

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi tanaman sambung nyawa

Daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour) Merr) yang digunakan sebagai bahan penelitian ini dideterminasi terlebih dahulu dengan tujuan untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan yang digunakan untuk penelitian, mengetahui kebenaran sampel, dan menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain. Determinasi dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta, Jawa Tengah. Hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran 1.

2. Pengambilan sampel dan pengeringan simplisia

Daun sambung nyawa yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Januari 2019. Daun sambung nyawa yang masih segar dan berwarna hijau disortir dan dicuci dengan air mengalir hingga bersih kemudian ditiriskan. Setelah itu daun sambung nyawa dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50⁰C. Pengeringan tanaman ini bertujuan untuk mengurangi kandungan air pada tanaman dan menghentikan reaksi enzimatik yang dapat terjadi pada tanaman, selain itu kadar air yang terlalu tinggi dapat menjadi media yang baik untuk pertumbuhan mikroorganisme yang akan menyebabkan pembusukan pada tanaman.

Daun sambung nyawa sebanyak 15 kg dikeringkan dan didapatkan persentase rendemen bobot kering terhadap bobot basah adalah 9,8%. Dengan pengeringan, kandungan lembab yang terdapat dalam simplisia akan berkurang sampai pada titik tertentu yang menyebabkan enzim-enzim menjadi tidak aktif. Pengeringan juga dapat memudahkan pada tahap selanjutnya, yaitu mudah dikemas dan disimpan. Hasil perhitungan bobot kering terhadap bobot basah daun sambung nyawa dapat dilihat pada Lampiran 2.

Tabel 1. Hasil persentase bobot kering terhadap bobot basah daun sambung nyawa

Bobot basah (kg)	Bobot kering (kg)	Rendemen (%)
15	1,47	9,8

3. Pembuatan serbuk daun sambung nyawa

Daun sambung nyawa yang telah kering selanjutnya diserbuk menggunakan blender untuk memperluas permukaan partikel yang kontak dengan pelarut saat penyarian. Serbuk daun sambung nyawa kemudian diayak dengan pengayak nomor 40, tujuan untuk memperkecil ukuran partikel sehingga didapatkan luas permukaan yang besar, mendapatkan hasil serbuk yang seragam ukurannya, dan diharapkan proses penyarian akan bertambah baik. Hasil perhitungan bobot serbuk terhadap bobot kering daun sambung nyawa dapat dilihat pada Lampiran 10.

Tabel 2. Rendemen berat serbuk terhadap berat daun kering

Bobot kering (kg)	Bobot serbuk (kg)	Rendemen (%)
1,47	1,41	95,91

Pada perbandingan berat serbuk terhadap berat daun kering didapatkan rendemen sebesar 95,91%. Semakin tinggi nilai rendemen maka semakin banyak zat aktif yang didapatkan dari proses ekstraksi. Semakin tinggi nilai rendemen maka semakin bagus.

4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun sambung nyawa

Penetapan susut pengeringan serbuk daun sambung nyawa dilakukan dengan alat *moisture balance* yang bertujuan untuk memberikan batasan maksimal besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Hasil penetapan kadar susut pengeringan serbuk daun sambung nyawa dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun sambung nyawa

No	Bobot awal (gram)	Susut pengeringan (%)
1	2,00	6,8
2	2,00	6,3
3	2,00	7,3
Rata-rata ± SD		6,8 ± 0,5

Penetapan susut pengeringan berhubungan dengan senyawa volatil dan air yang hilang. Penetapan susut pengeringan menggunakan alat *moisture balance* dengan suhu 105⁰C, ditunggu sampai alat berbunyi yang berarti bobot serbuk sudah konstan. Hasil rata-rata penetapan susut pengeringan yang didapat yaitu 6,8 %. Hasil susut pengeringan yang baik yaitu tidak lebih dari 10% (Kemenkes RI 2010). Hasil susut pengeringan yang didapat tidak lebih dari 10%, maka serbuk daun sambung nyawa yang digunakan memenuhi persyaratan.

5. Pembuatan ekstrak etanol daun sambung nyawa

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu dengan maserasi. Metode ini bertujuan untuk penyarian yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam larutan penyari, menghindari kerusakan zat aktif akibat pemanasan dan paling sederhana serta cepat dilakukan. Etanol 96% digunakan sebagai cairan penyari karena sifat etanol yang tidak beracun dan mudah menarik keluar senyawa aktif dari dalam sel dan dapat bercampur dengan air sebagai perbandingan, disamping itu etanol memiliki titik didih rendah sehingga mudah dan cepat diuapkan (DepKes 1986).

Serbuk daun sambung nyawa sebanyak 700 gram dimasukkan dalam botol maserasi ditambah 5250 ml etanol 96%. Maserasi dilakukan selama 5 hari dengan sesekali penggojokan berulang-ulang. Penggojokan dilakukan untuk meratakan konsentrasi larutan di luar serbuk sehingga dengan penggojokan tersebut tetap terjaga adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam maupun di luar sel. Setelah 5 hari, maserat disaring dengan menggunakan kain flannel kemudian disaring dengan kertas saring. Ampas kemudian dimaserasi lagi dengan cara yang sama menggunakan etanol 96% sebanyak 1750 ml dan dibiarkan selama 2 hari sambil sesekali diaduk. Kemudian pelarut yang ada pada filtrat diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental.

Tabel 4. Persentase berat ekstrak terhadap berat serbuk kering

Berat serbuk kering (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
700	72,80	10,39

Dari 700 gram serbuk diperoleh berat ekstrak 72,80 gram dan rendemen sebesar 10,39%. Rendemen ekstrak kental daun sambung nyawa tidak kurang dari 7,2% (Kemenkes 2010), maka rendemen yang diperoleh sebesar 10,39% pada penelitian ini memenuhi persyaratan. Hasil perhitungan rendemen ekstrak daun sambung nyawa dapat dilihat pada Lampiran 10.

6. Identifikasi ekstrak daun sambung nyawa secara organoleptis

Identifikasi secara organoleptis dilakukan berdasarkan pengindraan yang meliputi bentuk, bau, rasa, dan warna. Hasil identifikasi ekstrak daun sambung nyawa dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak daun sambung nyawa

Organoleptis	Hasil
Bentuk	Ekstrak kental
Bau	Khas daun sambung nyawa
Rasa	Agak pahit
Warna	Hijau kecoklatan

Dari hasil pemeriksaan organoleptis yang diperoleh maka hasil tersebut sesuai dengan identitas ekstrak daun sambung nyawa yang berbentuk ekstrak kental, berwarna coklat, bau khas, dan rasa agak pahit (Kemenkes 2010).

7. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun sambung nyawa

Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun sambung nyawa menggunakan cara destilasi dengan alat *Sterling-Bidwell*. Cairan pembawa yang digunakan adalah toluen karena toluen memiliki titik didih dan berat jenis lebih tinggi dari pada air dan tidak bercampur dengan air sehingga memudahkan dalam penetapan kadar air. Kadar air serbuk yaitu kurang dari 10% (Depkes 1986) dan kadar air ekstrak daun sambung nyawa tidak lebih dari 11% (Kemenkes 2010), hal ini dimaksudkan agar kerusakan sampel dapat ditekan baik dalam pengolahan maupun waktu penyimpanan. Kandungan air pada suatu bahan yang terlalu tinggi dapat membuat bahan tidak tahan terhadap penyimpanan dalam jangka waktu yang lama karena memungkinkan kerusakan bahan akibat jamur.

Tabel 6. Hasil penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun sambung nyawa

Bahan	Kadar air (%)
Serbuk	5,99
Ekstrak	15,35

Hasil perhitungan kadar air serbuk daun sambung nyawa adalah 5,99% maka memenuhi kadar air yang dipersyaratkan yaitu <10% (Depkes 1986) sedangkan kadar air ekstrak daun sambung nyawa adalah 15,35% melebihi persyaratan yang telah ditetapkan yaitu tidak lebih dari 11% (Kemenkes 2010). Hasil perhitungan kadar air serbuk dapat dilihat pada Lampiran 5.

8. Identifikasi kandungan senyawa dengan metode reaksi kimia

Serbuk dan ekstrak etanol daun sambung nyawa yang diperoleh diidentifikasi kandungan kimia yang terkandung di dalamnya. Uji kualitatif menggunakan reaksi kimia untuk mengetahui kandungan flavonoid, tanin, saponin, triterpenoid dan alkaloid. Hasil identifikasi kandungan kimia daun rambusa dapat dilihat pada pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun sambung nyawa

Senyawa	Prosedur	Hasil			Ket
		Serbuk	Ekstrak	Pustaka(Depkes 1993)	
Tanin	Pereaksi FeCl ₃	warna hijau kehitaman	warna hijau kehitaman	warna larutan akan berubah menjadi biru kehitaman (galat) atau hijau kehitaman (katekol)	(+)
Saponin	-	Terbentuk buih 1 cm	Terbentuk buih 1,3 cm	Adanya buih yang stabil 1-10 cm	(+)
Triterpenoid	Pereaksi Lieberman Bourchard	Terbentuk warna merah	Terbentuk warna merah	Terbentuk warna merah sampai ungu	(+)
Flavonoid	Pereaksi Shianidin	Kuning pada lapisan amil alkohol	Jingga pada lapisan amil alkohol	Merah jingga atau kuning jingga pada lapisan amil alkohol	(+)
Alkaloid	Mayer	Endapan putih	Endapan putih	Terbentuk endapan putih kekuningan	(+)
	Dragendorff	Endapan Jingga	Endapan Jingga	Terbentuk endapan Jingga	(+)
	Wagner	Endapan coklat	Endapan coklat	Terbentuk endapan coklat	(+)

Keterangan :

(+) : Positif mengandung senyawa

(-) : Negatif mengandung senyawa

Berdasarkan hasil identifikasi kualitatif terhadap serbuk dan ekstrak daun sambung nyawa pada Tabel 7, dapat diketahui bahwa ekstrak daun sambung nyawa positif mengandung senyawa flavonoid, tanin, saponin, triterpenoid dan alkaloid. Berdasarkan hasil identifikasi oleh (Tan *et al.* 2016) pada ekstrak etanol daun sambung nyawa positif mengandung senyawa flavonoid, tanin, saponin, triterpenoid dan alkaloid. Berdasarkan Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun sambung nyawa secara kualitatif dapat dilihat pada Lampiran 8.

8.1 Identifikasi tanin. Tanin dibagi menjadi dua golongan dan masing-masing golongan memberikan reaksi warna yang berbeda terhadap FeCl_3 1 %. Golongan tanin hidrolisis akan menghasilkan warna biru kehitaman dan tanin kondensasi akan menghasilkan warna hijau kehitaman. Pada saat penambahannya, diperkirakan FeCl_3 1% bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil yang ada pada senyawa tanin. Hasil reaksi itulah yang akhirnya menimbulkan warna (A'yun *et al.* 2015). Hasil uji serbuk dan ekstrak daun sambung nyawa menghasilkan warna hijau kehitaman yang menunjukkan positif mengandung tanin terkondensasi (tanin katekol).

8.2 Identifikasi saponin. Pengujian saponin dilakukan dengan uji busa. Saponin memiliki glikosil yang berfungsi sebagai gugus polar dan gugus steroid dan triterpenoid sebagai gugus nonpolar. Senyawa yang memiliki gugus polar dan nonpolar bersifat aktif permukaan sehingga saat dikocok dengan air, saponin dapat membentuk misel. Pada struktur misel gugus polar menghadap keluar karena mengikat air (hidrofil) sedangkan gugus nonpolar menghadap kedalam karena takut dengan air (hidrofob). Keadaan inilah yang tampak seperti busa, karena itu dalam analisis ini dilihat kemampuan sampel dalam membentuk busa/buih (Sangi *et al.* 2008). Serbuk dan ekstrak daun sambung nyawa positif mengandung saponin karena membentuk busa dan busa tidak hilang setelah penambahan HCL.

8.3. Identifikasi triterpenoid. Pengujian triterpenoid dengan menggunakan reagen Liebermen Bouchardat. Analisis ini didasarkan pada kemampuan senyawa triterpenoid membentuk warna oleh H_2SO_4 pekat dalam pelarut anhidrida asam asetat. Hasil positif diberikan pada sampel yang membentuk warna merah jingga untuk analisis triterpenoid dan biru untuk analisis

steroid (Sangi *et al.* 2008). Pada serbuk dan ekstrak daun sambung nyawa didapatkan hasil yaitu bewarna merah, sehingga serbuk dan ekstrak daun sambung nyawa terbukti positif mengandung triterpenoid.

8.4 Identifikasi flavonoid. Uji flavonoid dengan menggunakan serbuk magnesium dan HCL pekat yang berfungsi untuk menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya. Reduksi dengan magnesium dan HCL pekat dapat menghasilkan senyawa kompleks yang bewarna dan membentuk garam flavilium (Pramita *et al.* 2018). Hasil positif flavonoid terbentuk bewarna kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Robinson 1995). Serbuk dan ekstrak daun sambung nyawa positif mengandung flavonoid, hal ini ditunjukkan dengan adanya warna kuning pada lapisan amil alkohol pada serbuk daun sambung nyawa dan warna jingga pada lapisan amil alkohol ekstrak daun sambung nyawa.

8.5 Identifikasi alkaloid. Pengujian alkaloid pada serbuk dan ekstrak daun sambung nyawa dengan menggunakan reagen Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Prinsip dari metode analisis ini adalah reaksi pengendapan yang terjadi karena adanya penggantian ligan. Atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada alkaloid dapat mengganti ion iodo dalam berbagai pereaksi. Pereaksi Dragendorff mengandung bismut nitrat dan kalium iodida dalam larutan asam asetat glasial [kalium tetraiodobismutat (III)] akan membentuk endapan berwarna jingga. Pereaksi Wagner mengandung iod dan kalium iodida akan membentuk endapan coklat (Sangi *et al.* 2008). Sedangkan pereaksi Mayer mengandung kalium iodida dan merkuri klorida [kalium tetraiodomerkurat (II)], pada pereaksi Mayer akan terjadi reaksi antara nitrogen dengan ion kalium (K⁺) membentuk kompleks kalium alkaloid yang mengendap membentuk warna putih kekuningan (Sry *et al.* 2016). Serbuk dan ekstrak daun sambung nyawa positif mengandung alkaloid karena membentuk endapan warna dengan seluruh pereaksi yang digunakan.

9. Hasil pengukuran berat badan tikus

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi-Toksikologi, Universitas Setia Budi. Sebelum dilakukan perlakuan hewan uji diaklimatisasi

selama 7 hari kemudian dipuasakan terlebih dahulu selama ± 16 jam. Tujuan dipuasakan untuk menghindari pengaruh makanan yang dapat mempengaruhi kadar glukosa darah tikus, selanjutnya dilakukan penimbangan berat badan dan pengambilan darah untuk mengetahui kadar gula darah awal (T_0).

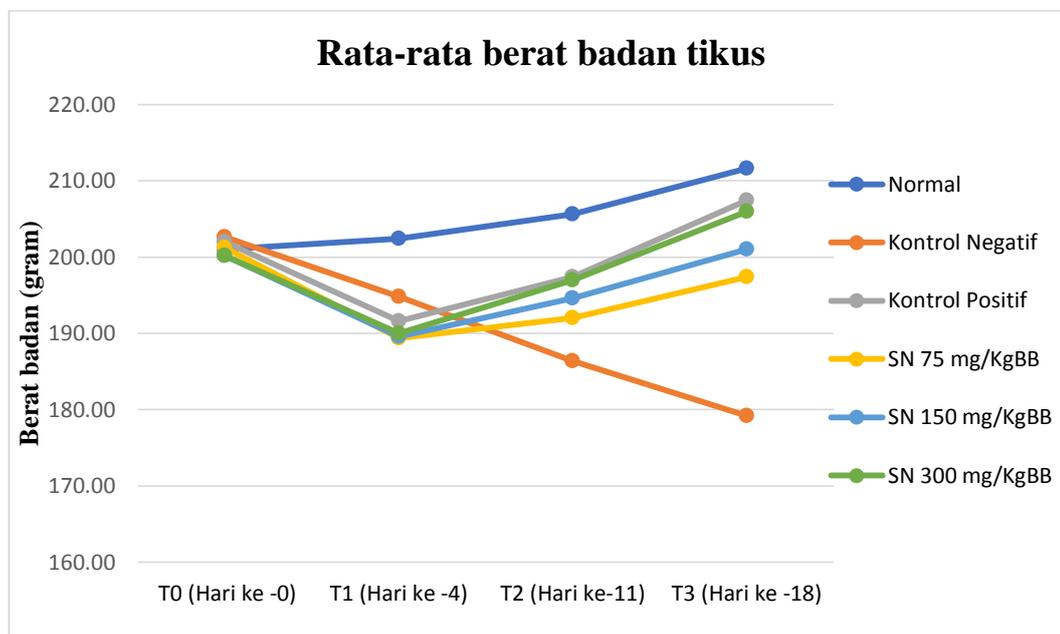
Penimbangan berat badan hewan uji dilakukan mulai pada hari ke-0 bertujuan untuk memastikan kondisi hewan uji antara kelompok perlakuan sama. Selanjutnya pengukuran berat badan hewan uji dilakukan setiap kali pengambilan darah yaitu ada hari ke-4 setelah induksi aloksan (T_1), hari ke-7 (T_2) dan hari ke-14 (T_3) setelah pemberian perlakuan untuk melihat perubahan berat badan tikus pada masing-masing perlakuan sebelum dan sesudah diberikan perlakuan terhadap obat sintetik dan ekstrak daun sambung nyawa.

Tabel 8. Rata-rata berat badan tikus

Kelompok	Rata - rata berat tikus (gram)			
	T0	T1	T2	T3
Normal	201,00 \pm 3,39	202,40 \pm 3,58 ^{bc}	205,60 \pm 3,13 ^{bc}	211,60 \pm 2,70 ^{bc}
Kontrol Negatif	202,60 \pm 3,36	194,80 \pm 3,70 ^a	186,40 \pm 2,97 ^{ac}	179,20 \pm 1,64 ^{ac}
Kontrol positif	202,00 \pm 4,47	191,60 \pm 2,41 ^a	197,40 \pm 2,07 ^{ab}	207,40 \pm 2,07 ^{ab}
SN 75 mg/KgBB	201,20 \pm 2,86	189,40 \pm 1,64 ^{ab}	192,00 \pm 1,22 ^{abc}	197,40 \pm 2,30 ^{abc}
SN 150 mg/KgBB	200,20 \pm 1,92	189,60 \pm 1,14 ^{ab}	194,60 \pm 2,79 ^{ab}	201,00 \pm 0,71 ^{ab}
SN 300 mg/KgBB	200,20 \pm 2,59	190,00 \pm 1,00 ^{ab}	197,00 \pm 1,82 ^{ab}	206,00 \pm 1,48 ^{ab}

Keterangan :

- Kontrol Negatif : kelompok kontrol negatif (CMC Na 0,5%)
- Kontrol Positif : kelompok kontrol positif (Glibenklamid 0,045 mg/KgBB)
- SN : Sambung nyawa
- T₀ : hari ke-0 sebelum induksi aloksan
- T₁ : hari ke-4 setelah induksi aloksan
- T₂ : hari ke-7 setelah diberi sediaan uji
- T₃ : hari ke-14 setelah diberi sediaan uji
- a : berbeda signifikan dengan kelompok kontrol normal
- b : berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif
- c : berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif



Gambar 1. Grafik hubungan rata-rata berat badan tikus (gram) dengan waktu

Berdasarkan rata-rata berat badan hewan uji pada Tabel 8 yang digunakan sebagai tolok ukur untuk memastikan tingkat penyerapan glukosa, pada kelompok normal menunjukkan terjadinya peningkatan berat badan hewan uji hal ini dikarenakan oleh kondisi hewan uji yang sehat, asupan makanan tercukupi dan penyerapan glukosa serta nutrisi lainnya yang normal.

Pada kelompok kontrol diabetes terjadi penurunan berat badan hewan uji setelah diinduksi aloksan secara intraperitoneal, menunjukkan bahwa induksi aloksan dengan dosis 150 mg/kgBB tikus yang dilakukan berhasil membuat hewan coba mengalami diabetes. Kondisi eksperimental diabetes akan mengakibatkan tikus normal menjadi tikus diabetes ditandai dengan salah satu ciri yaitu terjadinya penurunan berat badan yang disebabkan oleh defisiensi hormon insulin sehingga transport glukosa ke dalam sel jaringan perifer berkurang. Kondisi ini mengakibatkan sel akan melakukan metabolisme dengan menggunakan cadangan glikogen melalui proses glikolisis, meningkatnya katabolisme protein dimana asam amino yang dihasilkan digunakan sebagai substrat untuk glukoneogenesis dalam hati (Pasaribu *et al.* 2015).

Pada kelompok kontrol positif glibenklamid terjadi penurunan berat badan setelah dilakukan induksi aloksan, namun setelah diberi perlakuan dengan

glibenklamid terjadi peningkatan berat badan kembali. Peningkatan berat badan ini dapat dikaitkan sebagai akibat dari pemberian glibenklamid yang menyebabkan jumlah insulin yang dilepaskan dari sel β pankreas meningkat. Peningkatan pelepasan insulin ini akan meningkatkan transport glukosa ke dalam sel sampai ke jaringan perifer dan mengarah pada pemanfaatan nutrisi penting lain, penyerapan asam amino dan komponen makromolekul lainnya (Kumar *et al.* 2013).

Pengukuran berat badan tikus pada kelompok perlakuan ekstrak dengan 3 variasi dosis yaitu dosis ekstrak daun sambung nyawa 75 mg/KgBB, ekstrak daun sambung nyawa 150 mg/KgBB dan ekstrak daun sambung nyawa 300 mg/KgBB menunjukkan adanya peningkatan berat badan. Peningkatan berat badan ini berbanding lurus dengan kenaikan dosis ekstrak daun sambung nyawa, tetapi peningkatan berat badan ini belum setara dengan kelompok kontrol positif glibenklamid. Peningkatan berat badan ini dikaitkan dengan kandungan kimia daun sambung nyawa yang berperan sebagai antioksidan alami yang berfungsi untuk melindungi sel β pankreas dari radikal bebas (Lee *et al.* 2012).

10. Hasil Pengukuran Kadar Gula Darah Tikus

Uji aktivitas antidiabetes ekstrak daun sambung nyawa dilakukan terhadap hewan uji tikus putih jantan. Tikus putih jantan digunakan karena mempunyai kerja metabolisme obat yang lebih cepat dan kondisi biologis yang lebih stabil karena tikus jantan tidak dipengaruhi hormon estrogen, yang dapat mempengaruhi kadar gula darah. Tikus diadaptasi selama 1 minggu sebelum digunakan. Setelah diadaptasikan, berat badan tikus kemudian ditimbang. Tikus terlebih dahulu dipuaskan selama \pm 16 jam sebelum diberi perlakuan. Tujuannya untuk meminimalkan faktor makanan yang dapat mempengaruhi kadar glukosa darah tikus dan absorpsi obat yang diberikan. Tikus kemudian dikondisikan diabetes dengan induksi zat diabetogen yaitu aloksan. Glukosa darah diukur dengan menggunakan metode Glukometer menggunakan alat glukometer. Glukosa darah diukur sebelum diberi perlakuan (T_0), hari ke-4 (T_1), hari ke- 11 (T_2), dan hari ke- 18 (T_3).

Pada penelitian ini hewan uji dibuat diabetes dengan induksi senyawa diabetogenik yaitu aloksan monohidrat. Aloksan diberikan secara intraperitoneal dengan dosis aloksan yang digunakan sebesar 150 mg/kg BB tikus. Hewan uji dapat dikatakan diabetes apabila setelah 4 hari pemberian aloksan terjadi hiperglikemia (kadar gula darah > 200 mg/dl) (Putra *et al.* 2015). Senyawa aloksan merupakan salah satu zat diabetogenik yang bersifat toksik, terutama terhadap sel β pankreas. Mekanisme toksisitas aloksan diawali dengan masuknya aloksan ke dalam sel-sel β pankreas. Kerusakan pada sel-sel β terjadi melalui beberapa proses secara bersamaan, yaitu melalui oksidasi gugus sulfhidril dan pembentukan radikal bebas (Szkuldelski 2001). Pembentukan oksigen reaktif merupakan faktor utama pada kerusakan sel tersebut. Aloksan mengakibatkan terjadinya penurunan respon jaringan perifer terhadap aksi insulin atau malfungsi dari reseptor insulin dan penurunan kemampuan sel β Langerhans pankreas dalam menstimulasi insulin sehingga mengakibatkan peningkatan kadar glukosa darah seperti pada kondisi diabetes melitus tipe 2 (Nugroho 2006).

Meningkatnya kadar glukosa darah setelah pemberian aloksan disebabkan oleh terbentuknya radikal bebas melalui reaksi reduksi oksidasi. Aloksan dan produk reduksinya asam dialurik membentuk siklus reaksi oksidasi dengan formasi radikal superoksida. Radikal ini mengalami dismutasi menjadi hidrogen peroksida. Radikal hidroksil dengan kereaktifan yang tinggi dibentuk oleh reaksi Fenton. Aksi radikal bebas dengan rangsangan tinggi meningkatkan konsentrasi kalsium sitosol yang menyebabkan destruksi cepat sel β pankreas (Haryoto *et al.* 2016). Mekanisme lain juga menyebutkan aloksan bekerja melalui perusakan pada permeabilitas membran sel. Aloksan menginduksi pengeluaran ion kalsium dari mitokondria yang mengakibatkan proses oksidasi sel terganggu. Keluarnya ion kalsium dari mitokondria mengakibatkan homeostasis yang merupakan awal dari matinya sel. Hal ini yang menyebabkan produksi insulin pada sel β pankreas terganggu (Lenzen 2007).

Pengukuran kadar gula darah tikus dilakukan dengan menggunakan alat glukometer (GlucoDr Biosensor AGM-2100). Glukosa yang ada dalam darah akan bereaksi dengan glukosa oksidase dan kalium ferrisianida yang ada dalam

strip dan akan dihasilkan kalium ferrosianida. Kalium ferrosianida yang dihasilkan sebanding dengan konsentrasi glukosa yang ada dalam sampel darah. Oksidasi kalium ferrosianida akan menghasilkan muatan listrik yang akan diubah oleh glukometer untuk ditampilkan sebagai konsentrasi glukosa pada layar (Linghuat 2008).

Pengukuran kadar gula darah dilakukan sebelum dan sesudah diberikan perlakuan (T_0 - T_3). Pada awal penelitian dilakukan pengukuran kadar gula darah tikus yaitu pada T_0 . Data T_0 digunakan sebagai pembandingan untuk melihat berhasil atau tidaknya induksi aloksan pada kelompok tikus diabetes melitus yaitu pada kelompok kontrol negatif (CMC 0,5%), kontrol positif (Glibenklamid), ekstrak daun sambung nyawa 75 mg/kg, 150 mg/kg dan 300 mg/kg. Setelah kelompok tikus diabetes diinduksi aloksan, 4 hari kemudian dilakukan pengukuran kadar gula darah tikus kembali untuk memastikan tikus yang diinduksi telah mengalami diabetes (T_1).

Aktivitas antidiabetes ekstrak etanol daun sambung nyawa dilihat dari penurunan kadar gula darah tikus sebelum dan sesudah pemberian sendiaan uji. Data pengukuran gula darah pada 6 kelompok perlakuan yang masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus putih jantan galur Wistar dapat dilihat pada Tabel 9. Pada tabel 9 dapat dilihat kelompok normal memiliki kadar gula darah yang normal dimana peningkatan kadar gula darah yang terjadi tidak sampai melebihi 200 mg/dl dan stabil di bawah 100 mg/dl karena hewan uji hanya diberikan pakan tanpa induksi aloksan. Kelompok kontrol negatif yang hanya diberikan perlakuan dengan CMC Na 0,5% memiliki kadar gula darah yang tetap tinggi setelah diinduksi dengan aloksan yaitu berkisar ± 200 mg/dl pada waktu T_1 sampai T_3 yang mengindikasikan bahwa induksi aloksan telah berhasil membuat tikus mengalami keadaan hiperglikemik. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian CMC Na 0,5% tidak berpengaruh terhadap penurunan kadar gula darah tikus diabetes.

Tabel 9. Data kuantitatif rata-rata hasil pengukuran kadar gula tikus pada berbagai kelompok perlakuan selama 14 hari

Kelompok	Rata-rata kadar gula darah tikus (mg/dl)			
	T0	T1	T2	T3
Normal	87,00 ± 3,00	83,80 ± 3,42 ^{ab}	85,20 ± 2,17 ^{bc}	85,20 ± 4,76 ^{bc}
Kontrol Negatif	85,40 ± 2,10	239,40 ± 3,65 ^a	231,80 ± 4,21 ^{ac}	195,80 ± 4,82 ^{ac}
Kontrol Positif	86,00 ± 1,22	240,00 ± 4,16 ^a	109,20 ± 2,77 ^{ab}	85,80 ± 4,15 ^{ab}
SN 75 mg/KgBB	85,40 ± 2,70	236,60 ± 4,22 ^a	164,80 ± 2,17 ^{abc}	122,20 ± 3,27 ^{abc}
SN 150 mg/KgBB	82,40 ± 2,70	237,00 ± 3,39 ^a	144,40 ± 3,05 ^{abc}	110,40 ± 2,30 ^{abc}
SN 300 mg/KgBB	84,60 ± 3,36	237,20 ± 3,77 ^a	119,40 ± 4,04 ^{abc}	90,80 ± 3,19 ^{abc}

Keterangan :

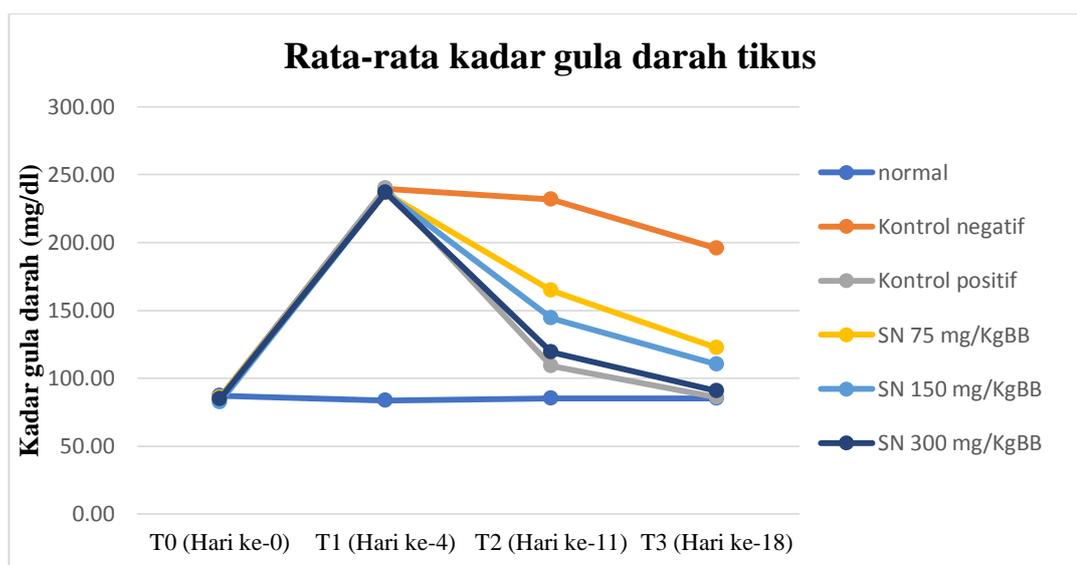
- Kontrol Negatif : kelompok kontrol negatif (CMC Na 0,5%)
 Kontrol Positif : kelompok kontrol positif (Glibenklamid 0,045 mg/Kg)
 SN : Sambung nyawa
 a : berbeda signifikan dengan kelompok kontrol normal
 b : berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif
 c : berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif
 T₀ : hari ke-0 sebelum induksi aloksan
 T₁ : hari ke-4 setelah induksi aloksan
 T₂ : hari ke-7 setelah diberi sediaan uji
 T₃ : hari ke-14 setelah diberi sediaan uji

Pada hari ke-7 setelah diberi sediaan uji, kadar glukosa darah semua kelompok mengalami penurunan. Dilihat dari hasil analisa statistik uji *post hoc test* pada kelompok 4, 5 dan 6 dengan dosis ekstrak daun sambung nyawa 75 mg/kgB, 150 mg/kgB dan dosis 300 mg/kgBB menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) nilai sig. = 1,000 sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun sambung nyawa dengan dosis 75 mg/kgBB, 150 mg/kgBB dan dosis 300 mg/kgBB mampu menurunkan kadar gula darah tikus yang diberi perlakuan selama 7 hari namun belum sebanding dengan kelompok kontrol positif (glibenklamid 0,45 mg/KgBB).

Pada hari ke-14 setelah diberi sediaan uji, kadar gula darah semua kelompok mengalami penurunan yang signifikan. Pada pemberian ekstrak daun sambung nyawa dosis 300 mg/KgBB mampu menurunkan kadar gula darah tikus

yang sebanding dengan kelompok kontrol positif. Dilihat dari hasil analisa statistik uji *post hoc test* pada kelompok 6 dengan dosis ekstrak daun sambung nyawa 300 mg/kgBB menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) dengan kelompok pembanding (glibenklamid 0,45 mg/KgBB) nilai sig. = 0,235.

Perubahan aktivitas ekstrak daun sambung nyawa yang terjadi pada hari ke-7 (T_2) dan hari ke-14 (T_3) dapat dikaitkan dengan salah satu prinsip kerja obat tradisional yaitu reaksi yang lambat tidak seperti obat kimia yang bisa langsung bereaksi. Hal itu disebabkan, senyawa-senyawa berkhasiat di dalam obat tradisional membutuhkan waktu relatif panjang untuk mempengaruhi fungsi metabolisme tubuh. Berbeda dengan glibenklamid yang bekerja dengan cara meningkatkan sekresi insulin dari sel beta pankreas sehingga dapat memberi efek penurunan kadar glukosa yang cenderung lebih cepat.



Gambar 8. Grafik hubungan rata-rata kadar glukosa darah (mg/dl) dengan waktu

Keterangan:

- Kontrol Negatif : kelompok kontrol negatif (CMC Na 0,5%)
- Kontrol Positif : kelompok kontrol positif (Glibenklamid 0,045 mg/Kg)
- SN : Sambung nyawa
- T_0 : hari ke-0 sebelum induksi aloksan
- T_1 : hari ke-4 setelah induksi aloksan
- T_2 : hari ke-7 setelah diberi sediaan uji
- T_3 : hari ke-14 setelah diberi sediaan uji

Pada grafik di atas menunjukkan kadar glukosa darah pada kelompok I tidak mengalami kenaikan maupun penurunan yang signifikan karena kelompok I

sebagai kontrol normal yang tidak diinduksi aloksan dan hanya diberi makan dan minum saja. Kelompok II (CMC 0,5%) setelah diinduksi aloksan kadar gula darah tikus tetap berkisar ± 200 mg/dl hingga hari ke 14, sedangkan grafik kelompok III hingga kelompok VI pada T1 (induksi aloksan) sama-sama mengalami peningkatan glukosa darah tetapi pada T2 dan T3 mengalami penurunan glukosa darah.

Pada grafik di atas menunjukkan bahwa ekstrak daun sambung nyawa dapat menurunkan kadar glukosa darah dilihat dari tiap waktu pengukuran glukosa darahnya pada hari ke-11 dan ke-18. Pada hari ke-11 atau 7 hari setelah induksi sediaan uji pada kelompok dosis ekstrak daun sambung nyawa 75 mg/kgBB, 150 mg/kgBB dan 300 mg/kg BB mengalami penurunan kadar glukosa namun belum setara dengan kontrol positif (glibenklamid). Setelah 14 hari induksi sediaan uji, kemudian diukur kadar gula darahnya mengalami penurunan yang signifikan pada ekstrak daun sambung nyawa dosis 300 mg/kgBB setara dengan kontrol positif (glibenklamid). Glibenklamid merupakan obat golongan sulfonilurea yang mekanisme kerjanya yaitu merangsang sekresi hormon insulin dari granul sel-sel β Langerhans pankreas. Interaksinya dengan ATP-sensitive K channel pada membran sel-sel β menimbulkan depolarisasi membran dan keadaan ini akan membuka kanal Ca. Dengan terbentuknya kanal Ca, maka ion Ca^{2+} akan masuk ke dalam sel β kemudian merangsang granula yang berisi insulin dan akan terjadi sekresi insulin (Pradini *et al.* 2017).

Tabel 10. Persentase penurunan kadar gula darah tikus

Kelompok	Persen penurunan kadar gula darah T1 ke T2 dan T1 ke T3			
	T1-T2	% Δ T1	T1-T3	% Δ T2
Normal	-1,40	43,75	-1,40	43,75
Kontrol negatif	7,60	4,94	43,60	28,31
Kontrol positif	130,80	84,94	154,20	100,13
SN 75 mg/KgBB	71,80	47,49	114,40	75,66
SN 150 mg/KgBB	92,60	59,90	126,60	81,89
SN 300 mg/KgBB	117,60	77,17	146,20	95,93

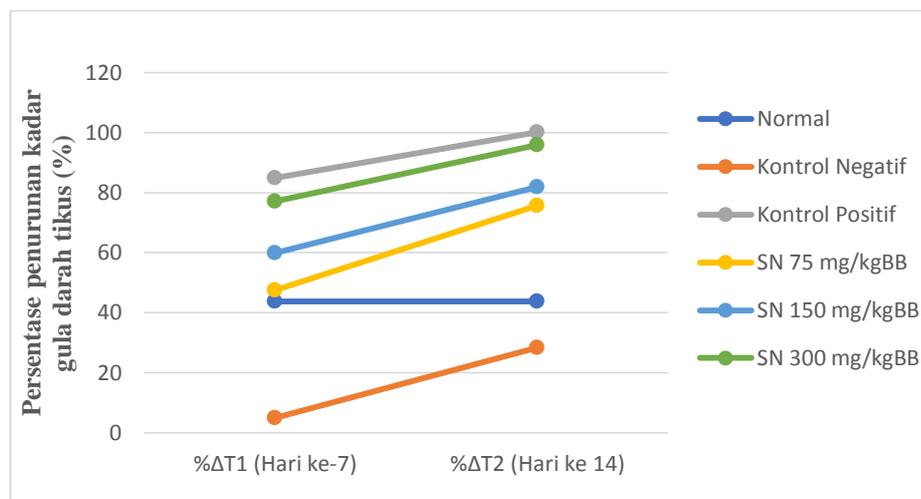
Keterangan :

Kontrol negatif : kelompok kontrol negatif (CMC Na 0,5%)

Kontrol positif : kelompok kontrol positif (Glibenklamid 0,45 mg/KgBB)

% Δ T₁ : Persen penurunan kadar glukosa darah dari T₁ ke T₂

% Δ T₂ : Persen penurunan kadar glukosa darah dari T₁ ke T₃



Gambar 9. Grafik persentase penurunan kadar gula darah tikus

Berdasarkan persentase penurunan kadar gula darah tikus pada ΔT_1 dan ΔT_2 dapat diketahui bahwa pemberian ekstrak etanol daun sambung nyawa dengan tiga variasi dosis dan kelompok kontrol positif yang diberikan glibenklamid terbukti mampu menurunkan kadar gula darah tikus. Pada ΔT_1 kelompok uji ekstrak etanol daun sambung nyawa dengan dosis 75 mg/kgBB, 150 mg/kg BB dan 300 mg/kg BB secara berturut-turut mampu menurunkan kadar gula darah sebesar 47,49%, 59,90% dan 77,17%, sedangkan untuk kelompok pembanding sebesar 84,94%. Pada ΔT_2 persentase penurunan kadar gula darah kelompok uji ekstrak etanol daun sambung nyawa dengan dosis 75 mg/kgBB, 150 mg/kg BB dan 300 mg/kg BB secara berturut-turut mampu menurunkan kadar gula darah sebesar 75,66%, 81,89% dan 95,93% sedangkan kelompok pembanding sebesar 100,13%.

Berdasarkan data yang diperoleh dari penelitian ini dapat diketahui bahwa semakin tinggi dosis ekstrak etanol daun sambung nyawa yang diberikan maka semakin besar pula efek penurunan kadar gula darah yang dihasilkan. Hal ini disebabkan karena semakin tinggi dosis yang diberikan maka akan semakin banyak jumlah zat aktif yang dapat menurunkan kadar gula darah tikus.

Penurunan kadar glukosa darah dengan pemberian ekstrak etanol daun sambung nyawa dapat disebabkan oleh adanya senyawa bioaktif yang terkandung dalam daun sambung nyawa yang dapat mencegah terjadinya oksidasi pada sel β

pankreas sehingga kerusakan dapat diminimalkan. Senyawa bioaktif yang terdapat dalam daun sambung nyawa diantaranya adalah flavonoid, tanin, saponin, teriterpenoid dan alkaloid.

Komponen aktif dalam ekstrak etanol daun sambung nyawa diduga bekerja melalui berbagai mekanisme, diantaranya melalui kerja aktivitas antioksidan dari senyawa flavonoid bersumber pada kemampuan mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam (Redha 2010). Adanya flavonoid pada ekstrak etanol daun sambung nyawa (*Gynura Procumbens* (Lour) Merr) adanya flavonoid yang berperan secara signifikan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan dan mampu meregenerasi sel-sel β pankreas yang rusak sehingga defisiensi insulin dapat diatasi dan dapat memperbaiki sensitifitas reseptor insulin (Marianne, dkk. 2011). Flavonoid bekerja dengan cara menghambat enzim alfa amilase dan alfa glukosidase yang berfungsi menguraikan karbohidrat menjadi monosakarida yang dapat diserap oleh usus. Penghambatan pada kedua enzim ini mengakibatkan terganggunya proses pemecahan karbohidrat menjadi monosakarida sehingga tidak dapat diserap oleh usus. Dengan demikian, kadar gula darah tidak meningkat setelah mengkonsumsi makanan atau minuman yang mengandung gula atau senyawa yang dapat dipecah menjadi gula.

Tanin merupakan senyawa yang ada di dalam daun sambung nyawa. Tanin diketahui dapat memacu metabolisme glukosa dan lemak sehingga timbunan kedua sumber kalori ini dalam darah dapat dihindari. Tanin juga mempunyai aktivitas hipoglikemik yaitu dengan meningkatkan glikogenesis. Selain itu, tanin juga berfungsi sebagai pengkhelet yang dapat mengerutkan membran epitel usus halus sehingga mengurangi penyerapan sari makanan dan sebagai akibatnya menghambat asupan gula dan laju peningkatan gula darah tidak terlalu tinggi (Velayutham *et al.* 2012).

Alkaloid merupakan senyawa yang juga terdapat pada daun sambung nyawa. Alkaloid terbukti mempunyai kemampuan regenerasi berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Suryono dan Yudha (2012), dimana alkaloid terbukti secara nyata mempunyai kemampuan regenerasi sel β pankreas yang rusak. Alkaloid menurunkan gula darah dengan cara menghambat absorpsi gula di

usus (absorpsi gula secara perlahan), meningkatkan transportasi gula dengan menghambat enzim glukosa 6-fosfatase, fruktosa 1,6-bisfosfatase yang merupakan enzim yang berperan dalam glukoneogenesis serta meningkatkan oksidasi glukosa melalui glukosa 6-fosfat dehidrogenase. Penghambatan pada enzim ini akan menurunkan pembentukan glukosa dari substrat lain selain karbohidrat

Saponin menurunkan kadar gula darah dengan menghambat aktivitas enzim alfa glukosidase, yaitu enzim dalam pencernaan yang bertanggung jawab terhadap perubahan karbohidrat menjadi glukosa (Makalalag *et al.* 2013).

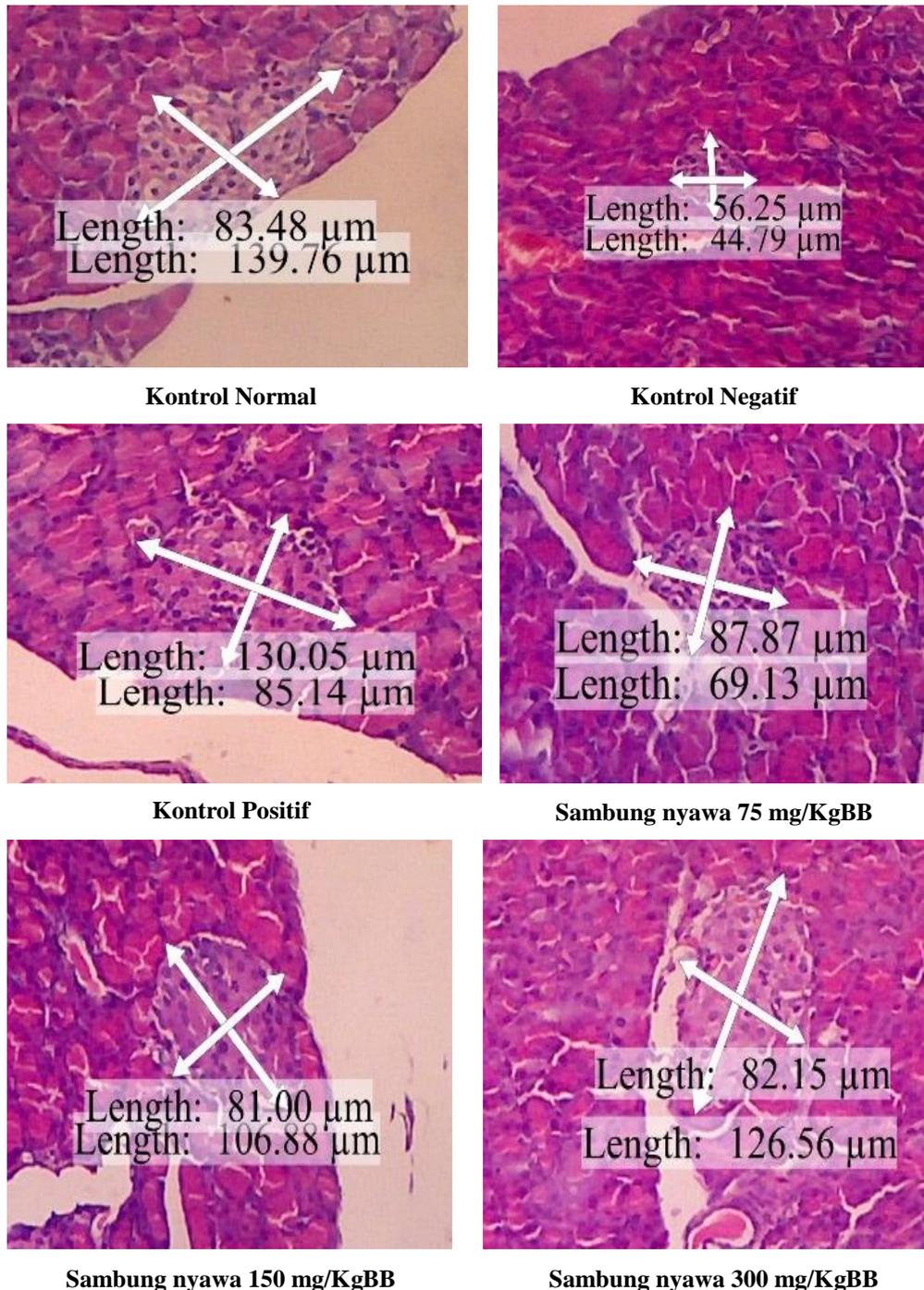
11. Hasil Pemeriksaan Histopatologi

Metode pemeriksaan yang digunakan untuk melihat kondisi histopatologi pankreas hewan uji adalah metode pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE). Metode ini menggunakan pewarnaan ganda (*double staining*), sehingga hematoxylin akan memulas inti dan struktur asam lainnya dari sel menjadi biru, sedangkan eosin akan memberikan warna merah pada sitoplasma dan kolagen (Junquiera 2007). Pankreas merupakan organ penting dalam tubuh yang terletak di retroperitonial yang tersusun dari jaringan endokrin dan eksokrin, setiap jaringan ini memiliki fungsi yang berbeda. Bagian eksokrin terdiri atas sel-sel asinar yang berfungsi sebagai penghasil getah pankreas, sedangkan bagian endokrin terdiri atas pulau Langerhans yang terdapat sel β dan berfungsi menghasilkan insulin (Farid *et al.* 2016). Pengamatan gambaran histopatologi pada jaringan pankreas bertujuan untuk melihat ada tidaknya regenerasi atau perbedaan kondisi histologi pankreas sebelum dan sesudah diberikan ekstrak etanol daun sambung nyawa dibandingkan dengan kontrol positif (glibenklamid) dan kontrol negatif (tikus diabetes).

Penelitian ini menggunakan *software optilab* untuk membaca dan mencari pulau Langerhans pankreas, dilanjutkan dengan *software image raster* untuk mengukur diameter sel endokrin pankreas. Hasil pengamatan histopatologi dapat dilihat pada Gambar 10.

Parameter yang dinilai yaitu diameter sel endokrin pankreas tikus yang akan dibandingkan dengan tiap kelompok perlakuan. Pada kondisi diabetes akan memberikan gambaran penyusutan ukuran diameter sel endokrin pankreas. Setiap preparat diamati sel endokrinnya untuk diambil datanya kemudian dirata-rata

diameternya untuk dipakai sebagai data yang akan dianalisis. Hasil data rata-rata diameter sel endokrin pankreas kemudian dianalisis secara statistik dan dari hasil pengamatan didapatkan rata-rata diameter sel endokrin pankreas seperti dibawah ini.



Gambar 10. Diameter sel endokrin pankreas pada perbesaran 100 X

Tabel 11. Rata-rata pengukuran diameter sel endokrin pankreas

Kelompok	Diameter sel endokrin pankreas (μm) \pm SD
Normal	110,67 \pm 1,04 ^a
Kontrol Negatif	57,37 \pm 3,86 ^{ac}
Kontrol Positif	106,26 \pm 1,18 ^b
SN 75 mg/KgBB	78,91 \pm 5,32 ^{abc}
SN 150 mg/KgBB	92,16 \pm 2,29 ^{abc}
SN 300 mg/KgBB	103,70 \pm 0,70 ^b

Keterangan :

- Kontrol Negatif : kelompok kontrol negatif (CMC Na 0,5%)
 Kontrol Positif : kelompok kontrol positif (Glibenklamid 0,045 mg/Kg)
 SN : Sambung nyawa
 a : berbeda signifikan dengan kelompok kontrol normal
 b : berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif
 c : berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif

Hasil pengukuran diameter sel endokrin pankreas tikus menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata ukuran diameter pulau Langerhans pankreas tikus setiap kelompoknya. Hasil rata-rata ukuran sel endokrin pankreas tikus dari yang terbesar hingga yang terkecil adalah sebagai berikut: kelompok normal, kelompok kontrol positif, kelompok ekstrak sambung nyawa 300 mg/KgBB, kelompok ekstrak sambung nyawa 150 mg/KgBB, kelompok ekstrak sambung nyawa 75 mg/KgBB dan kelompok kontrol negatif.

Pada tikus normal sel endokrin pankreas memiliki ukuran diameter berkisar 100-200 μm hal ini dikarenakan sel endokrin pankreas masih aktif untuk melakukan pertumbuhan dan tidak terjadi kerusakan (Isnaeni 2011). Pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan kelompok perlakuan yang diberi aloksan mengalami pengecilan ukuran diameter. Mengecilnya diameter sel endokrin pankreas dipengaruhi oleh rusaknya sel β pankreas sebagai akibat dari pemberian aloksan yang merupakan agen diabetogenik. Aloksan menginduksi pembentukan ROS (*reactive oxygen species*) yang menyebabkan nekrosis sel-sel β pankreas secara selektif dan menginduksi resistensi insulin (Lenzen 2007). Kerusakan sel β pankreas akibat induksi aloksan dapat juga disebabkan akibat

penambahan radikal NO, radikal hidroksil superoksida oleh aloksan didalam sel β pankreas sehingga akan menyebabkan sel β tersebut menjadi rusak. Efek radikal bebas oleh aloksan dapat menyebabkan stress oksidasi pada sel β pankreas yang dapat menyebabkan gangguan pada proses oksidasi fosforilasi sehingga terjadi peningkatan produksi radikal bebas akibat dari antioksidan yang tersedia dalam tubuh tidak mampu lagi mengubah oksigen reaktif (O) menjadi senyawa yang netral O₂ (Adnyana *et al.* 2016). Pada kelompok kontrol negatif dapat dilihat bahwa diameter pulau Langerhans adalah yang paling kecil dibandingkan dengan kontrol normal, kontrol positif dan kelompok perlakuan. Hal ini dikarenakan pada kelompok kontrol negatif hanya diberikan CMC Na 0,5 % yang tidak memiliki efek farmakologi.

Pada kelompok kontrol positif yang diberikan glibenklamid terjadi perbaikan sel akibat dari mekanisme kerjanya yang meningkatkan sekresi insulin. Melalui mekanisme ini, kadar gula darah akan turun dan secara tidak langsung akan memperlambat progres kerusakan dari sel β pankreas (Pradini *et al.* 2017). Pada kelompok perlakuan ekstrak daun sambung nyawa dosis 75 mg/KgBB, 150 mg/KgBB dan 300mg/KgBB menunjukkan bahwa semakin besar dosis yang digunakan maka semakin besar juga kemampuannya dalam meregenerasi sel endokrin pankreas, hal ini membuktikan bahwa senyawa yang terkandung dalam daun sambung nyawa mempunyai kemampuan meregenerasi sel pankreas tikus. Dari analisis statistik maka dapat dilihat bahwa nilai sig. 0,104 > 0,05 menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok normal, kontrol positif dan dosis ekstrak daun sambung nyawa 300 mg/KgBB. Penelitian yang telah dilakukan oleh Rosidah (2008) menunjukkan bahwa ekstrak daun sambung nyawa mengandung antioksidan alami yaitu senyawa fenolik dan flavonoid serta senyawa aktif lain diantaranya tanin dan saponin.

Attanayake *et al.* (2015) mengemukakan bahwa dari berbagai penelitian histopatologi, senyawa dalam ekstrak suatu tanaman seperti flavonoid dan tanin dapat memberikan peningkatan aktivitas regenerasi sel pankreas tikus dan memperbesar ukuran diameter sel endokrin pankreas. Flavonoid dapat mencegah komplikasi atau progresifitas diabetes mellitus dengan cara membersihkan radikal

bebas yang berlebihan, memutuskan rantai reaksi radikal bebas, mengikat ion logam (*chelating*), dan memblokir jalur poliol dengan menghambat enzim aldose reduktase (Patel 2012). Selain itu flavonoid juga dapat berperan sebagai antioksidan dalam melindungi terhadap kerusakan jaringan pankreas yang diakibatkan oleh alkilasi DNA akibat induksi aloksan sebagai akibatnya dapat memperbaiki morfologi pankreas tikus dan meningkatkan sensitivitas reseptor insulin pada tikus yang resistensi insulin (Mohan & Nandhakumar 2014).

Antioksidan dari flavonoid dapat menekan apoptosis sel β tanpa mengubah proliferasi dari sel islet pankreas (Ajie 2015). Ruhe *et al* (2001) membuktikan bahwa antioksidan dapat mengikat radikal bebas sehingga dapat mengurangi resistensi insulin. Dalam pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Spesies*), oksigen akan berikatan dengan elektron bebas yang keluar karena bocornya rantai elektron yang akan menghasilkan ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) dalam mitokondria. Flavonoid sebagai antioksidan akan menyumbangkan atom hidrogennya sehingga flavonoid akan teroksidasi dan berikatan dengan radikal yang akan menyebabkan bebas radikal bebas menjadi senyawa yang lebih stabil.