopis, sehingga pengamatan intensitas warna GLUT4 pada jaringan otot dalam penelitian ini merupakan pemeriksaan secara kualitatif. Jaringan otot tampak berwarna coklat pekat menunjukkan bahwa terdapat jumlah GLUT 4 yang mengalami translokasi ke membran sel teraktivasi dan berikatan dengan antibodi GLUT-4. Dalam keadaan diabetes mellitus penampakan bercak yang berwarna abu-abu keperakan dibandingkan dengan yang berwarna coklat pekat karena penghantaran sinyal PI-3 kinase yang berakibat translokasi GLUT 4 ke membran sel berkurang. Hal tersebut terjadi pada kondisi DM resistensi insulina (Goldstein, 2000; Kahn and Saltiel, 2001; Powers, 2005).

Pemeriksaan imunohistokimia menggunakan GLUT4 sebagai antibodi. Pewarnaan *background* yang tidak spesifik karena ialah ikatan non imunologi antara sera imun spesifik dengan tekanan-tekanan hidrofobik dan elektrostatis pada daerah-daerah tertentu di jaringan merupakan kendala yang umumnya terjadi dalam proses preparasi imunohistokimia (Elmendorf, 2002).

Hasil perhitungan rata-rata protein GLUT-4 menunjukkan kelompok normal memiliki rata-rata protein GLUT-4 tertinggi, dilanjutkan kontrol positif, fraksi etil asetat 100 mg/kg BB, ekstrak etanol 150 mg/kg BB, fraksi etil asetat 100 mg/kg BB, fraksi etil asetat 25 mg/kg BB dan negative. Kelompok kontrol normal merupakan kelompok yang tidak dikondisikan DM tipe II resistensi insulin, dalam hal ini tidak diberi pakan *high fat diet*, lemak babi dan fruktosa sehingga menjadi kelompok yang paling tinggi nilai translokasi protein GLUT-4 nya, sedangkan untuk kelompok II (kontrol negatif) memiliki nilai translokasi protein GLUT-4 terendah.

Hasil statistik dengan *one way* ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) terhadap translokasi GLUT-4, dilanjutkan dengan uji *post hoc* menggunakan *tukey* menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok negatif dengan kelompok positif, fraksi etil asetat 100 mg/kg BB dan 50 mg/kg BB serta ekstrak etanol 150 mg/kg BB artinya kelompok positif, fraksi etil asetat 100 mg/kg BB dan 50 mg/kg BB serta ekstrak etanol 150 mg/kg BB memiliki kemampuan sebagai terapi antidiabetes pada tikus yang dikondisikan resisten insulin.

Hasil analisa kelompok fraksi etil asetat 25 mg/kg BB tidak ada perbedaan yang signifikan ($p > 0.05$) dengan kelompok negatif menunjukkan bahwa fraksi etil asetat 25 mg/kg BB kurang memiliki kemampuan sebagai terapi antidiabetes pada tikus resistensi insulin, diduga akibat dosis fraksi kecil yang diberikan dalam terapi sehingga tidak cukup mampu mengaktifkan kembali reseptor protein GLUT-4 pada tikus tipe 2 resistensi insulin.

Senyawa kima yang terdapat dalam kulit batang juwet yakni flavonoid, tanin, saponin. Flavonoid menstimulasi 16 % peningkatan pengeluaran insulin dari sel beta pancreas. Aksi tersebut melalui pengaturan *peroxisome proliferators activated receptors (PPAR α dan PPAR γ)*. Mekanisme kerja flavonoid yang diabetes mellitus adalah melalui kemampuannya untuk menghindari penyerapan glukosa atau memperbaiki toleransi glukosa. Flavonoid meningkatkan pengambilan glukosa pada jaringan perifer, mengatur aktivitas dan ekspresi enzim yang terlibat dalam jalur metabolisme karbohidrat dan bertindak menyerupai insulin, dengan mempengaruhi mekanisme signaling insulin. (Cazaroll & Luisa H, 2008)

Myricetin dapat menekan berat badan dan akumulasi lemak tubuh dengan meningkatkan oksidasi lemak melalui up-regulasi PPAR γ dan down-regulasi SREBPs. *Myricetin* dapat meningkatkan oksidasi asam lemak dihati, ketogenesis, penurunan kadar lipid di jaringan serta melindungi dari lipotoxicitas (Chang *et al.*, 2011).

Batang juwet yang memiliki efektifitas mempercepat keluarnya glukosa dari sirkulasi, dengan cara mempercepat peredaran darah yang erat kaitannya

dengan kerja jantung dan dengan cara mempercepat filtrasi dan ekskresi ginjal sehingga produksi urin meningkat, laju ekskresi glukosa melalui ginjal meningkat sehingga kadar glukosa dalam darah menurun (Suryowinoto, 2005).

Tanin berfungsi sebagai astringent atau pengkhelat dapat mengerutkan membrane epitel usus halus sehingga dapat mereduksi penyerapan sari makanan dan menghambat peningkatan kadar gula darah (Dalimartah, 2005). Mekanisme kerja saponin dengan menstimulasi pelepasan insulin dan memblok pembentukan glukosa dalam aliran darah (Bhusnan *et al.*, 2010).

Hasil analisa korelasi penurunan kadar glukosa darah dan peningkatan jumlah protein GLUT-4 menunjukkan adanya nilai signifikansi (0,011) kurang dari 0,05 sehingga ada hubungan antara persen penurunan kadar glukosa darah dengan peningkatan translokasi protein GLUT-4 (luas area x intensitas).

Berdasarkan analisis regresi linear antara penurunan kadar glukosa darah dan peningkatan jumlah protein GLUT-4 dapat dijelaskan bahwa peningkatan jumlah protein GLUT-4 mempengaruhi terhadap penurunan kadar glukosa darah tikus sebesar 91,3%, sementara 8,7% dipengaruhi oleh faktor yang lain yang tidak diamati.

Banyaknya protein GLUT-4 yang ditranslokasikan ke membran sel otot, menyebabkan penggunaan glukosa oleh jaringan semakin banyak pula, sehingga jumlah glukosa dalam darah menjadi berkurang karena banyak yang dapat diangkut ke dalam jaringan. Di dalam jaringan glukosa akan diubah menjadi ATP (energi) setelah melalui mekanisme glikolisis.

DAFTAR PUSTAKA

- [Departemen Kesehatan RI]. 1985. *Cara Pembuatan Simplisia*. Jilid III. Jakarta. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1-15.
- [Departemen Kesehatan RI]. 1989. *Materia Medika Indonesia*. Jilid V. Jakarta.
- [Departemen Kesehatan RI]. 1993. *Pedoman Pengujian dan Pengembangan Fitofarmaka. Penapisan Farmakologi, Pengujian Fitokimia dan Pengujian Klinik. Pengembangan dan Pemanfaatan Obat Bahan Alam*. Jakarta. 19-20.
- [Departemen Kesehatan RI]. 2005. *Pharmaceutical Care untuk Penyakit Diabetes Mellitus*. Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik, Direktorat Jendral Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan Departemen Kesehatan RI. 15,18
- Adriani A. 2011. *Skrining Fitokimia dan Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase pada Ekstrak Etanol dari Beberapa Tanaman yang digunakan sebagai Obat Antidiabetes*. [Skripsi]. FMIPA, UI
- Agoes A, Kamalludin, Chaidir J, Munaf S, Natadiputra,dkk. 2006. *Kumpulan Kuliah Farmakologi*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran ECG. Hlm
- Agus K. *Dasar-dasar Ilmu Gizi*. Malang: UMM Pres; 2004
- Akhmad F, Anis I, Lilik H. 2007. Perbedaan latihan fisik jangka pendek dan jangka panjang terhadap glukosa darah pada penderita diabetes mellitus. *Majalah Ilmu Faal Indonesia*. Vol 6.(3). 140-152
- Atef E. Abd El-Baky. 2011. Quercetin Protective Action On Oxidative Stress, Sorbitol, Insulin Resistance And B-Cells Function In Experimental Diabetic Rats. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*. Vol II. 11-18
- Alberti G. Introduction to the Metabolic Syndrome. *Eur Heart J* 2005; 7:D3-D5.
- Ali N. 2011. *Diabetes and You A Comprehensive, Holistic Approach*. Rowman & Littlefield Publishers, Inc. hlm 3.
- Aliyan, A. H. 2012. *Uji Penghambatan Aktifitas Alfa Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Aktif Ekstrak Biji Mahoni (Swietenia macrophylla king)* [Skripsi]. Depok: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia
- Andayani, Y. 2003. *Mekanisme Aktivitas Antihiperlipemik Ekstrak Buncis (Phaseolus vulgaris Linn) pada Tikus Diabetes dan Identifikasi Komponen Aktif*. Disertasi. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Ansel HC. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Edisi Keempat. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.

- Arifin, H., Anggraini, N., Handayani, D., dan Rasyid, R., 2006, Standarisasi Ekstrak Etanol Daun *Eugenia cumini* Merr, *Jurnal Sains Teknologi Farmasi*, 11 (2), 88
- Atsushi K, Yuka M, Jo Y, Isao A, Alison AW, Robert JN. 2008. Protective effect of dietary chamomile tea on diabetic complication. *J Agric Food Chem*. Vol. 56 : 8206-8211
- Ayyanar M, Subash-Babu P, 2012. *Syzygium cumini* (L.) Skeels : A review of phytochemical constituents and traditional uses. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2 (3): 240-246
- Backer CAD. 1968. *Flora of Java (Spermatophytes only)*. Volume III. Noordhoff-Groningen
- Baraas.F. 2003. *Mencegah Serangan Penyakit Jantung dengan menekan kolesterol*. Jakarta: Kardia Iqratama;
- Barham, D. and D. Trinder. 1972. An improved color reagen for determination of blood glucose by the oxydase system. *Analist* 97: 142-145
- Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Poci A, & Scherer PE. 2004. *Regulation of Fasted Blood Glucose by Resistin*. *Science*,(303),1195–1198.
- Bhowmik D, Gopinath H, Kumar P, Duraivel S, Aravind G, Sampath Kumar K.P. 2013. Traditional and Medicinal Uses of Indian Black Berry. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. Vol 1.5. 35-40
- Bhuiyan, M.A., M.Y. Mia and M.A. Rashid, 1996. Antibacterial principles of the seed of *Eugenia jambolana*, *Banga J. Botany*, 25: 239-241
- Bhushan, M. S., Rao C. H., Ojha, S. K., Vijayakumar, M., & Verma, A. 2010. An analytical review of plants for anti diabetic activity with their phytoconstituen & mechanism od action. *LIPJR*, Issue 1. Vol.1
- Carey, Francis A., 2006. *Organic Chemistry*, 6th ed., New York: McGraw Hill, 954
- Chang-Chen KJ, Mullur R, Bernal-Mizrachi. Beta-cell failure as a complication of diabetes. *Rev Endoce Metab Disord*. 2008. 329-343
- Chang CJ, Tzeng TF, Liou SS, Chang YS, Liu IM. 2012. Myricetin Increases Hepatic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Protein Expression and Decreases Plasma Lipids and Adiposity in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Vol 2012, Article ID 787152, 11

- Cheung A, Ree D, Kolls JK, Fuselier J, Coy D, Bryer-Ash M. 1998. An in Vivo Model for Elucidation of the Mechanism of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Induced Insulin Resistance: Evidence for Differential Regulation of Insulin Signaling by TNF *Endocrinology*, 139(12),4928-4935
- Chisholm-Burns M.A., *et al.* 2008. *Pharmacotherapy Principles and Practice*. New York: Mc Graw-Hill.
- Cuppett S, M. Schrepf, C. Hall III. 1954. *Natural Antioxidant – Are They Reality*. Dalam Foreidoon Shahidi: *Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effect and Applications*, AOCS Press, Champaign, Illinois: 12-24
- Dalimartha, S. 2005. *Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Diabetes Melitus*. Cetakan IV, Jakarta: PT. Penebar Swadaya.
- Dalimartha S, Adrian F. 2012. *Makanan & Herbal Untuk Penderita Diabetes Mellitus*. Jakarta: Penebar Swadaya. 9-10
- Desmiaty, Y, Rahmawati J, Andini, P. 2009. *Penentuan Jumlah Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Buah Merah (Pandanus Conoideus Lamk.) Secara Kolorimetri Komplementer*. Seminar Nasional POKJANAS. Jogjakarta
- DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM. 2008. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, Seventh Edition. McGraw-Hill, New York.
- Eka SS, Agung EN, Suwijoyo P.2011. Aktivitas antiabetes kombinasi ekstrak terpurifikasi herba sambiloto (*Andrographis paniculata* [Burn. F.]Ness.) dan metformin pada tikus DM tipe 2 resistensi insulin. *Majalah Obat Tradisional*. 16(3), 124-131
- El-Abhar, H. S., & Schaalán, M. F. 2014. Phytotherapy in diabetes: Review on potential mechanistic perspectives. *World Journal of Diabetes*. 15; 5(2): 176-197
- Elmendorf, J. S., 2002. Signals that Regulate GLUT4 Translocation. *J. Membr. Biol.*, 190(3), p. 167-174.
- Ehtesham NZ. 2001. Molecular link between diabetes and obesity: The resistin story. *Current Science*, 80(11),34-37
- Fang XK, Gao J, Zhu DN. 2008. Kaemferol and Quercetin Isolated from *Euonymus alatus* improve glucose uptake of 3T3-L1 cells without adipogenesis activity. *Life Sci*; 82: 615-622
- Farida S, Roselinda, Suhardi. 2010. Hubungan Diabetes Mellitus dengan Obesitas Berdasarkan Indeks Massa Tubuh dan Lingkar Pinggang Data Riskesdas 2007. *Buletin Penerbit Kesehatan*. Vol 38. No.1. 36-42

- Farmer JA.(2008) *Obesity and Inflammation : Implication for Atherosclerosis dalam Packer L, Sies H. (Ed),Oxidative Stress and Inflammatory Mechanisms in Obesity, Diabetes, and the Metabolic Syndrome*.New York: CRC Press. 139 –60
- Ganong W. 2002. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi IX. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Garvey WT, Maianu L, Zhu JH, Brechtel-Hook G, Wallace P, Baron AD. 1998. Evidence for Defects in the Trafficking and Translocation of GLUT4 Glucose Transporters in Skeletal Muscle as a Cause of Human Insulin Resistance. *The Journal of Clinical Investigation*; Vol 101(11): 2377–2386.
- Goldstein, B. J., 2000. Regulation of Insulin Action by Protein-Tyrosine Phosphatases. In: D. LeRoith, S. I. Taylor, J. M. Olefsky (Eds.). *DM, A Fundamental and Clinical Text, 2nd Ed.*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 206-207.
- Goodman, Gilman A, editor. 2007. *Dasar Farmakologi Terapi*. Ed. Ke-10. Volume 2. Jakarta.
- Goodyear Li, Khan BB. 1998. *Exercise, Glucose Transport and Insulin Sensitivity*, Annu. Rev. Mcd.39: 235-261
- Greene RJ, Harris ND, GoodyerLI. *Pathology and Theurapeutics for Pharmacists : A Basic for Clinical Pharmacy Practice*. Chapman and Hill. London. 409-415
- Gunawan D, Mulyani S. 2004. *Ilmu Obat Alam*. Jilid I. Jakarta: Penebar Swadaya
- Hafidasari pitoyo F.L, Fatmawati H. 2012. The Effect of Quercetine to Reduced Trigliceride and Blood Glucose Level in Animal Model Diet-Induced Obesity. *Jurnal Medika Planta*. Vol 1. No.5.36-46
- Hagerman, A.E. 1998. Tannins Chemistry. hagermae@muohiu.edu. Diakses tanggal 9 September 2014
- Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Penerbit ITB, Bandung, hal 47-109 dan 281.
- Harminta, Radji M. 2005. *Buku Ajar Analisa Hayati*. Jakarta : Departemen Farmasi FMIPA. Hlm 76
- Hertog, Michael GL, Peter CH, Hollman, Betty van de Putte. 1993. Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of Tea Infusions, Wines, and Fruit Juices. *J. Agric. Food Chem* (41): 1242-1246

- Hong EG *et al.* 2009. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. *Diabetes.Diabetesjournal.org*.58: 2525-2535
- Hotamisligil GS. 2000. Molecular Mechanism of Insulin Resistance and The Role of the Adipocyte. *International Journal of Obesity*. 4. Suppl 4: S23-S27.
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM.(1995) Increased Adipose Tissue Expression on Tumor Necrosis Factor α in Human Obesity and Insulin Resistance. *The Journal of Clinical Investigation*. 95 : 2409 –15.
- Hutapea JR.1994. *Investaris tanaman obat Indonesia III*. Jakarta:Depkes RI.hlm 201-201
- Ibrahim R. 2010. Diabetes Mellitus Type II : Review Of Oral Treatment Options, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol 2, Suppl 1: 21-30.
- Inawati. 2011. *Pengaruh Ekstrak Biji Juwet terhadap Penurunan Glukosa Darah pada Mencit BALB/c Jantan yang Diinduksi Streptozotocin*. Departemen Patologi dan Anatomi. Universitas Wijaya Kusuma.Surabaya
- Indira, G. and R.J. Mohan, 1993. *National Institute of Nutrition Indian council of Medical Research*, Hyderabad, pp: 34-37
- Jones RM, Rospond RM. 2003. *Patient Assesment in Pharmacy Praticce*. Philadelphhia: Lippicott William & Wilkins
- Kamal.2008.TaksonomiTikusWistar.<https://www.google.com/search?q=taksonomi+tikus+putih+wistar&ie=utf-8&oe=utf-8&aq=t&rls=org.mozilla:en:official&client=firefox-a&channel=sb> (Diakses pada tanggal 28 Mei 2014).
- Karam J H, Patricia P R., Salber, Forsham P H. 1996. Pancreatic Hormones and Diabetes Mellitus, In Greenspan, F.S., *Basic and Clinical Endocrinology*, 3rd Ed, 593-649, Prentice-Hall International Inc., London.
- Katzung BG. 2010. *Farmakologi Dasar dan Klinik* . Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG. Hlm 704-705
- Kahn, C. R., Saltiel, A. R., 2001. Insulin Signaling and the Regulation of Glucose and Lipid Metabolism. *Nature*, Vol. 414, pp. 799-806.
- Khotib J, Kasih E, Dorotea, D, Palestin N, Aryani T, Susilo I. 2010. Pengaruh Vanadil sulfat terhadap aktivitas Glucose Transporter 4 Jaringan Otot dan Adiposa Mencit (Mus Musculus) yang menderita Diabetes Mellitus. *Majalah Farmasi Airlangga*. Vol 8. No.1

- Kidson W. 2002. *Insulin Resistance: Is testing worthwhile?* Commonsense pathology.11:1-5
- Kirtishanti A, Budiono R, Ratih, Isfandiari F. 2008. Efek Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) Terhadap Jumlah Protein GLUT4 Pada Tikus Putih Hiperglikemik. *Jurnal Farmasi Indonesia* Vol. 4 No. 2 Juli 2008: 55 – 62. Universitas Surabaya.
- Kirtikar, K.R. and B.D. Basu, 1975. In *Indian Medicinal Plants*. Vol. II (Periodical Experts, New Delhi), pp: 1052-53.
- Krishna BP, Indra PT, Mahendra KM, Neelesh D, Yogesh P, Arti K, Priyanka G, Nupa D, Chinmayi M. 2013. A Critical Review oo Traditional Herbal Drug : An Emerging Alternative Drug For Diabetes. *International Journal of Organic Chemistry*. 3. 1-22
- Kristijono A. 2008. *Obat Tradisional dan Fitofarmaka*. Institute Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata. Kediri
- Kumar A, Verma VK. 2011. *Syzygium cumini* : An overview. *Journal of Chemical and pharmaceutical Research*. 3(3) : 108-113
- Kuroda M, Mimaki Y, Sashida Y, Mae T, Kishida H, Nishiyama T, et al. Phenolics with PPAR- γ ligand-binding activity obtained from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* roots) and ameliorative effects of glycyrrin on genetically diabetic KK-Ay mice. *Bioorg Med Chem Lett* 2003; 13: 4267–72.
- Kusumoto, I.T., T. Nakabayashi and H. Kida, 1995. Screening of various plant extracts used in ayurvedic medicine for inhibitory effects on human immunodeficiency virus type I (HIV-I) protease, *Phytother. Res.*, 12: 488-493
- Lathifah QA. 2008. *Uji Efektivitas Ekstrak Kasar Senyawa Antibakteri pada Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi* L.) dengan Variasi Pelarut*. Malang : Skripsi Universitas Islam Negeri Malang.<http://lib.uin-malang.ac.id/files/thesis/fullchapter/03530015.pdf> (diakses tanggal 2/07/2014)
- Lawrence J C. 1994. Insulin and Oral Hypoglycemic Agents. In Brady, T.M., Lamer, J. Minneman, K.P., and Neu, H.C. (Ed), *Human Pharmacology*, 2nd Ed., 523-539, Mosby, London
- Lenny S. 2006, *Senyawa Terpenoida dan Steroida*, Karya Ilmiah FakultasMIPA, Universitas Sumatera Utara, Medan, hal 6 dan 14.
- Leonor R, Rocio M, Manuei S, Antonio Z, Milagros G. 2008. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese zucker rats. *Obesity*. 16: 2081-2087

- Lian J *et al.* 2007. The use of high-fat/carbohydrate diet-fed and streptozotocin-tread mice as a suitable animal model of type 2 diabetes mellitus. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 34: 21-29
- Lin, Y., & Sun, Z. 2010. Current views on type 2 diabetes. *Journal of Endocrinology*: 204, 1–11.
- Malole M B B, Pramono C S U. 1989. *Penggunaan Hewan-hewan Percobaan di Laboatorium*. Pusat antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Mansjoer A, Triyanti K, Savitri R. 2001. *Kapita Selekta Kedokteran*. Edisi ketiga (jilid I). Jakarta : Media Aesculapius FKUI. Hlm 580
- Marek R, Grycova L, Dostal,J., 2007, Quaternary Protoberberine Alkaloids, *Phytochemistry* vol. 68, 150-175.
- Markham, K. R., 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: Penerbit ITB. Hal. 5,10.
- Merck. 1987. *Buku Pedoman Kerja Kimia Klinik*. Jakarta. Hlm 62-78
- Merentek E. 2006. Resistensi Insulin pada Diabetes tipe 2. *Cermin Dunia Kedokteran*. 150
- Miyazaki Y, Pipek R, Mandarino LJ, & DeFronzo RA. 2003. Tumor necrosis factor and insulin resistance in obese type 2 diabetic patients. *Int J Obes Relat Metab Disord*, Vol.27,88–94.
- Midian S. 1993. *Penapisan Farmakologi, Pengujian Fitokimia dan Pengujian Klinik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Modi, P. 2007. Diabetes beyond insulin: review of new drugs for treatment of diabetes. *Current Drug Discovery Technologies*. 1 (4): 39-47.
- Moran A, Jacobs Jr DR, Steinberger J, Hong CP, Prineas R, Luepker R, Sinaiko AR. 1999. Insulin Resistance During Puberty: Results From Clamp Studies in 357 Children. *Diabetes*. 48.2039-2044
- Murray RK, Granner D K, Mayes PA, Rodwell VW. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry*. Twenty-Sixth Edition. Lange Medical Books/McGraw-Hill
- Mursiti S. 2004. *Identifikasi Senyawa Alkaloid dalam biji Mahoni Bebas Minyak (Swietenia macrophylla King) dan efek biji Mahoni terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Putih (Rattus novergicus)*. [Tesis]. UGM
- Nugroho AE. 2006. Hewan percobaan diabetes mellitus : patologi dan mekanisme aksi diabetogenik. *Biodiversitas* 7: 378-382
- Nugroho AE. 2012. Farmakologi Obat-obat Penting dalam Pembelajaran Ilmu Farmasi dan Dunia Kesehatan. Pustaka Pelajar.144-153

- Nuraliev IUM, Avezov GA. 1992. The efficacy of quercetin in alloxan diabetes. *Eksp Klin Farmakol.* 52: 42-44
- Pateh, U. U., Haruna A. K., Garba, M., Iliya, I., Sule, I. M., Abubakar, M. S. and Ambi A.A.. 2009. Isolation of stigmasterol, β -sitosterol, and 2-hydroxyhexadecanoid acid methyl ester from rhizomes of *Stylochiton lancifolius*. *Nig. Journ.Pharm. Sci.* 8 (1): 19-25.
- Pepato M.T, V.B.B. Folgado, I.C. Kettelhut, I.L. Brunetti. 2001. Lack of anti-diabetic effect of *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, 34: 389-395
- Perkeni. 2010. *Panduan Pelayanan Kesehatan Bagi Peserta Prolanis Penderita Diabetes Melitus Tipe-2*. Perkumpulan Endokrinologi Indonesia. Jakarta
- Perkeni. 2011. *Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Mellitus di Indonesia 2011*. Perkumpulan Endokrinologi Indonesia. Jakarta
- Pitoyo FLH, Fatmawati H. 2012. The Effect of Quercetine to Reduced Triglyceride and Blood Glucose Level in Animal Model Diet-Induced Obesity. *Jurnal Medika Planta.* Vol 1. 5 : 36-46
- Powers A. 2001. Diabetes Mellitus. Di dalam: Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J, editor. *Harrison's principles of internal medicine*. Edisi ke-15. New York: McGraw-Hill. hlm. 2109 - 37.
- Powers, A. C., 2005. DM. In: Dennis L. K., Anthony S. F., Dan L. L., Eugen B., Stephen L. H., J. Larry Jameson (Eds.). *Harrison's Principles of Internal Medicines, Vol. 2*, USA: McGraw-Hill.
- Putra PD, Verawati. 2011. Analisa Kandungan Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan dari Rempah Tumbuhan Obat Sumatera Barat. *Scientia.* Vol 1.No.1.1-7
- Raja L.L. 2008. Pengaruh ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum basilicum*) terhadap kadar malondialdehid dan glukosa darah tikus putih jenis wistar yang diinduksi aloksan monohidrat. *Jurnal Biologic.* 6 (1) : 33-38
- Ravi, K., D. Satish Sekar and S. Subramanian, 2004. Hypoglycemic activity of Inorganic constituents of *Eugenia jambolana* seed on streptozocin inuced diabetes in rat, *Biological Trace Element Research.* Vol.,99: 145.
- Reid J, Rubin P, Whitin B, 2007. *Catatan Kuliah Farmakologi Klinis*. Edisi 4. Jakarta : Penerbit buku kedokteran EGC.Hal 280-281
- Rijke E. 2005. *Trace-level Determination of Flavonoids and Their Conjugates Application ti Plants of The Leguminosaen Family* [disetasi]. Amsterdam: Universitas Amsterdam
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Edisi V. Padmawinata K, Penerjemah; Bandung:ITB hlm 157-158, 281-286. Terjemahan dari: *The Organic Contituents Of Higher Plants*.

- Rothman D.L, Magnusson I, Cline G, Gerard D, Kahn C R, Shulman R G, Shulman G I. 1995. Decreased muscle glucose transport/phosphorylation is an early defect in the pathogenesis of noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Prod Natl Acad Sci USA*.vol.92. 983-987
- Sa'adah L. 2010. Isolasi dan identifikasi senyawa tanin Dari daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang [Skripsi]
- Saraswaty V. 2010. alpha glucosidase inhibitory activity from *syzigium sp.* *Teknologi Indonesia* 33 (1) 2010: 33–37
- Saravanan G, Leelavinothan P. 2006. Effectas of *Syzygium Cumini* Bark on Blood Glucose, Plasma Insulin and C-peptide in Streptozotocin-induced Diabetic rats. *Int J Endocrinol Metab*.Vol.4. 96-105
- Saravanan G, Leelavinothan P. 2008. Hypoglycaemic and Antihyperglycaemic Effect of *Syzygium cumini* Bark in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Journal of Pharmacology and Toxicology*.Vol 3(1). 1-10
- Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. 2005. Mechanism of Insulin Resistance in Humans and Possible Links with Inflammation. *Hypertension*.Vol 45.828-33
- Sirait, M. (2007). Penuntun Fitokimia Dalam Farmasi. Bandung: Penerbit ITB. Hal. 158-159.
- Shepherd, P. R, & Kahn, B. B. 1999. Glucose transporters and insulin action - Implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 341:248-257.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. 2006 Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*;116:1793–1801
- Shulman, G. I. 2000. Cellular Mechanisms of Insulin Resistance. *The Journal of Clinical Investigation*. 106 (2).
- Smith JB, Mangkoewidjojo S. 1988. *Pemeliharaan Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Jakarta: Universitas Indonesia. Hal. 37-57
- Soegondo. 2007. *Penatalaksanaan Diabetes Terpadu*. Balai penerbit FKUI. Jakarta.
- Soeparman. 1991. *Ilmu Penyakit Dalam*. Balai Penerbit FKUI. Jakarta.. Jilid 1. Ed kedua. 365-402

- Subahar TS, 2004. *Khasiat dan Manfaat Pare*. Penerbit Agromedia Pustaka, Jakarta
- Sudarmadji S, Haryono B, Suhardi. 2003. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta : Liberty Yogyakarta. hlm 64-65
- Sudewo B. 2004. *Tanaman Obat Populer Penggempur Aneka Penyakit*. Jakarta: Agro Media Pustaka
- Suharmiati. 2000. *Pengujian bioaktivitas anti diabetes melitus tumbuhan obat. Cermin Dunia Kedokteran*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Surabaya. No.140
- Suryowinoto S. 2005. Mengenai beberapa tanaman yang digunakan masyarakat sebagai antidiabetik untuk menurunkan kadar gula dalam darah. Badan Pengawas Obat dan Makanan. <http://www.pom.go.id/default.asp>
- Sylvia AP, Lorraine MW. 2005. *Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. ECG. Jakarta: Buku Kedokteran. Hal.1263-1264
- Szkudelski T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas, *Physiol. Res.* 50: 536-546
- Tjay T.H, Rahardja K. 2006. *Obat - Obat Penting*. Dirjen POM Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta
- Unger R H, Foster D W. 1992. Diabetes mellitus, in Wilson J.D and Foster, D.W., *Endocrinology*. 1255-1317. W.B Saunders Company. A Division of Harcourt Brace and Company. London
- Voigt R. 1995. *Pelajaran Teknologi Farmasi*. Edisi V. Penerbit Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Wilcox G. 2005. Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem*; 26 (2): 19 –39. Shephred P.R, Kahn B.B, 1999. Glucosa Transporter and Insulin Action, *The New England Journal of Medicine*, Jul 22;341(4):248-57
- Ye J, Keller JN. (2010) Regulation of energy metabolism by inflammation : A feedback response in obesity and calorie restriction. *Aging*.361 –8.
- Zhu, Qin Yan, Yu Huang and Zhen-Yu Chen. 2000. Interactions Between Flavonoids and α -Tocopherol in Human Low Density Lipoprotein. *J. Nutr. Biochem.* 11: 14-21

Lampiran 1. Surat keterangan hasil identifikasi kulit batang juwet



BAGIAN BIOLOGI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS GADJAH MADA YOGYAKARTA

Alamat: Sekip Utara Jl. Kaliurang Km 4, Yogyakarta 55281
 Telp., 0274.649.2568 Fax. +274-543120

SURAT KETERANGAN

No.: BF/337/ Ident/Det/IX/2014

Kepada Yth. :
 Sdri/Sdr. Endra Pujiastuti
 NIM. SBF 051310064
 Fakultas Farmasi USB
 Di Surakarta

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi sampel yang Saudara kirimkan ke Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM, adalah :

No.Pendaftaran	Jenis	Suku
335	<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	Myrtaceae

Demikian, semoga dapat digunakan sebagaimana mestinya.

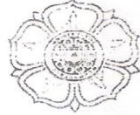
Yogyakarta, 22 September 2014

Ketua



Prof. Dr. Wahyono, SU., Apt.
 NIP. 195007011977021001

**Lampiran 2. Surat keterangan dari Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas
 Gadjah Mada, Yogyakarta**



UNIVERSITAS GADJAH MADA

Pusat Studi Pangan dan Gizi

Jln. Teknika Utara, Berek, YOGYAKARTA 55281

Telp. 0274 589242, 6492282 Web : www.cfns.ugm.ac.id

Email : cfns@ugm.ac.id

FORMULIR PEMAKAIAN FASILITAS LABORATORIUM GIZI (HEWAN COBA)

Nama Mahasiswa/Peneliti : ENDRA PUJIASTUTI, S. Farm, APT
 No. Mahasiswa : SBF 051310064
 Jurusan/Fakultas/Universitas : FARMASI, FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
 Alamat Rumah dan No. Telp/HP : Karangbener RT 01/04 kec. Bae Kudus
08 213351113
 Topik Penelitian /Judul : PENABUKH FRAKSI ETIL ASEATAT DARI EKSTRAK ETANOL KULIT BATANG JUWET
(SYZYGIUM CUMINI (L.)) TERHADAP EKSPRESI GUCOSE TRANSPORTER 4 JARINGAN
OTOT PADA TIKUS DIABETES MELITUS TIRE II RESISTENSI INSULIN
 Mulai bekerja pada tanggal : 10 NOVEMBER 2015
 Rencana penyelesaian tanggal : _____
 Diperpanjang sampai tanggal : _____
 Bekerja di laboratorium : 1. Gizi

Yogyakarta, 7 NOVEMBER 2013

Mahasiswa /Peneliti

Pembimbing Tesis/Skripsi

Yang bersangkutan

Dekan Fakultas/Pimpinan Lembaga

Terlampir

Mengetahui

Sekretaris/Bagian Administrasi

Kepala/Teknisi Lab Gizi

Mahsun Hartati

Lampiran 3. Surat keterangan Histopatologi



**UNIVERSITAS GADJAH MADA
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
BAGIAN ANATOMI- LABORATORIUM MIKROANATOMI**

Jl. Fauna No.2 Karangmalang Yogyakarta

SURAT KETERANGAN BEBAS LABORATORIUM

Nomor : 14 /MikroAna/ KH UGM/ 2/ 2015

Yang bertanda tangan di bawah ini menerangkan bahwa :

Nama : ENDRA PUJIASTUTI
 NIM : SBF 051310064
 Fakultas : Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta
 Judul Penelitian : Pengaruh Fraksi Etil Asetat dari Ekstrak Etanol Kulit Batang
 Juwet (*Syzygium Cumini (L)*) terhadap Ekspresi Glucose
 Transporter- 4 Jaringan Otot pada Tikus Diabetes Mellitus
 Tipe II Resistan Insulin.

Telah melakukan penelitian dan sudah menyelesaikan semua kewajibannya di Laboratorium Mikroanatomi, Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, dibawah **arahan dan bimbingan** drh. Teguh Budipitojo, MP.,Ph.D.

Yogyakarta, 4 Februari 2015

Kepala Laboratorium Mikroanatomi



 drh. Teguh Budipitojo, MP.,Ph.D.
 NIP: 196404181990031



Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik
Fakultas Farmasi
Universitas Gadjah Mada
 Sekip Utara Yogyakarta 55281 Telp. (0274) 902660 Fax (0274) 543120

SURAT KETERANGAN

Nomor : FA/FFK/ 002 /Kandang/I/2015

Yang bertanda tangan di bawah ini Kepala Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik Fakultas Farmasi UGM menerangkan bahwa :

Nama : Endra Pujiastuti
 NIM : SBF 051310064
 Institusi : Fakultas Farmasi Setia Budi

Telah melakukan pembelian Tikus Galur Wistar jenis kelamin Jantan umur 2 bulan sebanyak 50 ekor dalam keadaan sehat. Tikus tersebut digunakan untuk Penelitian tesis.

Pembelian dilakukan pada tanggal 20 September 2014

Demikian, semoga surat keterangan ini dapat digunakan sebaik-baiknya.

Yogyakarta, 14 Januari 2015
 Kepala Bagian,


 N Prof. Dr. Lukman Hakim, M.Sc., Apt
 NIP. 194803181977021001



**MEDICAL AND HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE (MHREC)
FACULTY OF MEDICINE GADJAH MADA UNIVERSITY
– DR. SARDJITO GENERAL HOSPITAL**



ETHICS COMMITTEE APPROVAL

Ref: KE/FK/ *98* /EC

Title of the Research Protocol : Pengaruh Faksi Etil Asetat dari Ekstrak Etanol Kulit Batang Juwet (*Syzygium cumini* (L.)) terhadap Ekspresi Glucose Transpoeter-4 Jaringan Otot pada Tikus Diabetes Mellitus Tipe II Resistensi Insulin

Documents Approved : Study Protocol versi 02 2014

Principle Investigator : Endra Pujiastuti

Name of supervisor : 1. Prof. Agung Endro N, M.Si, PhD, Apt
2. Dr. Gunawan Pamudji W, M.Si, Apt

Date of Approval : **28 JAN 2015**

Institution(s)/place(s) of research : (Valid for one year beginning from the date of approval)
Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi dan
Laboratorium Mikroanatomi Bagian Anatomi Fakultas
Kedokteran Hewan UGM

The Medical and Health Research Ethics Committee (MHREC) states that the above protocol meets the ethical principle outlined in the Declaration of Helsinki 2008 and therefore can be carried out.

The Medical and Health Research Ethics Committee (MHREC) has the right to monitor the research activities at any time.

The investigator(s) is/are obliged to submit:

- Progress report as a continuing review : Annually
- Report of any serious adverse events (SAE)
- Final report upon the completion of the study

Prof. dr. Ngatidjan, M.Sc., Sp.FK(K)
Chairman

dr. Tri Wibawa, Ph.D, Sp.MK
Secretary

Attachments:

- Continuing review submission form (AF 4.3.01-014.2013-03)
- Serious adverse events (SAE) report form (AF 6.1.01- 019.2013-03))

Recognized by Forum for Ethical Review Committees in Asia and the Western Pacific (FERCAP)
28-Jan-15

Lampiran 6. Perhitungan kadar air kulit batang juwet

Penimbangan (g)	Volume pada skala (ml)	Kadar air (%)
20,0	1,0	5%
20,0	1,3	6,5%
20,0	1,2	6%
Rata-rata		5,83%

$$\text{Rumus kadar air} = \frac{\text{Volume yang terbaca}}{\text{Berat bahan}} \times 100\%$$

1. Kadar air = $\frac{1,0}{20,0} \times 100\% = 5\%$
2. Kadar air = $\frac{1,3}{20,0} \times 100\% = 6,5\%$
3. Kadar air = $\frac{1,2}{20,0} \times 100\% = 6\%$

$$\text{Kadar air rata-rata} = \frac{5\%+6,5\%+6\%}{3} = 5,83\%$$

Lampiran 7. Foto Kandungan kimia kulit batang juwet



Saponin (Buih stabil)



Terpenoid (warna orange)



Tanin (biru tua)



Flavonoid (lapisan merah jingga)

Lampiran 8. Foto serbuk kulit batang juwet, ekstrak etanol, fraksi etil asetat kulit batang juwet



serbuk kulit batang juwet



ekstrak etanol



Fraksi etil asetat kulit batang juwet



Fraksi n-Heksan kulit batang juwet

Lampiran 9. Perhitungan Rendemen fraksi etil asetat dari ekstrak etanol kulit batang juwet

Bobot serbuk (g)	Bobot ekstrak etanol (g)	Bobot Fraksi etil asetat (g)	Rendemen (%)
1100,0	224,41	10,36	4,62
1100,0	223,90	10,20	4,55
1100,0	222,98	9,96	4,47
	Rata-rata		4,55%

$$\text{Rumus Rendemen} = \frac{\text{Bobot fraksi etil asete}}{\text{Bobot ekstrak etanol}} \times 100\%$$

$$1. \text{ Rendemen} = \frac{10,36}{224,41} \times 100\% = 4,62\%$$

$$2. \text{ Rendemen} = \frac{10,20}{223,90} \times 100\% = 4,55\%$$

$$3. \text{ Rendemen} = \frac{9,96}{222,98} \times 100\% = 4,47\%$$

$$\text{Kadar air rata-rata} = \frac{4,62\% + 4,55\% + 4,47\%}{3} = 4,55\%$$

Lampiran 10. *Sterling bidwell* , *Evaporator*, *GOD-PAP* dan Serum



Sterling bidwell



Evaporator



GOD-PAP



Serum dan GOD-PAP

Lampiran 11. Foto *High Fat Diet* dan hasil perhitungan

1. Pembuatan *High Fat Diet*



Pakan pellet 80%



Telur Bebek 5 %



Lemak Babi 15 %



**Proses Pencampuran
pelet & minyak babi**

2. Perhitungan pembuatan *High Fat Diet*

Jumlah pemberian maksimal pakan untuk tikus per harinya adalah 15 gram/ekor. Pembuatan pakan kaya lemak dilakukan tiap 3 hari agar kondisi pakan kaya lemak tetap terjaga dari kerusakan.

Hewan uji dengan menggunakan pakan *High Fat Diet* terdiri dari 6 kelompok, dimana 1 kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Total tikus 30 ekor.

Jumlah total pakan per hari untuk 1 ekor tikus = 15 gram. $15 \text{ gram} \times 36 \text{ ekor} = 540 \text{ gram}$

- Pakan pelet 80% = 80 % x 540 = 432 gram
Penggunaan 3 hari = 432 g x 3 = 1296 g
- Lemak Babi 15% = 15 % x 540 g = 81 gram
Penggunaan 3 hari = 81 g x 3 = 243 gram
- Kuning Telur Bebek 5% = 5% x 540 g = 27 gram
Penggunaan 3 hari = 27 g x 3 = 81g

Semua bahan kemudian dicampur sampai merata, di bentuk pelet dan di oven pada suhu 50°C selama 3 hari

Lampiran 12. Tikus Putih (*Ratus Norvegicus*)**Kelompok tikus****Kandang tikus****Pemberian oral****Pengambilan darah**

Lampiran 13. Pembuatan suspensi metformin, fruktosa, fraksi etil asetat dan ekstrak etanol kulit batang juwet.

1. Pembuatan suspensi metformin

- Tiap tablet Metformin mengandung 500 mg Metformin-HCl
- Dosis maksimum untuk manusia dewasa = 500 mg – 3 g
- Konversi dosis manusia (70 kg) ke dosis untuk hewan uji ‘Tikus’ dikali 0,018
- Syarat volume maksimum larutan sediaan uji yang diberikan pada hewan uji tikus (200 g) secara per oral (p.o.) adalah 5,0 ml.
- Dosis metformin untuk tikus (200 g) = (500 mg – 3000 mg) x 0,018 = 9 – 54 mg
- Suspensi metformin dosis 45 mg/kg BB

$$\frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 45 \text{ mg} = 9 \text{ mg}$$
- Volume yang digunakan pada tikus berat 200 g yakni 2 ml
- Pembuatan sediaan uji untuk 100 ml

$$\frac{100 \text{ ml}}{2 \text{ ml}} \times 9 \text{ mg} = 450 \text{ mg}$$
- Ditimbang 450 mg serbuk metformin-HCl dan disuspensikan dengan CMC 1% dalam labu takar 100 ml.
- Jika tikus 300 g maka $\frac{300 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 2 \text{ ml} = 3 \text{ ml}$

2. Pembuatan larutan fruktosa

- Dosis yang digunakan adalah 1,8 g/kg BB
- Jika berat badan tikus 200 g

$$\frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 1,8 \text{ g} = 0,36 \text{ g}$$

- Volume yang digunakan pada tikus berat 200 g yakni 2 ml
- Pembuatan sediaan uji untuk 100 ml

$$\frac{100 \text{ ml}}{2 \text{ ml}} \times 0,36 \text{ g} = 18 \text{ g}$$

- Ditimbang 18 g serbuk fruktosa dan disuspensikan dengan CMC 1% dalam labu takar 100 ml.
- Jika tikus 300 g maka $\frac{300 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 2 \text{ ml} = 3 \text{ ml}$

3. Pembuatan fraksi etil asetat ekstrak etanol kulit batang juwet

- Konversi dosis manusia (70 kg) ke dosis untuk hewan uji 'Tikus' dikali 0,018
- Syarat volume maksimum larutan sediaan uji yang diberikan pada hewan uji tikus (200 g) secara per oral (p.o.) adalah 5,0 ml.
- Dosis suspensi fraksi etil asetat ekstrak etanol kulit batang juwet yang akan dibuat adalah 25 mg/kgBB, 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB
- Pembuatan suspensi fraksi etil asetat ekstrak etanol kulit batang juwet yang akan dibuat adalah 25 mg/kgBB

$$\frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 25 \text{ mg} = 5 \text{ mg}$$

Volume yang digunakan pada tikus berat 200 g yakni 2 ml

Pembuatan sediaan uji untuk 100 ml

$$\frac{100 \text{ ml}}{2 \text{ ml}} \times 5 \text{ mg} = 250 \text{ mg}$$

Ditimbang 250 mg fraksi etil asetat ekstrak etanol kulit batang juwet dan disuspensikan dengan CMC 1% dalam labu takar 100 ml.

Jika tikus 300 g maka $\frac{300 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 2 \text{ ml} = 3 \text{ ml}$

- Pembuatan suspensi fraksi etil asetat ekstrak etanol kulit batang juwet yang akan dibuat adalah 50 mg/kgBB

$$\frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 50 \text{ mg} = 10 \text{ mg}$$

Volume yang digunakan pada tikus berat 200 g yakni 2 ml

Pembuatan sediaan uji untuk 100 ml

$$\frac{100 \text{ ml}}{2 \text{ ml}} \times 10 \text{ mg} = 500 \text{ mg}$$

Ditimbang 500 mg fraksi etil asetat ekstrak etanol kulit batang juwet dan disuspensikan dengan CMC 1% dalam labu takar 100 ml.

Jika tikus 300 g maka $\frac{300 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 2 \text{ ml} = 3 \text{ ml}$

- Pembuatan suspensi fraksi etil asetat ekstrak etanol kulit batang juwet yang akan dibuat adalah 100 mg/kgBB

$$\frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 100 \text{ mg} = 20 \text{ mg}$$

Volume yang digunakan pada tikus berat 200 g yakni 2 ml

Pembuatan sediaan uji untuk 100 ml

$$\frac{100 \text{ ml}}{2 \text{ ml}} \times 20 \text{ mg} = 1000 \text{ mg} = 1 \text{ g}$$

Ditimbang 1 g fraksi etil asetat ekstrak etanol kulit batang juwet dan disuspensikan dengan CMC 1% dalam labu takar 100 ml.

Jika tikus 300 g maka $\frac{300 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 2 \text{ ml} = 3 \text{ ml}$

4. Pembuatan ekstrak etanol kulit batang juwet

- Konversi dosis manusia (70 kg) ke dosis untuk hewan uji 'Tikus' dikali 0,018
- Syarat volume maksimum larutan sediaan uji yang diberikan pada hewan uji tikus (200 g) secara per oral (p.o.) adalah 5,0 ml.
- Dosis suspense ekstrak etanol kulit batang juwet yang akan dibuat adalah 150 mg/kgBB
- $\frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 150 \text{ mg} = 30 \text{ mg}$

Volume yang digunakan pada tikus berat 200 g yakni 2 ml

Pembuatan sediaan uji untuk 100 ml

$$\frac{100 \text{ ml}}{2 \text{ ml}} \times 30 \text{ mg} = 1500 \text{ mg} = 1,5 \text{ g}$$

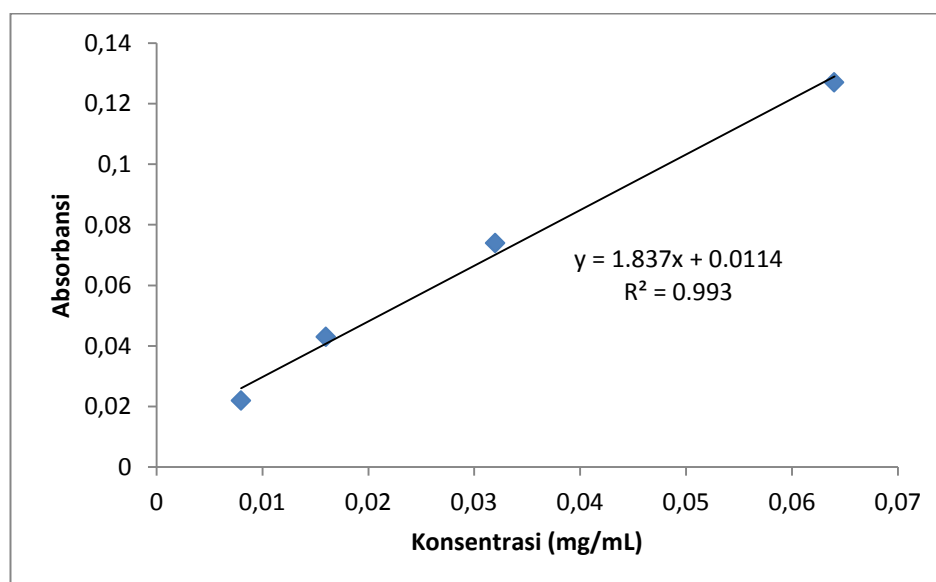
Ditimbang 1500 mg ekstrak etanol kulit batang juwet dan disuspensikan dengan CMC 1% dalam labu takar 100 ml.

Jika tikus 300 g maka $\frac{300 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 2 \text{ ml} = 3 \text{ ml}$

Lampiran 14. Perhitungan kadar Flavonoid total

Standar kuersetin 10 mg/25 ml

Standart	Konsentrasi (mg/ml)	Abs dengan AlCl ₃	Abs tanpa AlCl ₃	Abs Standart
1	0,008	0,080	0,058	0,022
2	0,016	0,119	0,076	0,043
3	0,032	0,168	0,094	0,074
4	0,064	0,241	0,114	0,127



Sampe l	Penimban gan sampel (mg)	Volum e uji (μ l)	Volume aplikasi (μ l)	Faktor pengenc eran	Abs dengan AlCl ₃	Abs tanpa AlCl ₃	Abs sampel	Kadar terukur (mg)	kadar (%)	Rata- rata
1	20,10	4000	100	40	0,128	0,032	0,096	0,461	9,16	
2	20,12	4000	100	40	0,132	0,036	0,096	0,461	9,16	9,19
3	20,18	4000	100	40	0,139	0,042	0,097	0,466	9,24	

Lampiran 15. Data hasil pengukuran berat badan tikus dari hari ke-0, 8, 15, 22, 29, 36, 43 dan 50 dan prosentase berat badan tikus

No. tikus	Kelompok perlakuan	Berat badan (gram) Hari ke-										Prosentase kenaikan berat badan
		0	8	15	22	29	36	43	50	57	64	
1	Kelompok I (Normal)	197	199	207	213	220	226	232	240	249	257	21.83
2		187	192	196	201	208	214	222	228	239	248	21.93
3		200	206	211	215	221	229	236	243	251	260	21.50
4		210	214	218	222	229	236	243	251	260	268	19.52
5		196	199	205	211	219	224	232	241	250	256	22.96
Rata-rata		198	202	207.4	212.4	219.4	225.8	233	240.6	249.8	257.8	21.55
SD		8.28	8.34	8.08	7.60	7.50	8.01	7.62	8.26	7.46	6.46	1.12
1	Kelompok II (Kontrol Negatif)	263	275	285	295	305	319	328	340	354	365	29.28
2		208	220	231	240	251	264	275	285	299	311	37.02
3		183	193	206	216	226	239	250	260	275	287	42.08
4		252	264	275	284	297	306	319	329	342	354	30.56
5		204	213	226	236	245	259	271	280	296	307	37.25
Rata-rata		222	233	244.6	254.2	264.8	277.4	288.6	298.8	313.2	324.8	35.24
SD		33.99	34.98	33.83	33.71	34.43	33.69	33.40	34.13	33.36	33.18	5.28
1	Kelompok III (Kontrol Positif)	238	249	261	271	281	292	305	315	322	331	32.35
2		204	214	227	238	249	260	271	281	289	296	37.75
3		238	250	260	270	281	292	304	315	323	330	32.35
4		207	218	230	240	250	261	272	284	290	300	37.20
5		201	210	224	235	246	258	266	276	285	303	37.31
Rata-rata		217.6	228.2	240.4	250.8	261.4	272.6	283.6	294.2	301.8	312	35.39
SD		18.74	19.65	18.47	18.07	17.95	17.74	19.22	19.20	18.99	17.07	2.78
1	Kelompok IV (Fraksi etil asetat 25 mg/kgBB)	193	204	217	230	241	253	265	277	284	291	43.52
2		197	210	220	234	246	258	270	281	289	298	42.64
3		202	215	225	239	251	261	273	286	291	300	41.58
4		201	213	225	237	250	264	271	285	292	301	41.79
5		217	229	241	254	266	277	290	301	307	314	38.71
Rata-rata		202	214.2	225.6	238.8	250.8	262.6	273.8	286	292.6	300.8	41.65
SD		9.11	9.26	9.26	9.15	9.36	9.02	9.52	9.11	8.62	8.35	1.81
1	Kelompok	217	230	240	252	264	278	290	301	307	316	38.71

2	k V(Fraksi etil asetat 50 mg/kgBB)	196	208	221	231	243	255	268	280	286	295	42.86
3		219	231	244	254	268	280	291	303	311	320	38.36
4		183	196	207	219	230	242	256	267	275	282	45.90
5		228	240	251	263	275	289	301	312	320	327	36.84
Rata-rata		208.6	221	232.6	243.8	256	268.8	281.2	292.6	299.8	308	40.53
SD		18.50	18.28	18.12	18.16	18.80	19.54	18.54	18.50	18.65	18.80	3.74
1	Kelompo k VI (Fraksi etil asetat 100 mg/kgBB)	194	206	219	230	241	253	267	278	284	292	43.30
2		185	198	210	222	234	245	257	269	275	284	45.41
3		234	247	258	271	280	295	306	318	323	330	35.90
4		229	240	254	266	276	290	301	313	321	328	36.68
5		227	240	250	264	274	287	300	311	319	326	37.00
Rata-rata		213.8	226.2	238.2	250.6	261	274	286.2	297.8	304.4	312	39.66
SD		22.55	22.45	22.05	22.78	21.70	23.17	22.49	22.55	23.00	22.14	4.37
1	Kelompo k VII (Ekstrak etanol 150 mg/kgBB)	175	187	199	212	222	235	247	259	267	274	48.00
2		188	200	211	224	236	249	259	272	280	289	53.72
3		213	224	237	250	260	272	286	297	302	311	46.01
4		198	211	223	235	245	258	269	282	288	295	48.99
5		217	230	240	252	266	278	288	301	307	314	44.70
Rata-rata		198.2	210.4	222	234.6	245.8	258.4	269.8	282.2	288.8	296.6	48.28
SD		17.43	17.50	17.32	17.05	17.84	17.36	17.54	17.43	16.27	16.44	3.47

Lampiran 16. Hasil Pengukuran Kadar Glukosa Darah Tikus Hari ke-0, 30, 50 dan Penurunan Kadar Glukosa Darah Tikus

No. Tikus	Kelompok perlakuan	Kadar glukosa darah (mg/dL)							Persentase penurunan glukosa darah (T2)	Persentase penurunan glukosa darah (T3)
		Hari ke 0	Hari ke 30		Hari ke 50		T2	T3		
			Pre	Post	Pre	Post				
1	Kelompok I (Normal)	80.54	80.37	117.35	81.33	118,55	81.31	81.20	2.53	16.46
2		75.57	75.80	113.24	83.00	115.89	82.95	82.01	0.67	13.32
3		73.30	74.43	109.59	79.58	111.37	79.34	79.56	3.82	0.32
4		78.28	78.58	115.07	80.89	114.22	80.85	80.88	1.53	0.38
5		79.05	79.20	116.24	80.30	113.02	80.16	80.20	11.20	8.00
Rata-rata		77.35	77.68	114.30	81.02	114.61	80.92	80.77	3.95	7.70
SD		2.89	2.47	3.04	1.29	2.75	1.36	0.94	4.22	7.36
1	Kelompok II (Kontrol Negatif)	75.11	146.58	183.11	156.89	188.89	156.83	156.44	0.07	0.55
2		76.02	150.23	189.50	159.56	191.11	159.47	156.00	0.11	4.26
3		77.38	131.05	168.95	161.78	177.33	161.41	158.89	0.44	3.42
4		77.43	150.68	187.21	160.89	191.11	160.76	160.66	0.16	0.28
5		76.30	132.44	170.24	142.12	173.98	142.10	142.02	0.03	0.15
Rata-rata		76.45	142.20	179.80	156.25	184.48	156.11	154.80	0.17	1.81
SD		0.98	9.68	9.61	8.11	8.20	8.03	7.39	0.16	1.95
1	Kelompok III (Kontrol Positif)	81.00	142.34	178.78	152.23	186.44	129.78	116.00	31.52	50.86
2		82.35	137.90	176.71	151.11	182.67	127.44	104.89	34.42	67.22
3		83.26	142.01	180.37	152.00	185.33	130.09	105.78	31.87	67.24
4		79.90	137.40	170.93	145.78	181.11	127.08	106.60	28.38	59.47
5		78.28	129.08	168.30	140.79	173.98	127.76	105.98	20.84	55.69
Rata-rata		80.96	137.75	175.02	148.38	181.91	128.43	107.85	29.41	60.10
SD		1.97	5.35	5.18	4.99	4.91	1.40	4.60	5.25	7.19
1	Kelompok IV (Fraksi etil asetat 25 mg/kgBB)	75.11	150.68	186.76	157.78	192.44	148.90	142.22	10.74	18.82
2		70.59	144.75	182.19	152.00	186.22	144.93	137.33	8.68	18.02
3		73.30	131.51	169.86	142.67	177.33	137.89	132.44	6.89	14.75
4		76.47	132.42	168.49	141.78	175.56	136.56	131.11	7.99	16.34
5		78.28	129.68	169.41	139.56	174.22	135.68	128.89	6.33	17.41
Rata-rata		74.75	137.81	175.34	146.76	181.15	140.79	134.40	8.13	17.07
SD		2.96	9.34	8.51	7.78	7.86	5.82	5.36	1.73	1.58
1	Kelompok V (Fraksi etil asetat 50 mg/kgBB)	78.28	134.25	170.32	143.56	178.67	130.40	119.11	20.16	37.45
2		82.35	153.42	187.21	150.00	195.11	135.37	122.67	21.63	40.40
3		79.64	129.68	168.04	140.44	175.56	127.75	117.78	20.87	37.27
4		75.11	133.79	171.23	141.33	176.44	129.07	117.33	18.51	36.24
5		78.28	131.96	167.12	140.89	177.33	128.63	116.44	19.58	39.05

	Rata-rata	78.73	136.62	172.78	143.24	180.62	130.24	118.67	20.15	38.08
	SD	2.62	9.56	8.23	3.96	8.18	3.02	2.44	1.19	1.64
1	Kelompok VI (Fraksi etil asetat 100 mg/kgBB)	75.95	126.48	162.10	148.22	168.89	124.74	102.44	32.49	63.35
2		78.30	131.05	174.49	150.20	175.56	130.91	104.11	26.83	64.10
3		76.47	132.88	169.41	148.78	177.33	124.67	106.67	33.34	58.24
4		78.85	137.90	173.52	149.33	180.00	129.96	107.11	27.48	59.90
5		76.49	132.01	168.50	148.44	182.67	129.66	109.45	26.10	54.19
	Rata-rata	77.21	132.06	169.60	148.99	176.89	127.99	105.96	29.25	59.96
	SD	1.28	4.09	4.92	0.79	5.22	3.03	2.73	3.40	4.03
1	Kelompok VII (Ekstrak etanol 150 mg/kgBB)	79.19	148.40	184.93	150.56	190.67	137.89	121.33	17.75	40.96
2		71.95	144.75	184.47	149.56	186.67	136.12	120.00	17.32	38.09
3		82.81	150.68	183.56	153.56	190.22	137.00	120.89	23.41	46.18
4		78.73	151.14	187.21	150.22	192.00	135.97	126.22	19.93	33.57
5		77.83	141.96	178.49	149.11	182.89	132.16	121.44	23.78	38.82
	Rata-rata	78.10	147.39	183.73	150.60	188.49	135.83	121.98	20.44	39.52
	SD	3.93	3.95	3.22	1.75	3.70	2.19	2.44	3.05	4.59

Lampiran 17. Gambar prosedur dan pewarnaan jaringan otot paha (*Soleus muscle*) tikus



1



2



3



4



5



6



7



8



9

Keterangan :

1. Anestesi tikus dengan etil
2. Pembedahan dan pengambilam soleus muscle
3. Pengawetan dengan larutan Bouins
4. Dehidrasi dalam alcohol 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, absolute I, absolute II, absolute III
5. Proses clearing (dealcoholisasi) dengan xylene I, xylene II, Xylene III
6. *Embedding/paraffin blocking* pada jaringan
7. Hasil *Embedding/paraffin blocking* pada jaringan
8. Mikrotom rotary
9. Hasil pemotongan dengan mikrotom yang diletakkan pada objek glass

Lampiran 18. Prosedur preparasi dan pewarnaan jaringan otot paha (*soleus muscle*) tikus

1. Preparasi *slide* sampel jaringan otot paha dan adiposa

Preparasi *slide* sampel jaringan otot paha dan adiposa merupakan tahap awal yang dilakukan agar *slide* sampel dapat digunakan dalam proses *Immunohistochemistry* (IHC). Beberapa tahapan yang dilakukan dalam proses ini adalah sebagai berikut:

- a) Tikus sebanyak 21 ekor ditimbang satu persatu, dicatat kondisi umumnya.
- b) Dianestesi dengan eter, dilanjutkan dengan kloral hidrat 3,5%, 1 ml/ 100 gram BB.
- c) Dibuka abdomen dan thorax.
- d) Diambil *soleus muscle* pada otot paha tikus dan jaringan adiposa, kemudian beri label.
- e) Jaringan difiksasi dalam larutan Bouins selama 24 jam.
- f) Dilakukan dehidrasi dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, 100% dan alkohol absolut I, II, III secara bertahap masing-masing selama 15 menit.
- g) Dilakukan proses *clearing* (*dealcoholisasi*) menggunakan larutan xylene I, II, III
- h) Dilakukan proses infiltrasi paraffin I, II, III selama 10 menit

- i) Dilakukan *embedding/paraffin blocking* pada jaringan otot dan adiposa (*tissue paraffin-embedded preparation*).
- j) Dilakukan *tissue section* (pemotongan jaringan) menggunakan mikrotom putar Leica dengan ketebalan 4-5 μm .
- k) Dilakukan pembuatan *slide* sampel (setelah pemotongan jaringan, dilakukan pengapungan di dalam *waterbath*, penempelan jaringan pada *slide*, dan pengeringan *slide*).

2. Pengamatan struktur anatomi sel yang akan diamati

Pengamatan struktur anatomi sel bertujuan untuk mengetahui bentuk anatomi sel yang akan diamati sehingga setelah dilakukan pewarnaan, struktur sel dan protein dapat dengan mudah dibedakan. Adapun proses yang dilakukan adalah sebagai berikut:

- a) Setelah dilakukan pembuatan *slide* sampel, kemudian dilakukan proses deparafinisasi (berturut-turut direndam dengan xylene I, II, III, etanol absolut I, II, III, etanol 100%, etanol 95%, etanol 90%, etanol 80%, dan etanol 70%).
- b) Dilakukan pewarnaan dengan menggunakan Hematoksilin dan Eosin sebanyak dua *slide*, satu *slide* untuk potongan membujur dan satu slide lagi untuk potongan melintang.
- c) Hasil diamati di bawah mikroskop.

3. Optimasi pengenceran/*dilution* dan *operating time* antibody antiGLUT-4

Optimasi pengenceran/ *dilution* dan *operating time* bertujuan untuk memperoleh perbandingan pengenceran antibodi primer antiGLUT-4 dalam PBS yang memberikan reaksi kimia antibodi-jaringan paling baik, yaitu dengan hasil pewarnaan optimum dari seri perbandingan pengenceran 1:50 (antibodi:PBS).

4. *Immunohistochemistry* (IHC) terhadap sampel

Sampel *soleus muscle* tikus perlakuan dikelompokkan menjadi 7 kelompok yang terdiri dari Kontrol normal, Kontrol positif (Metformin 9 mg/kg BB tikus), Kontrol negatif (larutan CMC-Na 0,5%), Fraksi etil asetat kulit batang juwet 25 mg/kgBB tikus, Fraksi etil asetat kulit batang juwet 50 mg/kgBB tikus, Fraksi etil asetat kulit batang juwet 100 mg/kgBB tikus, Ekstrak etanol kulit batang juwet 150 mg/kgBB tikus. Masing-masing sampel dilakukan *Immunohistochemistry* dengan tahapan sebagai berikut:

- a) Setelah dilakukan pembuatan *slide* sampel, dilakukan proses deparafinisasi dengan Xylol I,II,III,
- b) Rehidrasi dengan (Alkohol absolute I, II, III, 100%, 90%, 80%, 70%)
- c) Dicuci air mengalir selama 10 menit
- d) Retrieval antigen dengan pemanasan microwave 10 menit
- e) Dicuci air mengalir selama 10 menit
- f) Inkubasi dengan campuran methanol 100ml dan H₂O₂ 1 ml selama 30 menit
- g) Dicuci air mengalir selama 10 menit

- h) Inkubasi dengan Normal serum (Normal Goat Serum) pengenceran 50x selama 30 menit
- i) Dipindahkan ke PBS (3x5 menit).
- j) Antibodi primer, yaitu antiGLUT-4 perbandingan 1:50 (antibodi:PBS), selama 24 jam pada 4°C.
- k) Dicuci 3x5 menit dengan PBS pH 7,4.
- l) Inkubasi dalam Antibodi primer (AntiGLUT-4) dengan pengenceran 1:50 selama 24 jam suhu 4°C
- m) Cuci PBS (3x 5 menit)
- n) Antibodi sekunder (*Biotinylated Anti Rabbit Ig G Raised In Goat*), pengenceran 1:200 selama 30 menit.
- o) Dicuci 3x5 menit dengan PBS pH 7,4.
- p) *ABC kid (Avidin Biotin Peroxidase Complex)*, diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit suhu ruang.
- q) Dicuci 3x5 menit dengan PBS pH 7,4.
- r) *Diamino Benzidin (DAB)*, diinkubasi pada suhu kamar selama 25 menit.
Suhu ruang
- s) Dicuci dengan aquadest.
- t) *Counterstain Hary's Hematoxilin* selama 5 menit
- u) Dicuci dengan air mengalir selama 30 detik.
- v) Dilakukan dehidrasi selama 15 menit (berturut-turut menggunakan etanol etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol absolute I, II, III dan larutan xylol I, II, III).

w) Hasil pewarnaan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100 dan 400 kali dari berbagai sudut pandang

5. Fotomikroskopi

Total sampel adalah sebanyak 21 sampel, yaitu 7 kelompok perlakuan masing-masing 3 ekor tikus yang diambil jaringan otot dan jaringan adiposa.

6. Kuantifikasi translokasi protein GLUT-4

Masing-masing foto dilakukan kuantifikasi dengan menggunakan parameter luas dan intensitas translokasi protein GLUT-4. Kuantifikasi dibantu program komputer *adobe photoshop CS3* dan *macbiophotonics image J* sampai diperoleh hasil luas dan intensitas translokasi protein GLUT-4. Adapun kuantifikasi translokasi protein GLUT-4 menggunakan program *macbiophotonics image J* dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- a) Dilakukan pengambilan gambar dengan perbesaran 40 kali dimensi 1024 x 768, simpan.
- b) Buka program *adobe photoshop CS3*.
- c) Buka *file*, klik *open*, dicari *file* gambar yang telah disimpan, klik *open*.
- d) Dilakukan *editing* gambar untuk memperjelas pemisahan warna antara protein GLUT-4 dan *background*.
- e) Klik *image, adjustments, hue/saturation*, geser *saturation* ke kanan sampai nilai +60, klik ok.

- f) Klik *image, adjustments, colour balance*, geser *yellow-blue* ke arah *yellow* (kiri) sampai nilai -100, klik ok. Gambar telah selesai diedit.
- g) Klik *file, save as*, beri nama *file*, diubah format gambar menjadi JPEG, klik *save*.
- h) Buka program *macbiophotonics image J*.
- i) Klik *analyze, set measurements*, klik *area*, klik *standard deviation*, klik *min & max gray value*, dan klik *mean gray value*.
- j) Klik *file, open*, cari gambar yang telah diedit dengan *adobe photoshop CS3*, klik *open*.
- k) Setelah gambar terbuka, klik *analyze, tools*, klik *ROI manager*.
- l) Setelah tampil *ROI manager*, dilakukan *check list show all* dan *edit mode* pada bagian bawah tampilan.
- m) Dilakukan *selections* terhadap *area GLUT-4* menggunakan *polygon selections*, klik *polygon selections* pada tampilan *image J*.
- n) Hindari *selections* pada nukleus sel otot yang terletak pada membran yang berwarna biru. Nukleus yang berwarna biru dapat memberikan intensitas yang tinggi, sehingga mempengaruhi objektivitas pengukuran.
- o) Setelah dilakukan *selections*, klik *add* pada tampilan *ROI manager*.

- p) Dilakukan *selections-selections* berikutnya, klik *add* pada tampilan ROI *manager*
- q) Apabila seluruh *selections* telah dilakukan, klik *measure*, untuk melihat hasil luas (*area*) dan intensitas (*mean*). Data hasil dapat disimpan dan dapat disalin ke program *Microsoft office excel* untuk diolah datanya secara statistik.

Lampiran 19. Analisa statistik nilai peningkatan berat badan tikus normal dengan perlakuan HFD

Uji Normalitas

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		Peningkatan berat badan
N		10
Normal Parameters ^a	Mean	28.3930
	Std. Deviation	8.07116
Most Extreme Differences	Absolute	.250
	Positive	.250
	Negative	-.157
Kolmogorov-Smirnov Z		.789
Asymp. Sig. (2-tailed)		.562

a. Test distribution is Normal.

Uji Normalitas

Sig. > 0,05 = data terdistribusi normal

Sig. < 0,05 = data tidak terdistribusi dengan normal

Hasil analisa distribusi data menunjukkan bahwa Sig. > 0,05 sehingga data terdistribusi normal.

T-Test Independent

Group Statistics

	Kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Peningkatan berat badan	Normal	5	21.5480	1.25840	.56277
	HFD	5	35.2380	5.27774	2.36028

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Peningkatan berat badan	Equal variances assumed	9.850	.014	5.642	8	.000	-13.69000	2.42644	-19.28538	-8.09462
	Equal variances not assumed			5.642	4.453	.004	-13.69000	2.42644	-20.16484	-7.21516

Hasil uji Levene test

Sig. > 0,05 menunjukkan bahwa varian diasumsi sama

Sig. < 0,05 menunjukkan bahwa varian diasumsi tidak sama

Hasil uji Levene Test menunjukkan bahwa varian diasumsikan berbeda.

Berdasarkan hasil uji t-test menunjukkan bahwa nilai Sig. 0,004 (<0,05), dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan antara berat badan tikus normal dan tikus yang telah diberi HFD (kontrol negatif).

Lampiran 20. Analisa statistik nilai peningkatan kadar glukosa tikus normal dengan perlakuan HFD

Uji Normalitas

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Perlakuan
N		10
Normal Parameters ^a	Mean	120.0760
	Std. Deviation	43.04520
Most Extreme Differences	Absolute	.218
	Positive	.218
	Negative	-.155
Kolmogorov-Smirnov Z		.689
Asymp. Sig. (2-tailed)		.729

a. Test distribution is Normal.

Uji Normalitas

Sig. > 0,05 = data terdistribusi normal

Sig. < 0,05 = data tidak terdistribusi dengan normal

Hasil analisa distribusi data menunjukkan bahwa Sig. > 0,05 sehingga data terdistribusi normal.

T-Test Independent

Group Statistics

Kelompok		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Perlakuan	Kontrol normal	5	92.3160	18.75386	8.38698
	HFD	5	1.4784E2	43.48276	19.44608

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Perlakuan	Equal variances assumed	1.447	.263	-2.622	8	.031	-55.52000	21.17762	-104.35567	-6.68433
	Equal variances not assumed			-2.622	5.438	.043	-55.52000	21.17762	-108.66511	-2.37489

Hasil uji Levene test

Sig. > 0,05 menunjukkan bahwa varian diasumsi sama

Sig. < 0,05 menunjukkan bahwa varian diasumsi tidak sama

Hasil uji Levene Test menunjukkan bahwa varian diasumsikan berbeda.

Berdasarkan hasil uji t-test menunjukkan bahwa nilai Sig. 0,031 (<0,05), dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan antara peningkatan kadar glukosa darah tikus normal dan tikus yang telah diberi HFD (kontrol negatif).

Lampiran 21. Analisa nilai statistik efek hipoglikemik tikus HFD pada waktu 8 hari setelah pemberian larutan uji dengan metode ANOVA satu arah

Uji Normalitas

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		penurunan kadar gula darah
N		30
Normal Parameters ^a	Mean	17.9217
	Std. Deviation	11.18090
Most Extreme Differences	Absolute	.145
	Positive	.108
	Negative	-.145
Kolmogorov-Smirnov Z		.795
Asymp. Sig. (2-tailed)		.552

a. Test distribution is Normal.

Uji Normalitas

Sig. > 0,05 = data terdistribusi normal

Sig. < 0,05 = data tidak terdistribusi dengan normal

Hasil analisa distribusi data menunjukkan bahwa Sig. > 0,05 sehingga data terdistribusi normal

Uji homogenitas varian

Test of Homogeneity of Variances

penurunan kadar gula darah

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.661	5	24	.004

Sig. >0.05 menunjukkan varian data homogen

Sig.<0,05 menunjukkan varian data tidak homogen

Hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa Sig.<0,05 (0,004) sehingga varian data tidak homogen

Uji Anova

ANOVA

penurunan kadar gula darah

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3414.170	5	682.834	77.597	.000
Within Groups	211.195	24	8.800		
Total	3625.365	29			

Sig.<0.05 menunjukkan perlakuan memberikan perbedaan signifikan terhadap efek hipoglikemik pada hari ke-8 (T_2).

Berdasarkan data diperoleh hasil Sig.<0,05 (0,000) sehingga perlakuan memberikan perbedaan signifikan terhadap efek hipoglikemik pada hari ke-8 (T_2).

Uji post hoc

Multiple Comparisons

penurunan kadar gula darah

Games-Howell

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kelompok negatif	kelompok positif	-29.24400*	2.34750	.001	-40.3648	-18.1232
	fraksi etil asetat 25 mg/kg BB	-7.96400*	.77516	.003	-11.6058	-4.3222
	fraksi etil asetat 50 mg/kg BB	-19.98800*	.53987	.000	-22.4999	-17.4761
	fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	-29.08600*	1.52058	.000	-36.2793	-21.8927
	ekstrak etanol 150 mg/kg BB	-20.27600*	1.36589	.001	-26.7337	-13.8183
kelompok positif	kelompok negatif	29.24400*	2.34750	.001	18.1232	40.3648
	fraksi etil asetat 25 mg/kg BB	21.28000*	2.47003	.003	10.6106	31.9494
	fraksi etil asetat 50 mg/kg BB	9.25600	2.40658	.086	-1.6002	20.1122
	fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	.15800	2.79506	1.000	-10.5012	10.8172
	ekstrak etanol 150 mg/kg BB	8.96800	2.71401	.098	-1.5896	19.5256
fraksi etil asetat 25 mg/kg BB	kelompok negatif	7.96400*	.77516	.003	4.3222	11.6058
	kelompok positif	-21.28000*	2.47003	.003	-31.9494	-10.6106
	fraksi etil asetat 50 mg/kg BB	-12.02400*	.93902	.000	-15.5644	-8.4836
	fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	-21.12200*	1.70366	.000	-27.9274	-14.3166
	ekstrak etanol 150 mg/kg BB	-12.31200*	1.56714	.001	-18.4403	-6.1837

fraksi etil asetat kelompok negatif 50 mg/kg BB	19.98800*	.53987	.000	17.4761	22.4999
kelompok positif	-9.25600	2.40658	.086	-20.1122	1.6002
fraksi etil asetat 25 mg/kg BB	12.02400*	.93902	.000	8.4836	15.5644
fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	-9.09800*	1.61029	.016	-15.9805	-2.2155
ekstrak etanol 150 mg/kg BB	-.28800	1.46510	1.000	-6.4371	5.8611
fraksi etil asetat kelompok negatif 100 mg/kg BB	29.08600*	1.52058	.000	21.8927	36.2793
kelompok positif	-.15800	2.79506	1.000	-10.8172	10.5012
fraksi etil asetat 25 mg/kg BB	21.12200*	1.70366	.000	14.3166	27.9274
fraksi etil asetat 50 mg/kg BB	9.09800*	1.61029	.016	2.2155	15.9805
ekstrak etanol 150 mg/kg BB	8.81000*	2.04138	.022	1.3295	16.2905
ekstrak etanol kelompok negatif 150 mg/kg BB	20.27600*	1.36589	.001	13.8183	26.7337
kelompok positif	-8.96800	2.71401	.098	-19.5256	1.5896
fraksi etil asetat 25 mg/kg BB	12.31200*	1.56714	.001	6.1837	18.4403
fraksi etil asetat 50 mg/kg BB	.28800	1.46510	1.000	-5.8611	6.4371
fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	-8.81000*	2.04138	.022	-16.2905	-1.3295

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

Lampiran 22. Analisa nilai statistik efek hipoglikemik tikus HFD pada waktu 15 hari setelah pemberian larutan uji dengan metode ANOVA satu arah

Uji Normalitas

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Penurunan kadar gula darah
N		30
Normal Parameters ^a	Mean	38.8603
	Std. Deviation	22.59837
Most Extreme Differences	Absolute	.226
	Positive	.146
	Negative	-.226
Kolmogorov-Smirnov Z		1.239
Asymp. Sig. (2-tailed)		.093

a. Test distribution is Normal.

Uji Normalitas

Sig. > 0,05 berarti data terdistribusi normal

Sig. < 0,05 berarti data tidak terdistribusi dengan normal

Hasil analisa distribusi data menunjukkan bahwa Sig. > 0,05 sehingga data terdistribusi normal

Uji homogenitas varian

Test of Homogeneity of Variances

Penurunan kadar gula darah

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.543	5	24	.015

Sig. >0.05 menunjukkan varian data homogen

Sig.<0,05 menunjukkan varian data tidak homogen

Hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa Sig.<0,05 (0.015) sehingga varian data tidak homogen

Uji Anova

ANOVA

Penurunan kadar gula darah

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14446.186	5	2889.237	190.648	.000
Within Groups	363.715	24	15.155		
Total	14809.901	29			

Sig.<0.05 menunjukkan perlakuan memberikan perbedaan signifikan terhadap efek hipoglikemik pada hari ke-15 (T₃).

Berdasarkan data diperoleh hasil Sig.<0,05 (0,000) sehingga perlakuan memberikan perbedaan signifikan terhadap efek hipoglikemik pada hari ke-15 (T₃).

Uji post hoc

Multiple Comparisons

Penurunan kadar gula darah

Games-Howell

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok negatif	Kelompok positif	-58.36400 [*]	3.33275	.000	-73.1309	-43.5971
	Fraksi etil asetat 25 mg/kg BB	-15.33600 [*]	1.12348	.000	-19.4864	-11.1856
	Fraksi etil asetat 50 mg/kg BB	-44.36600 [*]	1.50762	.000	-50.0288	-38.7032
	Fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	-58.22400 [*]	2.00168	.000	-66.2950	-50.1530
	Ekstrak etanol 150 mg/kgBB	-46.48000 [*]	1.60821	.000	-52.6143	-40.3457
Kelompok positif	Kelompok negatif	58.36400 [*]	3.33275	.000	43.5971	73.1309
	Fraksi etil asetat 25 mg/kg BB	43.02800 [*]	3.29312	.001	28.1253	57.9307
	Fraksi etil asetat 50 mg/kg BB	13.99800	3.44316	.057	-.5193	28.5153
	Fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	.14000	3.68635	1.000	-14.3044	14.5844
	Ekstrak etanol 150 mg/kgBB	11.88400	3.48837	.104	-2.5766	26.3446
Fraksi etil asetat 25 mg/kg BB	Kelompok negatif	15.33600 [*]	1.12348	.000	11.1856	19.4864
	Kelompok positif	-43.02800 [*]	3.29312	.001	-57.9307	-28.1253
	Fraksi etil asetat 50 mg/kg BB	-29.03000 [*]	1.41785	.000	-34.5567	-23.5033
	Fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	-42.88800 [*]	1.93497	.000	-51.0082	-34.7678
	Ekstrak etanol 150 mg/kgBB	-31.14400 [*]	1.52437	.000	-37.1972	-25.0908

Fraksi etil asetat 50 mg/kg BB	Kelompok negatif	44.36600*	1.50762	.000	38.7032	50.0288
	Kelompok positif	-13.99800	3.44316	.057	-28.5153	.5193
	Fraksi etil asetat 25 mg/kg BB	29.03000*	1.41785	.000	23.5033	34.5567
	Fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	-13.85800*	2.18055	.003	-22.1002	-5.6158
	Ekstrak etanol 150 mg/kgBB	-2.11400	1.82604	.845	-8.8009	4.5729
Fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	Kelompok negatif	58.22400*	2.00168	.000	50.1530	66.2950
	Kelompok positif	-.14000	3.68635	1.000	-14.5844	14.3044
	Fraksi etil asetat 25 mg/kg BB	42.88800*	1.93497	.000	34.7678	51.0082
	Fraksi etil asetat 50 mg/kg BB	13.85800*	2.18055	.003	5.6158	22.1002
	Ekstrak etanol 150 mg/kgBB	11.74400*	2.25128	.009	3.3521	20.1359
Ekstrak etanol 150 mg/kgBB	Kelompok negatif	46.48000*	1.60821	.000	40.3457	52.6143
	Kelompok positif	-11.88400	3.48837	.104	-26.3446	2.5766
	Fraksi etil asetat 25 mg/kg BB	31.14400*	1.52437	.000	25.0908	37.1972
	Fraksi etil asetat 50 mg/kg BB	2.11400	1.82604	.845	-4.5729	8.8009
	Fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	-11.74400*	2.25128	.009	-20.1359	-3.3521

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

Lampiran 23. Analisa statistik nilai translokasi protein GLUT-4 jaringan otot paha (*soleus muscle*) tikus Fraksi etil asetat dari ekstrak etanol kulit batang juwet dengan menggunakan metode ANOVA satu arah

Uji Normalitas

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		GLUT4
N		21
Normal Parameters ^a	Mean	1.3374E5
	Std. Deviation	4.81626E4
Most Extreme Differences	Absolute	.102
	Positive	.102
	Negative	-.079
Kolmogorov-Smirnov Z		.466
Asymp. Sig. (2-tailed)		.982

a. Test distribution is Normal.

Uji Normalitas

Sig. > 0,05 berarti data terdistribusi normal

Sig. < 0,05 berarti data tidak terdistribusi dengan normal

Hasil analisa distribusi data menunjukkan bahwa Sig. > 0,05 sehingga data terdistribusi normal

Uji homogenitas varian

Test of Homogeneity of Variances

GLUT4

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.565	6	14	.069

Sig. >0.05 menunjukkan varian data homogen

Sig.<0,05 menunjukkan varian data tidak homogen

Hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa Sig.>0,05 (0.069) sehingga varian data homogen

Uji Anova

ANOVA

GLUT4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.296E10	6	7.160E9	29.184	.000
Within Groups	3.435E9	14	2.453E8		
Total	4.639E10	20			

Sig.<0.05 menunjukkan perlakuan memberikan perbedaan signifikan terhadap jumlah Glut-4.

Berdasarkan data diperoleh hasil Sig.<0,05 sehingga perlakuan memberikan perbedaan signifikan terhadap jumlah Glut-4.

Uji post hoc

Multiple Comparisons

GLUT4
Tukey HSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	Negative	1.49331E5 [*]	1.27887E4	.000	105662.3741	192998.7326
	Positif	52936.17447 [*]	1.27887E4	.013	9267.9952	96604.3537
	fraksi etil asetat 25mg/kg BB	1.20330E5 [*]	1.27887E4	.000	76661.6886	163998.0470
	fraksi etil asetat 50 mg/kg BB	94515.56000 [*]	1.27887E4	.000	50847.3808	138183.7392
	fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	57150.71223 [*]	1.27887E4	.007	13482.5330	100818.8915
	ekstrak etanol 150mg/kg BB	73493.49557 [*]	1.27887E4	.001	29825.3163	117161.6748
Negative	Normal	-1.49331E5 [*]	1.27887E4	.000	-1.9300E5	-1.0566E5
	Positif	-9.63944E4 [*]	1.27887E4	.000	-1.4006E5	-52726.1996
	fraksi etil asetat 25mg/kg BB	-29000.68555	1.27887E4	.322	-72668.8648	14667.4937
	fraksi etil asetat 50 mg/kg BB	-5.48150E4 [*]	1.27887E4	.010	-98483.1726	-11146.8141
	fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	-9.21798E4 [*]	1.27887E4	.000	-1.3585E5	-48511.6619
	ekstrak etanol 150mg/kg BB	-7.58371E4 [*]	1.27887E4	.001	-1.1951E5	-32168.8785
Positif	Normal	-5.29362E4 [*]	1.27887E4	.013	-96604.3537	-9267.9952
	Negative	96394.37888 [*]	1.27887E4	.000	52726.1996	140062.5581
	fraksi etil asetat 25mg/kg BB	67393.69332 [*]	1.27887E4	.002	23725.5141	111061.8726
	fraksi etil asetat 50 mg/kg BB	41579.38553	1.27887E4	.067	-2088.7937	85247.5648
	fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	4214.53777	1.27887E4	1.000	-39453.6415	47882.7170
	ekstrak etanol 150mg/kg BB	20557.32110	1.27887E4	.680	-23110.8581	64225.5003
fraksi etil asetat 25 mg/kg BB	Normal	-1.20330E5 [*]	1.27887E4	.000	-1.6400E5	-76661.6886
	Negative	29000.68555	1.27887E4	.322	-14667.4937	72668.8648
	Positif	-6.73937E4 [*]	1.27887E4	.002	-1.1106E5	-23725.5141
	fraksi etil asetat 50 mg/kg BB	-25814.30779	1.27887E4	.445	-69482.4870	17853.8714
	fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	-6.31792E4 [*]	1.27887E4	.003	-1.0685E5	-19510.9763
	ekstrak etanol 150mg/kg BB	-4.68364E4 [*]	1.27887E4	.032	-90504.5515	-3168.1930
fraksi etil asetat 50	Normal	-9.45156E4 [*]	1.27887E4	.000	-1.3818E5	-50847.3808
	Negative	54814.99334 [*]	1.27887E4	.010	11146.8141	98483.1726

mg/kg BB	Positif	-41579.38553	1.27887E4	.067	-85247.5648	2088.7937
	fraksi etil asetat 25mg/kg BB	25814.30779	1.27887E4	.445	-17853.8714	69482.4870
	fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	-37364.84777	1.27887E4	.118	-81033.0270	6303.3315
	ekstrak etanol 150mg/kg BB	-21022.06443	1.27887E4	.659	-64690.2437	22646.1148
fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	Normal	-5.71507E4	1.27887E4	.007	-1.0082E5	-13482.5330
	Negative	92179.84111	1.27887E4	.000	48511.6619	135848.0203
	Positif	-4214.53777	1.27887E4	1.000	-47882.7170	39453.6415
	fraksi etil asetat 25mg/kg BB	63179.15556	1.27887E4	.003	19510.9763	106847.3348
	fraksi etil asetat 50 mg/kg BB	37364.84777	1.27887E4	.118	-6303.3315	81033.0270
	ekstrak etanol 150mg/kg BB	16342.78333	1.27887E4	.851	-27325.3959	60010.9626
ekstrak etanol 150mg/kg BB	Normal	-7.34935E4	1.27887E4	.001	-1.1716E5	-29825.3163
	Negative	75837.05778	1.27887E4	.001	32168.8785	119505.2370
	Positif	-20557.32110	1.27887E4	.680	-64225.5003	23110.8581
	fraksi etil asetat 25mg/kg BB	46836.37222	1.27887E4	.032	3168.1930	90504.5515
	fraksi etil asetat 50 mg/kg BB	21022.06443	1.27887E4	.659	-22646.1148	64690.2437
	fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	-16342.78333	1.27887E4	.851	-60010.9626	27325.3959

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

Lampiran 24. Analisa statistik hubungan antara penurunan kadar glukosa darah dengan nilai GLUT-4

Uji korelasi

Correlations

		Penurunan Kadar Gula Darah (%)	Nilai GLUT-4 (Luas area x Intensitas)
Penurunan Kadar Gula Darah (%)	Pearson Correlation	1	.956 [*]
	Sig. (2-tailed)		.011
	N	5	5
Nilai GLUT-4 (Luas area x Intensitas)	Pearson Correlation	.956 [*]	1
	Sig. (2-tailed)	.011	
	N	5	5

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Hasil signifikansi (0,11) kurang dari 0,05 sehingga ada hubungan antara penurunan kadar glukosa dengan nilai GLUT-4 (luas area x intensitas)

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.956 ^a	.913	.884	5.98476

a. Predictors: (Constant), Nilai GLUT-4 (Luas area x Intensitas)

Nilai R square (R^2) sebesar 0,913 sehingga penurunan kadar glukosa darah 91,3% dipengaruhi oleh nilai GLUT-4(Luas area x intensitas) dan 8,7% dipengaruhi oleh factor lain yang tidak diteliti.

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2.861E9	1	2.861E9	31.484	.011 ^a
	Residual	2.726E8	3	9.087E7		
	Total	3.134E9	4			

a. Predictors: (Constant), Penurunan Kadar Gula Darah (%)

b. Dependent Variable: Nilai GLUT-4 (Luas area x Intensitas)

Nilai signifikansi yang ditunjukkan pada table sebesar $0.011 < 0.05$ berarti hubungan antara jumlah peningkatan protein GLUT-4 dengan persen penurunan kadar glukosa darah adalah linear atau saling mempengaruhi.

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	61856.578	13259.355		4.665	.019
	Penurunan Kadar Gula Darah (%)	1521.957	271.244	.956	5.611	.011


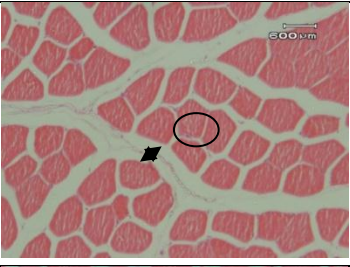
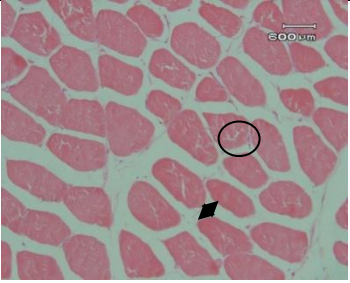


a. Dependent Variable: Nilai GLUT-4 (Luas area x Intensitas)



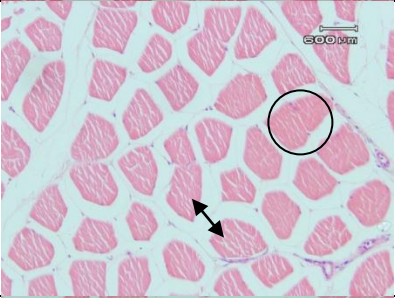


Persamaan regresi linier dapat ditulis


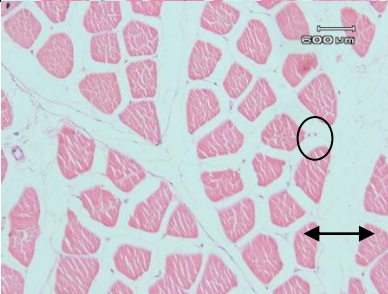
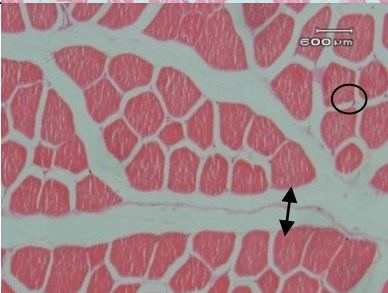


$Y = 1521x + 61856.578$ dengan x merupakan penurunan kadar gula darah dan y merupakan nilai GLUT


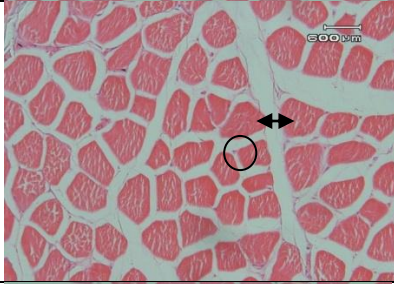



$R = 0.956$

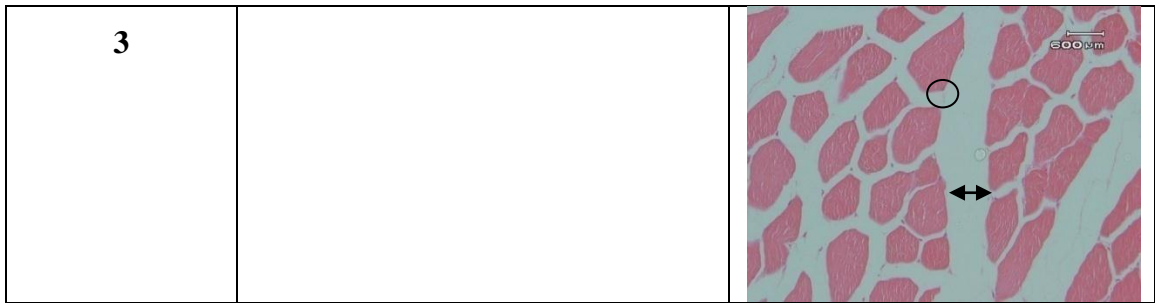
Lampiran 25. Hasil Pewarnaan secara Hematotoksin Eosin setiap perlakuan

Nomor tikus	Perlakuan	Perbesaran 400x
1	Kelompok Normal	
2		
3		
1	Kelompok Negatif	
2		

3		
1	Kelompok Positif	
2		
3		
1		


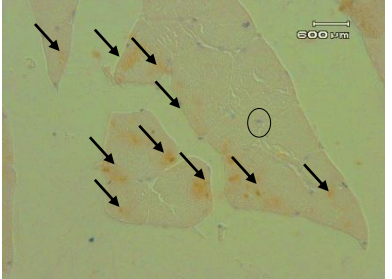

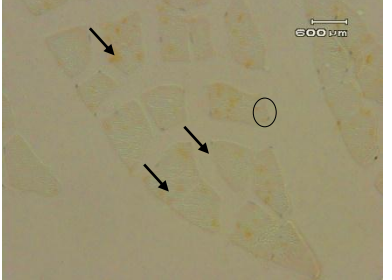

2	Fraksi etil asetat 25 mg/kg BB	
3		
1	Fraksi etil asetat 50 mg/kg BB	
2		
3		


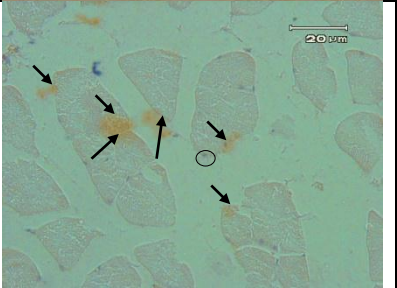



1	Fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	
2		
3		
1	Ekstrak etanol 150 mg/kg BB	
2		



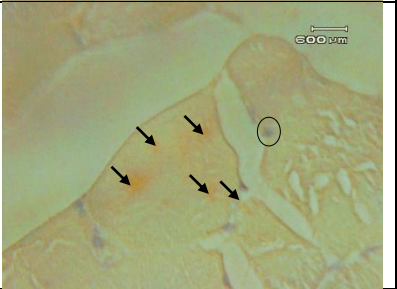
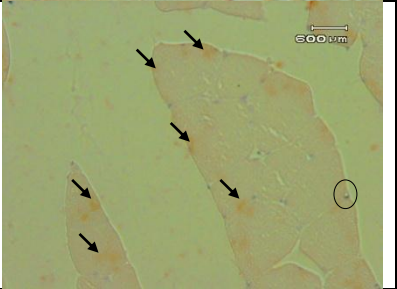



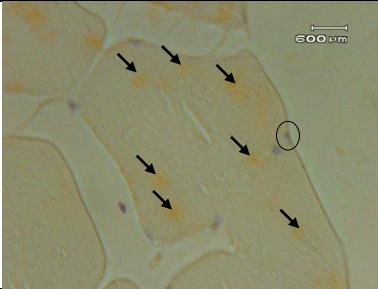

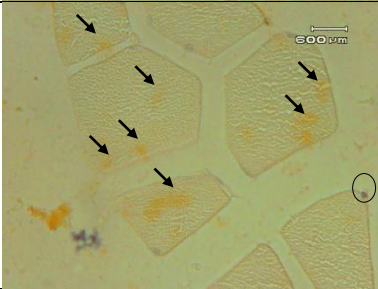
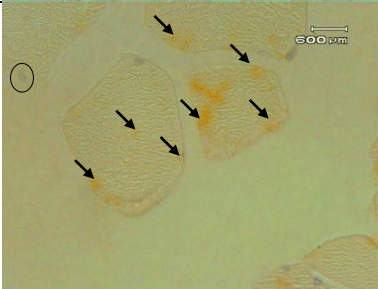
Keterangan. Hasil pewarnaan HE terhadap jaringan otot kelompok tikus normal dan kelompok tikus yang diberi HFD dengan pembesaran 400x (tanda lingkaran menunjukkan adanya inti sel berwarna biru yang dikelilingi oleh sitoplasma yang berwarna merah). Tanda panah menunjukkan diameter lemak yang berwarna putih.

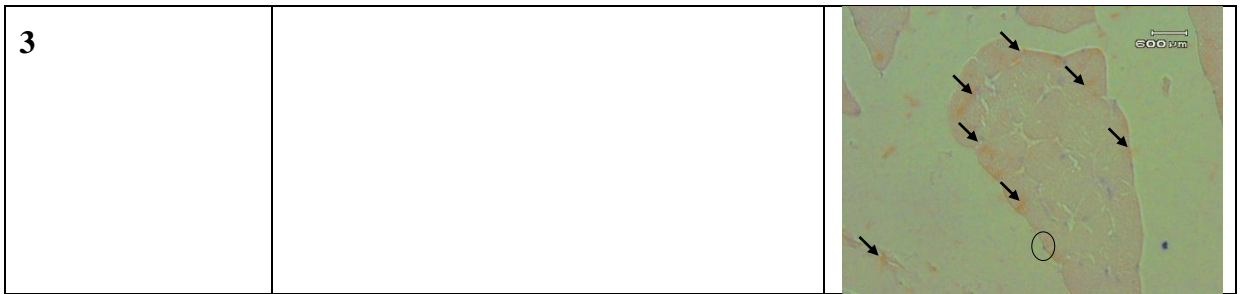
Lampiran 26. Hasil Pewarnaan secara Imunohistokimia setiap perlakuan

No. Tikus	Perlakuan	Perbesaran 400 X
1	Normal	
2		
3		
1	Negatif	
2		

3		
1		
2	Positif	
3		
1	Fraksi etil asetat 25 mg/kg BB	

2		
3		
1		
2	Fraksi etil asetat 50 mg/kg BB	
3		

1		
2	Fraksi etil asetat 100 mg/kg BB	
3		
1		Ekstrak etanol 150 mg/kg BB
2		



Keterangan. Hasil pewarnaan dengan metode imunohistokimia tampak adanya protein GLUT-4 pada jaringan otot dengan pembesaran 400x (tanda lingkaran menunjukkan adanya inti sel berwarna biru dan tanda panah menunjukkan protein GLUT-4 yang berwarna coklat).