

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### A. Daun Kemuning

#### 1. Sistematika tanaman daun kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack)

Klasifikasi tanaman kemuning (*Murraya paniculata* L. Jack) menurut Dalimartha (2014) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Division	: Tracheophyta
Subdivision	: Spermatophytina
Class	: Magnoliopsida
Order	: Sapindales
Family	: Rutaceae
Genus	: <i>Murraya</i>
Species	: <i>Murraya paniculata</i> (L.) Jack
Sinonim	: <i>M. banati</i> Elm, <i>M. exotica</i> L, <i>M. exotica</i> var. <i>sumatrana</i> Koord. Et Val, <i>M. glenieli</i> Thw, <i>M. odorata</i> Blanco, <i>M. sumatrana</i> Roxb, <i>Chalcas paniculata</i> L, <i>C. camuneng</i> Burm. F, <i>C. intermedia</i> Roem, <i>Connarus foetens</i> Blanco, <i>C. santaloides</i> Blanco.

#### 2. Nama daerah

Nama daerah dari kemuning antara lain, Jawa: Jenar, kamuning, kemuning, kamoneng, tajuman. Nusatenggara: kajeni, kemuning, kamuni, kamuning, kahabr, karizi, sukik. Sulawesi: kamuning, haumi, kayu gading, kamoni, palopo dan Maluku: eseki, fanasa, kamoni dan kamone (Iskandar, 2005).

#### 3. Deskripsi tanaman

Kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack), pada umumnya dikenal sebagai Orange Jessamine, merupakan tumbuhan yang tumbuh pada daerah tropis yang memiliki wujud seperti pohon dengan rata-rata pohon dapat tumbuh 3-7 meter. Batang berkayu, beralur, dan berwarna kecoklatan. Memiliki daun yang majemuk dengan anak daun 4-7 selebaran, dengan permukaan daun yang cukup licin, ujung serta pangkal daun yang runcing, tepi rata, pertulangan menyirip, serta berwarna hijau sepanjang musim. Tumbuhan eksotis ini memiliki

bunga berwarna putih dan buah berwarna putih yang apabila berumur tua akan menjadi berwarna merah dengan diameter kurang lebih 1 cm. Kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack) adalah genus tumbuhan berbunga, yang berkaitan erat dengan citrus dan masuk kedalam keluarga Rutaceae (Permenkes RI, 2016).

Kemuning adalah tanaman tropis asli dari Cina Selatan, Taiwan dan Asia Tenggara termasuk Malaysia, Indonesia, serta Australia bagian utara. Namun tumbuhan ini sekarang sudah banyak dibudidayakan dan dapat dengan mudah ditemukan di banyak negara di daerah tropis (Seidemann, 2005).

#### **4. Kandungan dan aktivitas farmakologi**

Kemuning kaya akan berbagai komponen zat aktif. Zat yang paling sering ditemukan yaitu alkaloid, flavonoid dan kumarin. Senyawa-senyawa polifenol seperti flavonoid dan galat mampu menghambat reaksi oksidasi melalui mekanisme penangkapan radikal (*radical scavenging*) dengan cara menyumbangkan satu elektron pada elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas sehingga banyaknya radikal bebas menjadi berkurang (Pokorny et al., 2001).

Daun kemuning mengandung senyawa kimia diantaranya kadinin, metilantranilat, bisabolen,  $\beta$ -karyofilen, geraniol, karen-3, eugenol, sitronelol, metil-salisilat, s-guiazulen, ostol, panikulatin, tanin dan kumurayin (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2011). Berbagai senyawa lain dari kemuning yang telah teridentifikasi, diantaranya alkaloid, kumarin, fenol, terpenoid dan flavonoid (Sayar *et al.*, 2014). Flavonoid inilah yang diduga sebagai agen antidiabetes, dimana kandungan ekstrak metanol daun kemuning yaitu 4'-hidroksi-3,5,6,7,3',5'-heksa-metoksi flavon sehingga senyawa inilah yang kemungkinan berperan sebagai antioksidan pada ekstrak etanol daun kemuning, mengingat antara metanol dan etanol perbedaan polaritasnya kecil sehingga senyawa ini kemungkinan besar terdapat juga pada ekstrak etanol daun kemuning (Rohman & Riyanto, 2005).

Menurut Katayoun *et al.* (2014) daun kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack) mempunyai kandungan kimia 3,3',4',5,5',7'-heksametoksiflavon dan 3',4',5,5',7-pentametoksiflavon dan memiliki sifat antioksidan. Dari berbagai komponen zat aktif tersebut, dipercaya alasan untuk aktivitas antioksidan ekstrak tumbuhan ini berasal dari senyawa-senyawa polifenol seperti flavonoid yang mampu menghambat reaksi oksidasi melalui mekanisme penangkapan radikal

(*radical scavenging*) dengan cara menyumbangkan satu elektron pada elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas sehingga banyaknya radikal bebas menjadi berkurang.

Alkaloid yang disebut Yuehcukene,  $1\beta$ -(3,-indolyl-7,9 $\alpha$ ,9 $\beta$ -trimethyl- 5 $\beta$ ,8,9,10 $\beta$  tetrahydroindano-[2,3-b] didapatkan dari daun kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack) terbukti menurunkan glukosa darah dengan cara menghambat absorpsi glukosa di usus, meningkatkan transportasi glukosa di dalam darah, merangsang sintesis glikogen dan menghambat sintesis glukosa dengan menghambat enzim glukosa 6-fosfatase, fruktosa 1,6-bifosfatase, serta meningkatkan oksidasi glukosa melalui glukosa 6-fosfat dehidrogenase. Glukosa 6-fosfatase dan fruktosa 1,6-bifosfatase merupakan enzim yang berperan dalam glukoneogenesis. Penghambatan pada kedua enzim ini akan menurunkan pembentukan glukosa dari substrat lain selain karbohidrat (Arjadi & Susatyo, 2010).

Jenis kumarin atau yang dikenal meranzin hydrate, murpanidin dan murragatin di dapatkan dari daun kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack) memiliki aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan kumarin karena kemampuannya untuk mempengaruhi pembentukan dan pemulungan spesies oksigen reaktif (ROS) (Fylaktakidou *et al.*, 2004).

Dari berbagai komponen zat aktif tersebut, dipercaya alasan untuk aktivitas antioksidan ekstrak tumbuhan ini berasal dari Senyawa-senyawa polifenol seperti flavonoid yang mampu menghambat reaksi oksidasi melalui mekanisme penangkapan radikal (*radical scavenging*) dengan cara menyumbangkan satu elektron pada elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas sehingga banyaknya radikal bebas menjadi berkurang. Kandungan antioksidan yang dimiliki kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack) berpotensi untuk dikembangkan dan dijadikan fitofarmaka (Gupta *et al.*, 2013).

**4.1 Aktivitas antioksidan daun kemuning.** Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat spesies oksigen reaktif/spesies nitrogen reaktif (ROS/RNS) dan juga radikal bebas sehingga antioksidan dapat mencegah penyakit-penyakit yang dihubungkan dengan radikal bebas seperti karsinogenesis, kardiovaskuler dan penuaan (Halliwell dan Gutteridge, 2000). Fungsi dari antioksidan itu sendiri adalah meningkatkan produksi nitrit oksida (NO) berpotensi untuk memperbaiki disfungsi endotel dan fungsi

mitokondria dalam sel, serta menurunkan aktifitas dari enzim NAD(P)H oksidase. Dalam kasus komplikasi makrovaskular/mikrovaskular pada penderita diabetes melitus, terapi antioksidan bermanfaat apabila diberikan bersamaan dengan terapi untuk mengendalikan tekanan darah, kondisi dislipidemia dan kontrol kadar glukosa secara optimal (Bajaj *et al.*, 2012). Selain itu, kerusakan berbagai jaringan yang diakibatkan oleh stres oksidatif dapat diredam oleh antioksidan (Setiawan & Suhartono, 2005). Antioksidan adalah senyawa yang dapat memberikan elektron pada senyawa radikal untuk menetralkannya. Beberapa antioksidan seperti glutathion, asam urat dan katalase diproduksi secara normal di dalam tubuh. Antioksidan lain diperoleh dari makanan, seperti vitamin C, vitamin E dan beta-karoten (Lobo *et al.*, 2010). Senyawa-senyawa polifenol seperti flavonoid dan galat mampu menghambat reaksi oksidasi melalui mekanisme penangkapan radikal (*radical scavenging*) dengan cara menyumbangkan satu elektron pada elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas sehingga banyaknya radikal bebas menjadi berkurang (Pokorny *et al.*, 2001).

Secara *in vitro*, flavonoid merupakan inhibitor yang kuat terhadap peroksidasi lipid, sebagai penangkap spesies oksigen atau nitrogen yang reaktif, dan juga mampu menghambat aktivitas enzim lipooksigenase dan siklooksigenase (Halliwell dan Gutteridge, 2000). Dari berbagai komponen zat aktif tersebut, dipercaya alasan untuk aktivitas antioksidan ekstrak tumbuhan ini berasal dari Senyawa-senyawa polifenol seperti flavonoid yang mampu menghambat reaksi oksidasi melalui mekanisme penangkapan radikal (*radical scavenging*) dengan cara menyumbangkan satu elektron pada elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas sehingga banyaknya radikal bebas menjadi berkurang. Kandungan antioksidan yang dimiliki kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack). Spesies oksigen reaktif (ROS) mampu mengoksidasi protein seluler, asam nukleat, dan lipid. Studi dan bukti klinis telah menunjukkan bahwa generasi ROS meningkat pada kedua jenis diabetes dan bahwa onset diabetes terkait erat dengan stres oksidatif terutama melalui oksidasi, glikasi protein nonenzimatik, dan degradasi oksidatif protein terglikasi (Johansen *et al.*, 2005).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Whang *et al.*, (2005) kumarin menunjukkan efek perlindungan terhadap stres oksidatif yang dimediasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pemberian kumarin pada konsentrasi 0,5 mM mampu

menangkap radikal hidroksil (OH) pada reaksi *in vitro* dengan menggunakan pereaksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang dibuat dengan mencampurkan DMSO. Dari hasil ini, penonaktifan langsung ROS mungkin merupakan alasan utama untuk efek perlindungan kumarin dari stres oksidatif yang dimediasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**4.2 Aktivitas antidiabetes daun kemuning.** Menurut Rohman dan Riyanto (2005), senyawa fenolik mampu menghambat reaksi oksidasi sehingga jumlah radikal bebas menjadi berkurang. Sedangkan senyawa flavanoid menunjukkan aktivitas sebagai penghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase. Ekstrak daun *Murraya koenigii*, yang masih satu genus dengan kemuning, mengandung senyawa flavonoid dan menunjukkan aktivitas sebagai penghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase (Gul *et al.*, 2012). Enzim  $\alpha$ -glukosidase (maltase, isomaltase dan sukrase) merupakan enzim yang berfungsi untuk memecah oligosakarida dan disakarida pada dinding usus halus menjadi monosakarida sehingga dapat diabsorpsi dan masuk ke dalam pembuluh darah (Sim *et al.*, 2010). Karbohidrat yang masuk ke dalam tubuh dalam bentuk polisakarida, akan dipecah terlebih dahulu oleh enzim  $\alpha$ -amilase menjadi oligosakarida. Hasil pemecahan dari  $\alpha$ -amilase kemudian akan dipecah kembali oleh enzim  $\alpha$ -glukosidase menjadi monosakarida. Kemudian akan dibawa oleh transporter glukosa menuju pembuluh darah dan diedarkan ke seluruh sel untuk diubah menjadi energi (Scheepers *et al.*, 2004).

Menurut Zou *et al.*, (2021) ekstrak etanol daun kemuning dengan dosis 35 dan 70 mg/Kg BB secara signifikan menghambat peningkatan kadar glukosa pada tikus *diabetic cardiomyopathy*. Daun kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack) memiliki aktivitas antidiabetes dengan cara menghambat kerja enzim  $\alpha$ -glukosidase pada membran usus halus (Ogunwande *et al.*, 2007). Ekstrak daun kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack) mempunyai aktivitas paling tinggi sebagai penghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase dan antioksidan dibandingkan ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksan (Arifianti A, 2016). Hal ini sesuai dengan sifat dari flavonoid itu sendiri yaitu bersifat polar.

## B. Daun Kelor

### 1. Sistematika tanaman daun kelor (*Moringa oleifera* L.)

Menurut Integrated Taxonomic Information System (2017),

klasifikasikan tanaman kelor sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Brassicales
Familia	: Moringaceae
Genus	: Moringa
Spesies	: <i>Moringa oleifera</i> L

## 2. Nama daerah

Kelor dikenal di berbagai daerah di Indonesia dengan nama yang berbeda seperti Kelor (Jawa, Sunda, Bali, Lampung), Maronggih (Madura), Moltong (Flores), Keloro (Bugis), Ongge (Bima), dan Hau fo (Timur) (Rusdianto, 2015).

## 3. Deskripsi tanaman

Tanaman kelor memiliki akar tunggang, berwarna putih, biasanya bercabang atau serabut dan dapat mencapai kedalaman 5 –10 meter. Akar ini berguna untuk membantu penyerapan air dalam tanah, serta membantu sebagai penyokong pertumbuhan tanaman kelor. Batang tanaman ini dapat tumbuh mencapai 12 meter, batang tidak terlalu keras, berkulit tipis, permukaan kasar, banyak percabangan dan arah percabangan cenderung tegak atau agak miring dengan pertumbuhan lurus dan memanjang. Daun kelor berbentuk bulat telur, dengan ukuran relatif kecil, daun majemuk, tersusun selang seling, beranak daun gasal, helai daun berwarna hijau muda dan biasanya digunakan sebagai obat tradisional. Bunga kelor berwarna putih kekuning-kuningan dan memiliki pelepah bunga berwarna hijau. Buah kelor berbentuk segitiga memanjang berkisar antara 20 cm hingga 60 cm, sering disebut juga sebagai kelentang dan berwarna hijau muda hingga kecoklatan. Biji kelor berbentuk bulat dan berwarna coklat kehitaman. Dalam satu biji ini akan terdapat beberapa (10 sampai dengan 20 biji) butir dalam buah (Leone *et al.*, 2015).

Di Indonesia tanaman kelor dikenal dengan nama yang berbeda di setiap daerah, di antaranya kelor (Jawa, Sunda, Bali, Lampung), maronggih (Madura), moltong (Flores), keloro (Bugis), ongge (Bima), murong atau barunggai (Sumatera) dan hau fo (Timur) (Rusdianto, 2015). Kelor merupakan spesies dari keluarga monogenerik yang paling banyak dibudidayakan, yaitu Moringaceae yang berasal dari

India sub-Himalaya, Pakistan, Bangladesh dan Afghanistan. Pohon yang tumbuh dengan cepat ini telah digunakan sejak zaman dulu oleh orang Romawi kuno, Yunani dan Mesir dan sampai saat ini banyak dibudidayakan dan telah menjadi tanaman naturalisasi di daerah tropis (Fahey, 2005).

#### **4. Kandungan dan aktivitas farmakologi**

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Umar *et al.* (2011) ekstrak *Moringa oleifera* memberikan penurunan berat badan dan penurunan glukosa darah 15 mg/dL pada kelompok yang diberi perlakuan kulit batang *Moringa oleifera*. Penelitian tersebut juga menunjukkan adanya fitokimia seperti alkaloid, flavonoid, glikosida, tanin dan steroid, yang bertanggung jawab atas efek hipoglikemiknya. Analisis kromatografi cair kinerja tinggi juga menunjukkan adanya asam fenolik (Gallic, ellagic, chlorogenic dan ferulic acid) dan flavonoid: kaempferol, quercetin, isoquercetin, astragalin dan rutin (Vongsak *et al.*, 2012). Quercetin dan kaempferol, dalam bentuk 3-O-glikosida adalah flavonol yang dominan dalam daun kelor. Daunnya juga mengandung niazirin, niazirinin, 4-[(4'-O-acetyl-L-rhamnosyloxy) benzyl] isothiocyanate, niaziminin A dan B, quercetin-3-O-(6"-malonylglucoside), kaempferol-3-O-glucoside dan kaempferol-3-O-(6"-malonil-glukosida), 3-caffeoylquinic dan 5-caffeoylquinic acid. Dilaporkan juga bahwa daunnya memiliki jumlah karotenoid, epikatekin, dan asam o-kumarat (Zhang *et al.*, 2011).

Daun kelor diketahui memiliki kandungan flavonoid kuersetin. Menurut Lako *et al.*, (2007), kuersetin pada daun kelor yaitu sebesar 100 mg/100 g daun kelor. Terutama sebagai quercetin-3-O- $\beta$ -d-glucoside yang juga dikenal sebagai isoquercitrin atau isotrifolin. Kuersetin termasuk antioksidan kuat dan dapat digunakan sebagai antidiabetes (Zhang *et al.*, 2011). Kuersetin menunjukkan efek antidislipidemia, hipotensi, dan antidiabetes pada model tikus Zucker obesitas sindrom metabolik. Kuersetin bekerja dengan cara melindungi sel  $\beta$  pankreas penghasil insulin dari stres oksidatif yang diinduksi STZ dan apoptosis pada tikus (Rivera *et al.*, 2008). Kuersetin juga telah terbukti mengaktifkan adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), untuk meningkatkan ambilan glukosa melalui stimulasi GLUT4 di otot rangka, dan untuk menurunkan produksi glukosa melalui downregulasi fosfoenolpiruvat karboksikinase (PEPCK) dan glukosa-6 fosfatase (G-6-Pase) di hati (eid *et al.*, 2015).

Menurut Adisakwattana *et al.*, (2011), ekstrak daun kelor telah terbukti menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase,  $\alpha$ -amilase pankreas, dan sukrosa usus sehingga berkontribusi terhadap sifat antihiperqlikemik. Efek penghambatan ini dimungkinkan berkat tanin yang terdapat pada daun kelor. Keterlambatan dalam pencernaan karbohidrat yang disebabkan oleh penghambatan enzim-enzim ini, menyebabkan penurunan hiperglikemia post-prandial dan hemoglobin A1C (HbA1C).

Kandungan senyawa lain yang terdapat pada daun kelor adalah alkaloid. Alkaloid moringinine awalnya dimurnikan dari kulit akar daun kelor (Ghosh *et al.*, 1935) dan kemudian diidentifikasi secara kimia sebagai benzilamine (Chakravarti, 1955). Senyawa ini diduga memediasi efek hipoglikemik tanaman. Sebuah studi awal menunjukkan bahwa tikus Wistar yang diberi air minum yang mengandung 2,9 g/L benzilamine selama 7 minggu menunjukkan penurunan respon hiperglikemik dalam tes toleransi glukosa intraperitoneal (IPGTT), menunjukkan peningkatan toleransi glukosa (Bour *et al.*, 2005).

**4.1 Aktivitas antioksidan daun kelor.** Kuersetin pada daun kelor (*Moringa oleifera* L) memiliki aktivitas antioksidan yang dimungkinkan oleh komponen fenoliknya yang sangat reaktif. Kuersetin akan mengikat spesies radikal bebas sehingga dapat mengurangi reaktivitas radikal bebas tersebut. Molekul flavanol merupakan salah satu jenis flavonoid yang aktif sebagai antioksidan. Kuersetin sebagai antioksidan dapat mencegah terjadinya oksidasi melalui dua fase. Pada fase pertama, kuersetin mampu menstabilkan radikal bebas yang dibentuk oleh senyawa karsinogen seperti radikal oksigen, peroksida dan superoksida. Kuersetin menstabilkan senyawa-senyawa tersebut melalui reaksi hidrogenasi maupun pembentukan kompleks (Duo *et al.*, 2012). Pada fase lainnya, kuersetin mencegah autooksidasi, yaitu mencegah pembentukan radikal peroksida melalui pengikatan senyawa radikal secara cepat agar tidak berikatan dengan oksigen. Dengan adanya kuersetin maka reaksi oksigenasi yang berjalan secara cepat dapat di cegah sehingga pembentukan radikal peroksida pun dapat dicegah. Kuersetin juga berikatan dengan radikal peroksida yang telah terbentuk dan menstabilkannya sehingga reaksi autooksidasi yang secara cepat dan berantai dapat dihambat (Kim *et al.*, 2014).

Kaempferol dapat menambah antioksidan tubuh yang merupakan pertahanan terhadap radikal bebas. Pada tingkat molekuler,



kaempferol telah dilaporkan untuk memodulasi sejumlah elemen kunci dalam transduksi sinyal seluler jalur terkait dengan apoptosis, angiogenesis, peradangan, dan metastasis. Kaempferol dan myricetin menghambat sinyal transduksi, seperti *protein tyrosine kinase* (PTK), *protein kinase C* (PKC) dan *phosphoinositide 3 kinase* (PIP) (Chen A & Chen Y, 2013).

**4.2 Aktivitas antidiabetes daun kelor.** Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.) telah terbukti menghambat aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase, enzim  $\alpha$ -amilase pankreas, dan sukrosa usus. Efek penghambatan ini dimungkinkan berkat kuersetin dan kaempferol yang terdapat pada daun kelor (*Moringa oleifera* L) (Adisakwattana & Chanathong, 2011). Efek penghambatan flavonoid, termasuk quercetin dan kaempferol, telah dijelaskan secara biokimia karena peningkatan jumlah gugus hidroksil pada cincin B, dan adanya ikatan rangkap 2,3 (Taedara *et al.*, 2006). Selain itu, senyawa ini telah dipelajari mengenai sifat protektif dan regeneratif pada sel beta pankreas, meningkatkan produksi dan pelepasan insulin. Quercetin menginduksi sekresi insulin melalui fosforilasi jalur ekstraseluler signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) bersama-sama dengan perlindungan sel beta pankreas terhadap kerusakan oksidatif (Youl *et al.*, 2010).

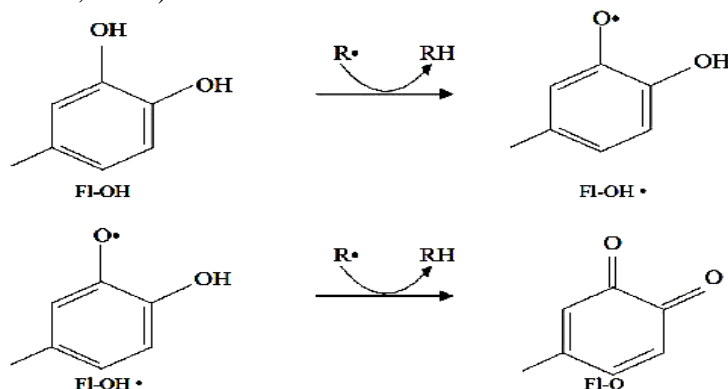
Pada penelitian yang dilakukan oleh Gupta *et al.*, (2012), ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera* L.) 150 dan 300 mg/Kg BB, peroral selama 21 hari pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan mampu menurunkan kadar glukosa dengan mengurangi masuknya glukosa ke mitokondria dan mengurangi pelepasan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan memajukan produk akhir terglifikasi (AGEs) yang dapat meningkatkan sel adhesi dan inflamasi pada pasien diabetes. Menurut Tang *et al.*, (2011) kuersetin bekerja dengan menurunkan persentase sel fase G(0)/G(1), ekspresi Smad 2/3, laminin dan kolagen tipe IV dan level mRNA TGF- $\beta$ (1), serta mengaktifkan Akt/cAM dan jalur protein pengikat elemen. Sedangkan kaempferol bekerja dengan meningkatkan sensitivitas insulin dan memperbaiki sel  $\beta$ -pankreas (Alkhalidy *et al.*, 2015).

### C. Antioksidan

Senyawa antioksidan berperan penting sebagai faktor pelindung kesehatan. Sifat utama antioksidan adalah kemampuannya untuk menjebak dan menstabilkan radikal bebas (Prakash, 2001). Senyawa antioksidan mampu menghambat oksidasi lipid atau molekul lain

dengan cara menghambat inisiasi atau propagasi reaksi berantai oksidatif, sehingga senyawa tersebut dapat mencegah kerusakan sel. Aktivitas antioksidan disebabkan karena adanya senyawa-senyawa fenol. Menurut Nakiboglu *et al.*, (2007) kemampuan penangkapan radikal bebas DPPH sangat dipengaruhi oleh gugus OH yang terdapat dalam senyawa fenol. Secara umum kekuatan senyawa fenol sebagai antioksidan tergantung dari beberapa faktor seperti ikatan gugus hidroksil pada cincin aromatik, posisi ikatan, posisi hidroksil bolak balik pada cincin aromatik dan kemampuannya dalam memberi donor hidrogen atau elektron. Ada hubungan antara kemampuan senyawa fenol sebagai antioksidan dan struktur kimianya. Konfigurasi dan total gugus hidroksil merupakan dasar yang sangat mempengaruhi mekanisme aktivitasnya sebagai antioksidan. Semakin banyak gugus hidroksil yang tersubstitusi dalam molekul maka kemampuan penangkapan radikal bebasnya semakin kuat karena semakin banyak atom hidrogen yang dapat didonorkan (Yu Lin dkk. 2009).

Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang dapat menghambat banyak reaksi oksidasi. Flavonoid memiliki kemampuan sebagai antioksidan karena mampu mentransfer sebuah elektron kepada senyawa radikal bebas, dimana  $R\cdot$  merupakan senyawa radikal bebas, Fl-OH merupakan senyawa flavonoid sedangkan Fl-OH $\cdot$  merupakan radikal flavonoid. Sifat antioksidan dari flavonoid berasal dari kemampuan untuk mentransfer sebuah elektron ke senyawa radikal bebas dan juga membentuk kompleks dengan logam. Kedua mekanisme itu membuat flavonoid memiliki beberapa efek, diantaranya menghambat peroksidasi lipid, menekan kerusakan jaringan oleh radikal bebas dan menghambat aktivitas beberapa enzim (Kandaswami dan midelton, 1997).



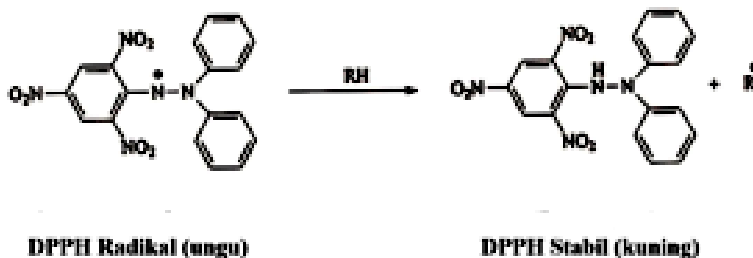
Gambar 1. Mekanisme Peredaman Radikal oleh Flavonoid (Kandaswami dan midelton, 1997).

## 1. Antioksidan secara In Vitro

Uji antioksidan secara *in vitro* memiliki manfaat tidak hanya sekedar mengukur komponen antioksidan tetapi juga memberikan ukuran keefektifan antioksidan tersebut (Badarinath *et al.*, 2010). Uji antioksidan *in vitro* relatif mudah dilakukan dan lebih murah dibandingkan dengan model pengujian lainnya (Alam *et al.*, 2013).

**1.1 DPPH scavenging activity.** Molekul 1, 1-difenil-2-pikrilhidrazil ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -difenil- $\beta$ -pikrilhidrazil; DPPH) dicirikan sebagai radikal bebas yang stabil berdasarkan delokalisasi elektron cadangan di atas molekul secara keseluruhan, sehingga molekul tidak dimerisasi, seperti yang terjadi pada kebanyakan radikal bebas lainnya. Delokalisasi elektron juga menimbulkan warna ungu tua, ditandai dengan pita serapan dalam larutan etanol yang berpusat pada sekitar 517 nm. Ketika larutan DPPH dicampur dengan substrat (AH) yang dapat menyumbangkan atom hidrogen, akan menimbulkan bentuk tereduksi dengan hilangnya warna ungu. Persentase penangkal radikal DPPH dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

Aktivitas tersebut dinyatakan sebagai konsentrasi penghambatan IC50, yaitu jumlah antioksidan yang diperlukan untuk menurunkan 50% konsentrasi DPPH awal. Semakin rendah IC50, semakin tinggi efisiensi antioksidan (Choi *et al.*, 2002).



Gambar 2. Mekanisme uji DPPH (Jagetia *et al.*, 2003)

**1.2 Hydrogen peroxide scavenging (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) assay.** Hidrogen peroksida dapat masuk ke dalam tubuh manusia melalui inhalasi uap atau kabut dan melalui kontak mata atau kulit. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan cepat terurai menjadi oksigen dan air dan ini dapat menghasilkan radikal hidroksil (OH<sup>•</sup>) yang dapat memulai peroksidasi lipid dan menyebabkan kerusakan DNA dalam tubuh. Metode ini melibatkan pembentukan radikal hidroksil secara *in-vitro* menggunakan sistem Fe<sup>3+</sup>/askorbat/EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menggunakan reaksi Fenton. Pemulungan

radikal hidroksil ini dengan adanya antioksidan diukur. Dalam salah satu metode radikal hidroksil yang dibentuk oleh oksidasi dibuat untuk bereaksi dengan DMSO (dimetil sulfoksida) untuk menghasilkan formaldehida. Formaldehida yang terbentuk menghasilkan warna kuning pekat dengan reagen Nash (2 M amonium asetat dengan 0,05 M asam asetat dan 0,02 M asetil aseton dalam air suling). Intensitas warna kuning yang terbentuk diukur secara spektrofotometri 412 nm terhadap blanko reagen. Aktivitas ini dinyatakan sebagai % hidroksil radikal scavenging.

**1.3 Nitric oxide scavenging activity.** Senyawa natrium nitroprusida diketahui terurai dalam larutan berair pada pH fisiologis (7,2) menghasilkan NO. Dalam kondisi aerobik, NO bereaksi dengan oksigen untuk menghasilkan produk yang stabil (nitrat dan nitrit), yang jumlahnya dapat ditentukan dengan menggunakan reagen *Griess* (Marcocci *et al.*, 1994). Metode ini didasarkan pada penghambatan radikal oksida nitrat yang dihasilkan dari natrium nitroprusside dalam buffer saline dan diukur dengan reagen *Griess*, reaksi *Griess* sering digunakan untuk penilaian produksi NO<sup>•</sup> oleh seluruh sel atau enzim. Penerapannya pada penentuan *in vitro* kapasitas pemulungan NO<sup>•</sup> juga sering dilakukan. Dalam hal ini, oksida nitrat yang tersisa setelah reaksi dengan sampel uji diukur sebagai nitrit (Hevel dan Marleta, 1994).

**1.4 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) method/ ABTS radical cation decolorization assay.** Metode ini, menggunakan spektrofotometer array dioda untuk mengukur hilangnya warna ketika antioksidan ditambahkan ke kromofor biru-hijau ABTS<sup>+</sup> (2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)). Antioksidan mereduksi ABTS<sup>+</sup> menjadi ABTS dan menghilangkan warna. ABTS<sup>+</sup> adalah radikal stabil yang tidak ditemukan dalam tubuh manusia. Aktivitas antioksidan dapat diukur seperti yang dijelaskan oleh Seeram *et al.* (2006). Kation radikal ABTS dibuat dengan menambahkan mangan dioksida padat (80 mg) ke dalam larutan stok berair ABTS 5 mM (20 mL menggunakan buffer 75 mM Na/K pH 7). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), analog vitamin E yang larut dalam air, dapat digunakan sebagai standar antioksidan. Kurva kalibrasi standar dibuat untuk Trolox pada konsentrasi 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, dan 350  $\mu$ M.

**1.5 Ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assay.** Metode ini mengukur kemampuan antioksidan untuk mereduksi *ferric iron*. Hal ini didasarkan pada reduksi kompleks *ferric iron* dan 2,3,5-trifenil-1,3,4-triaza-2-azoniacyclopenta-1,4-diena klorida (TPTZ) menjadi bentuk besi pada pH rendah. Pengurangan ini dipantau dengan mengukur perubahan penyerapan pada 593 nm, menggunakan spektrofotometer dioda-array. Uji antioksidan dapat dilakukan dengan metode yang dikembangkan oleh Benzie dan Strain (1999). Tiga mililiter reagen FRAP yang disiapkan dicampur dengan 100  $\mu$ L sampel yang diencerkan; absorbansi pada 593 nm dicatat setelah inkubasi 30 menit pada suhu 37<sup>o</sup> C. Nilai FRAP dapat diperoleh dengan membandingkan perubahan penyerapan dalam campuran uji dengan yang diperoleh dari peningkatan konsentrasi Fe<sup>3+</sup> dan dinyatakan sebagai mM setara Fe<sup>2+</sup> per kg (makanan padat) atau per L (minuman) sampel.

**1.6 DMPD (*N,N*-dimethyl-*p*-phenylene diamine dihydrochloride) method.** Pengujian ini didasarkan pada reduksi larutan buffer DMPD berwarna dalam buffer asetat dan besi klorida. Prosedur ini melibatkan pengukuran penurunan absorbansi DMPD dengan adanya *scavenger* pada serapannya maksimum 505 nm. Aktivitas tersebut dinyatakan sebagai persentase pengurangan DMPD. Menurut Fogliano *et al.*, (1999) radikal diperoleh dengan mencampurkan 1 mL larutan DMPD (200 mM), 0,4 mL besi klorida (III) (0,05 M), dan 100 mL larutan buffer natrium asetat pada 0,1 M, memodifikasi pH menjadi 5,25. Campuran reaktif harus disimpan dalam kegelapan, di bawah pendingin, dan pada suhu rendah (4–5<sup>o</sup> C). Reaksi terjadi ketika 50  $\mu$ L sampel (pengenceran 1:10 dalam air) ditambahkan ke 950  $\mu$ L larutan DMPD+. Absorbansi diukur setelah 10 menit pengadukan terus menerus, yang merupakan waktu yang dibutuhkan untuk mencapai nilai penghilangan warna yang konstan. Hasilnya dikuantifikasi dalam mM Trolox pada kurva kalibrasi yang relevan.

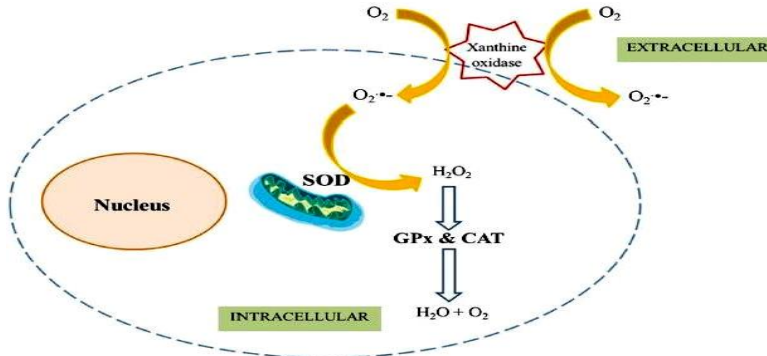
## 2. Antioksidan secara *In Vivo*

Enzim antioksidan atau antioksidan endogenous enzimatik adalah antioksidan yang diproduksi oleh tubuh manusia sebagai penangkal radikal bebas eksogen maupun radikal bebas endogen seperti : superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT) dan glutathion

peroksidase (GPx). Antioksidan enzimatis disebut juga antioksidan sekunder yaitu antioksidan yang berfungsi menangkap radikal bebas dan menghentikan pembentukan radikal bebas (Sadikin, 2002 ; Murray, 2009).

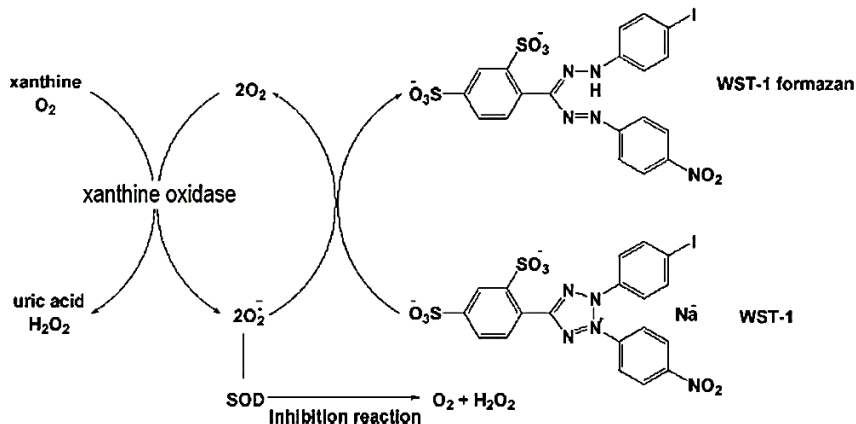
**2.1 *Glutathione peroxidase (GPx) estimation.*** GPx adalah seleno-enzim yang dua pertiganya ada di sitosol (di hati) dan sepertiga di mitokondria. GPx mengkatalisis reaksi hidroperoksida dengan glutathione tereduksi untuk membentuk glutathione disulfide (GSSG) dan produk reduksi hidroperoksida. GPx ditemukan di seluruh jaringan, sebagai empat isoenzim yang berbeda, glutathione peroksidase seluler, glutathione peroksidase ekstraseluler, fosfolipid hidroperoksida glutathione peroksidase dan glutathione peroksidase gastrointestinal. Pengukuran GPx dipertimbangkan secara khusus pada pasien yang mengalami stres oksidatif karena alasan apa pun. Aktivitas rendah enzim ini adalah salah satu konsekuensi awal dari gangguan keseimbangan prooksidan/antioksidan (Paglia dan Valentin, 1967; Yang et al., 1984).

**2.2 *Superoxide dismutase (SOD) method.*** SOD telah dikarakterisasi untuk mengubah radikal bebas oksigen, yang diproduksi oleh xantin oksidase, menjadi oksigen dan hidrogen peroksida. SOD dianggap sebagai pertahanan antioksidan intraseluler utama melawan radikal bebas (Miller, 2013). Subunit SOD terdiri dari struktur dua domain, di mana satu domain terdiri dari  $\alpha$ -heliks dan domain lainnya berisi  $\alpha$ -heliks dan  $\beta$ -sheet (Perry et al., 2010). Beberapa bentuk SOD, yaitu protein oligomer yang mengandung logam dengan kofaktor seperti besi, mangan, atau tembaga dan seng (Harris et al., 2005). Kofaktor ini diperlukan oleh SOD untuk melakukan aktivitas katalitik yang maksimal dalam memetabolisme zat antara toksik. Situs pengikatan logam terletak di antara dua domain SOD dan rantai samping terdiri dari aspartat, histamin, dan histidin (Perry et al., 2010). Kofaktor ini cenderung menyumbangkan elektron ke ROS dan beregenerasi sepanjang mekanisme katalitik.



**Gambar 3.** Mekanisme SOD menangkap radikal bebas oksigen melalui siklus oksidasi/reduksi (Perry et al., 2010)

Pengukuran aktivitas enzim SOD dilakukan dengan metode enzimatik menggunakan reagen kit *SOD Activity Assay*. Menurut Widowati, (2005) reaksi yang terjadi saat sampel direaksikan dengan reagen kit, WST-1 (*Water Soluble Tetrazolium*) atau dalam struktur kimia (*2-(4-iodophenyl-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfo-phenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt*) yang menghasilkan pewarna formazan. Nilai reduksi WST-1 dari anion superoksida berhubungan linier dengan aktivitas xantin oksidase dan aktivitas tersebut dihambat oleh SOD. Radikal bebas atau superoksida yang dihasilkan akan bereaksi dengan WST-1 sehingga menghasilkan pewarna WST-1 formazan yang berwarna biru-ungu. Di sisi lain pula SOD mendismutase superoksida yang akan menghambat reduksi WST-1 menjadi WST-1 formazan. SOD berlomba dengan WST-1 untuk bereaksi dengan superoksida sehingga menghambat pembentukan zat warna. Aktivitas SOD diukur melalui derajat penghambatan (inhibisi) pembentukan zat warna pada panjang gelombang 450 nm



**Gambar 4.** Mekanisme reaksi hambat SOD (Widowati, 2005)

#### D. Stres Oksidatif

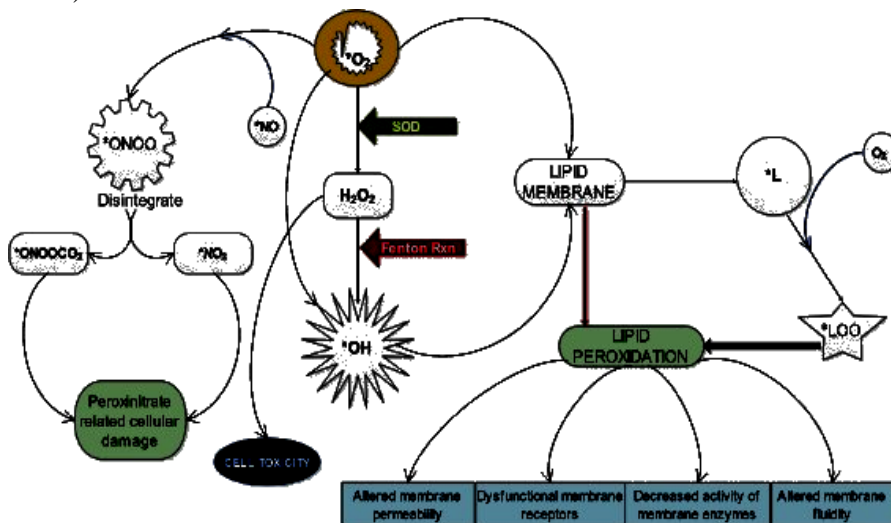
Stres oksidatif adalah suatu kondisi yang disebabkan oleh adanya peningkatan produksi radikal bebas atau berkurangnya aktivitas pertahanan antioksidan atau keduanya. Dalam kaitan dengan kondisi ini dikenal dengan istilah *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) (Oyenihi, 2015). Senyawa tersebut ada yang bersifat radikal bebas dan ada yang dikatakan sebagai senyawa non-radikal. Disebut dengan radikal bebas apabila terdiri dari molekul yang tidak stabil dan bersifat reaktif sehingga dapat menyerang makromolekul lain seperti lipid, karbohidrat, protein dan asam nukleat. Hal ini mengakibatkan stres oksidatif dalam spektrum luas baik dalam mekanisme molekuler maupun seluler dari berbagai penyakit yang ditemukan pada manusia (Bajaj dan Khan, 2012).

*Reactive oxygen species* (ROS) menginduksi stres oksidatif yang memainkan peran patologis dalam perkembangan komplikasi diabetes. Studi dan bukti klinis telah menunjukkan bahwa generasi *Reactive oxygen species* (ROS) meningkat pada kedua jenis diabetes dan bahwa onset diabetes terkait erat dengan stres oksidatif terutama melalui oksidasi, glikasi protein nonenzimatik dan degradasi oksidatif protein terglykasi (Johansen *et al.*, 2005). Peningkatan *Reactive oxygen species* (ROS) seperti superoksida pada mitokondria dalam sel endotel dan stres retikulum endoplasma diikuti dengan berkurangnya mekanisme pertahanan antioksidan, dan peroksidasi lipid memicu kerusakan seluler dan enzim yang selanjutnya mengarah pada resistensi insulin dan hiperglikemia (Halliwell dan Gutteridge, 1990). Status stres oksidatif yang terus meningkat menghabiskan antioksidan endogen seperti superoksida dismutase (SOD) dan glutathione peroxidase (GPx) (Jimenez *et al.*, 2018). Kondisi stres oksidatif yang diinduksi hiperglikemia pada diabetes melitus biasa dikaitkan dengan peningkatan apoptosis sel endotel secara *in vitro* dan *in vivo* yang dibuktikan dengan berbagai penelitian yang menunjukkan adanya peningkatan pembentukan radikal bebas dan penurunan kapasitas antioksidan (Rambhade *et al.*, 2010). Mekanisme ROS dalam membuat kerusakan jaringan pada kondisi hiperglikemia dipercepat dengan empat mekanisme molekuler penting yaitu aktivasi protein kinase C (PKC), peningkatan jalur heksosamin, peningkatan produk akhir glikasi (AGE), dan peningkatan jalur poliol (Ceriello dan Testa, 2009).

Kondisi hiperglikemia akan merangsang over produksi



superoksida pada mitokondria dan overproduksi *nitric oxide* (NO), dimana keduanya dapat menginduksi *nitric oxide synthase* (iNOS) dan *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS). Protein kinase C (PKC) and NF- $\kappa$ B juga diaktifasi dan mendukung overekspresi dari enzim NAD(P)H. Selanjutnya, NAD(P)H akan menghasilkan sejumlah besar superoksida. Produksi superoksida berlebih yang disertai dengan peningkatan NO akan mendukung terbentuknya oksidan peroksinitrit yang kuat, yang dapat merusak DNA. Adanya kerusakan pada DNA ini selanjutnya akan menstimulus aktifasi dari enzim polinuklear polimerase (PARP) sehingga terjadi penurunan aktifitas *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) dan menghasilkan disfungsi endotel yang pada gilirannya akan menyebabkan komplikasi pada diabetes melitus (Ceriello dan Testa, 2009).



Gambar 5. Mekanisme reaksi stres oksidatif (Lobo et al., 2010)

## E. Diabetes Melitus

Diabetes mellitus adalah gangguan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia, glikosuria, hiperlipidemia, keseimbangan nitrogen negatif dan beberapa kasus terdapat ketonemia. Hiperglikemia dan/atau hiperlipidemia dapat merangsang pembentukan *Reactive oxygen species* (ROS) pada diabetes mellitus (Zheng et al., 2020). Status stres oksidatif yang terus meningkat menghabiskan antioksidan endogen seperti superoksida dismutase (SOD) dan glutathione peroxidase (GPx) (Jimenez et al., 2018). Diabetes mellitus ditandai

dengan hiperglikemia karena defisiensi insulin yang absolut maupun relatif. Kurangnya hormon insulin dalam tubuh yang dikeluarkan dari sel  $\beta$  pankreas mempengaruhi metabolisme karbohidrat, protein, dan lemak menyebabkan gangguan signifikan. Kadar glukosa darah erat diatur oleh insulin sebagai regulator utama perantara metabolisme. Hati sebagai organ utama dalam transport glukosa yang menyimpan glukosa sebagai glikogen dan kemudian dirilis ke jaringan perifer ketika dibutuhkan (American Diabetes Association, 2012).

Berdasarkan patofisiologinya diabetes mellitus terbagi menjadi 2 kategori yaitu sebagai berikut: tipe I atau *Insulin dependent diabetes mellitus* (IDDM) dan tipe II atau *Non-insulin dependent diabetes mellitus* (NIDDM). Pada patofisiologi diabetes mellitus tipe 1 (NIDDM), yang terjadi adalah tidak adanya insulin yang dikeluarkan oleh sel  $\beta$  pankreas yang terletak di belakang lambung. Dengan tidak adanya insulin, glukosa dalam darah tidak dapat masuk ke dalam sel untuk dirubah menjadi tenaga. Karena tidak bisa diserap oleh insulin, glukosa ini terjebak dalam darah dan kadar glukosa dalam darah menjadi naik (Homenta, 2012). Diabetes melitus tipe 2 (IDDM) sebanyak 90% kasus diabetes dan biasanya ditandai dengan kombinasi resistensi insulin dan defisiensi insulin. Resistensi insulin dimanifestasikan oleh peningkatan lipolysis dan produksi asam lemak bebas, peningkatan produksi glukosa hepatic, dan penurunan serapan otot rangka glukosa. Sel  $\beta$  mengalami disfungsi progresif dan menyebabkan memburuknya kontrol glukosa darah. Diabetes mellitus tipe 2 (IDDM) terjadi ketika gaya hidup *diabetogenic* (kalori yang berlebihan, olahraga tidak memadai, dan obesitas) ditumpangkan di atas rentan genotip. Pada DM tipe 2 terjadi gangguan pengikatan glukosa oleh reseptornya tetapi produksi insulin masih dalam batas normal sehingga penderita tidak tergantung pada pemberian insulin (Dipiro *etal.*, 2015).

## **1. Terapi farmakologi**

Tujuan terapi DM tentunya untuk mengurangi risiko komplikasi jangka pendek dan jangka panjang. Terapi farmakologi diberikan bersama dengan pengaturan makan dan gaya hidup sehat. Terapi farmakologi terdiri dari obat oral dan bentuk suntikan (insulin) (Perkeni, 2012).

**1.1 Insulin.** Mekanisme dari insulin yaitu dengan menurunkan kadar gula darah dengan menstimulasi pengambilan glukosa parifer dan

menghambat produksi glukosa hepatic. Insulin diindikasikan untuk penderita diabetes mellitus tipe I, diabetes mellitus tipe II yang gula darahnya tidak dapat dikendalikan dengan diet dan antidiabetik oral, diabetes mellitus dengan berat badan penderita yang mengalami penurunan cepat, diabetes mellitus dengan komplikasi akut dan diabetes mellitus dengan kehamilan (Iskandar *et al.*, 2008).

**1.2 Penghambat  $\alpha$ -glukosidase.** Pada proses pencernaan, karbohidrat kompleks akan dicerna oleh berbagai enzim pencernaan yang terdapat pada usus halus, termasuk enzim  $\alpha$ -glukosidase yang merupakan enzim karbohidrolase yang bekerja mengkatalis pelepasan  $\alpha$ -glukosa (Zhang *et al.*, 2007). Glukosa yang dilepas tersebut nantinya akan diabsorpsi pada lumen usus dan masuk ke dalam sirkulasi darah sehingga dapat menyebabkan hiperglikemia *postprandial* dan berujung pada diabetes mellitus tipe II (Luo *et al.*, 2012). Penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase merupakan salah satu pendekatan terapeutik untuk menurunkan kadar glukosa darah *postprandial* (Manaharan *et al.*, 2011) karena dengan dihambatnya kerja enzim  $\alpha$ -glukosidase, maka dapat menunda penguraian oligosakarida dan disakarida menjadi monosakarida (Shinde *et al.*, 2008).

Obat antidiabetes oral yang termasuk golongan penghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase antara lain adalah akarbose, miglitol dan voglibose. Akarbose berupa serbuk berwarna putih atau putih kekuningan yang higroskopis, dengan berat molekul 646 dan sangat larut dalam air. Rumus empirik akarbose adalah  $C_{25}H_{43}NO_{18}$  (British Pharmacopoeia Commission, 2009). Penggunaan akarbose sebagai antihiperglikemia oral dimulai dengan dosis 25 mg satu kali sehari, kemudian ditingkatkan menjadi 50 mg tiga kali sehari dan dapat ditingkatkan menjadi 100 mg tiga kali sehari jika diperlukan. Peningkatan dosis secara bertahap tersebut dapat dilakukan sampai dosis maksimum 200 mg tiga kali sehari (Sweetman, 2009). Pemberiaan obat diberikan bersama dengan makanan untuk mencapai efek yang maksimal.

**1.3 Sulfonilurea.** Golongan sulfonilurea mempunyai mekanisme kerja yang sangat kompleks yaitu merangsang fungsi sel beta dan meningkatkan sekresi insulin serta memperbaiki kerja perifer dari insulin sehingga dengan demikian golongan sulfonilurea berguna dalam penatalaksanaan pasien diabetes melitus tipe 2 dimana pankreasnya masih mampu memproduksi insulin. Penggunaan

golongan sulfonilurea dapat menyebabkan hipoglikemi, sehingga pengobatan dengan golongan ini dianjurkan dimulai dengan dosis rendah (Arifin *et al*, 2008). Obat- obat golongan sulfonilurea diantaranya ialah klorpropamid, glikazid, glibenklamid, glipizid, glikuidon, glimepiride, tolbutamide (Iskandar, *et al* 2008).

Glibenklamid merupakan senyawa golongan sulfonilurea generasi ke dua. Glibenklamid digunakan sebagai obat antidiabetes oral yang merupakan pilihan pengobatan awal untuk diabetes melitus type 2 pada pasien dengan hiperglikemia yang tidak dapat dikontrol hanya dengan makanan. Glibenklamid bekerja dengan cara menurunkan konsentrasi glukosa darah. Glibenklamid merupakan Obat Hipoglikemik Oral (OHO) golongan sulfonilurea yang hanya digunakan untuk mengobati individu dengan DM tipe II (Moore, 1997).

Obat golongan ini menstimulasi sel beta pankreas untuk melepaskan insulin yang tersimpan. Mekanisme kerja obat golongan sulfonilurea dengan cara menstimulasi pelepasan insulin yang tersimpan (*stored insulin*) dan meningkatkan sekresi insulin akibat rangsangan glukosa (Soegondo, 2005). Efek samping OHO golongan sulfonilurea umumnya ringan dan frekuensinya rendah, antara lain gangguan saluran cerna dan gangguan susunan syaraf pusat (Soegondo, 2005). Kontra indikasi pada obat golongan sulfonilurea diantaranya adalah gangguan fungsi ginjal dan hati, wanita hamil, wanita menyusui (IONI, 2000).

Dosis umum pemakaian glibenklamid adalah 2,5 mg sampai dengan 5 mg dalam sehari. Dosis akan dinaikkan atau diturunkan sesuai dengan respon tubuh terhadap obat (ISO, 2017). Menurut Tjay & Raharja (2002) Pengobatan dengan glibenklamid diberikan dengan dosis 5 mg diberikan pada pagi hari, sedangkan profil mingguan glukosa serum dipantau. Dosis permulaan 1 kali sehari 5 mg, bilaperlu dinaikkan setiap minggu sampai maksimal 2 kali sehari 10 mg.

## **2. Uji diabetogenik**

Menurut Szkudelski (2001), aloksan dan streptozotocin merupakan agen diabetogenik yang cukup memadai untuk digunakan sebagai penginduksi diabetes pada hewan percobaan.

**2.1 *Streptozotosin-Nikotinamid (STZ-NA)*.** Streptozotosin (STZ) merupakan senyawa campuran dari glukosamin-nitrosourea. Induksi diabetes pada percobaan menggunakan STZ mudah untuk dilakukan, penyuntikan STZ menyebabkan degradasi pulau langerhans

sel  $\beta$  pankreas (Abeeleh *et al.*, 2009). STZ secara selektif terakumulasi di dalam sel  $\beta$  pankreas melalui transporter glukosa GLUT2 yang afinitasnya rendah, yang terdapat di dalam membran darah. Mekanisme dari STZ yaitu terjadi perpindahan gugus metil dari STZ menuju molekul DNA, sehingga menyebabkan rantai DNA pada sel  $\beta$  pankreas terputus. Dengan menipisnya energi yang disimpan pada sel menyebabkan kematian pada sel  $\beta$ , sehingga menghambat sintesis proinsulin dan menginduksi terjadinya keadaan hiperglikemia. STZ menghambat sekresi insulin dan menyebabkan diabetes millitus tipe I (Lenzen, 2008).

Gejala diabetes pada hewan uji dapat terlihat jelas dalam waktu 2-4 hari setelah penyuntikan secara intraperitoneal dengan dosis tunggal. Sitotoksitas dari induksi STZ dapat diringankan dengan nikotinamid. Komponen nikotinamid adenin dinukleotida (NAD) akan menghambat aktivitas sintesis poli (ADP-ribosa) dan mencegah penipisan NAD pada sel  $\beta$  pankreas. Hewan uji yang diabetes setelah diinduksi STZ sebelumnya diberikan nikotinamid menunjukkan hiperglikemia moderat terkait dengan hilangnya sekresi insulin di fase awal *postprandial* dan diperkirakan penurunan 50% kadar insulin di pankreas. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ghasemi (2016), untuk menginduksi diabetes mellitus tipe 2, STZ diberikan secara intraperitoneal dengan dosis 45 mg/KgBB tikus dan nikotinamid (NA) 110 mg/Kg tikus secara intraperitoneal dengan jeda waktu minimal 15 menit.

**2.2 Aloksan.** Suatu substrat yang secara struktural adalah derivat pirimidin sederhana. Nama aloksan diperoleh dari penggabungan kata allantoinin dan oksalurea (asam oksalurik). Nama lain dari aloksan adalah 2,4,5,6- tetraoxypirimidin; 2,4,5,6-pirimidinetetron; 1,3-Diazinan-2,4,5,6-tetron (IUPAC) dan asam Mesoxalylurea 5-oxobarbiturat. Rumus kimia aloksan adalah  $C_4H_2N_2O_4$ . Aloksan murni diperoleh dari oksidasi asam urat oleh asam nitrat. Aloksan adalah senyawa kimia yang tidak stabil dan senyawa hidrofilik. Waktu paruh aloksan pada pH 7,4 dan suhu 37° C adalah 1,5 menit (Lenzen, 2008)

Aloksan dapat diberikan secara intravena, intraperitoneal, atau subkutan pada binatang percobaan. Aloksan bersifat toksik selektif terhadap sel  $\beta$  pankreas yang memproduksi insulin karena terakumulasinya aloksan secara khusus melalui transporter glukosa.

Aloksan bereaksi dengan merusak substansi esensial di dalam sel  $\beta$  pankreas sehingga menyebabkan berkurangnya granula-granula pembawa insulin di dalam sel  $\beta$  pankreas (Szkudelski, 2008). Aloksan merupakan molekul radikal bebas yang merusak sel  $\beta$  pankreas. Aloksan memiliki cara kerja selektif pada sel  $\beta$  pankreas, karena struktur aloksan mirip dengan glukosa. Sel  $\beta$  pankreas memiliki efisiensi tinggi dalam pengambilan glukosa sehingga aloksan memasuki sel tersebut dengan cara yang sama seperti glukosa masuk ke dalam sel  $\beta$  pankreas (Wolf, 2005). Penelitian terhadap mekanisme kerja aloksan secara *in vitro* menunjukkan bahwa aloksan menginduksi pengeluaran ion kalsium dari mitokondria yang mengakibatkan proses oksidasi sel terganggu. Keluarnya ion kalsium dari mitokondria mengakibatkan homeostatis yang merupakan awal dari matinya sel (Suharmiati, 2003). Pembentukan oksigen reaktif diawali dengan proses reduksi aloksan di sel  $\beta$  pankreas. Aloksan mempunyai aktivitas tinggi terhadap senyawa seluler yang mengandung gugus SH, glutathione tereduksi (GSH), sistein dan senyawa sulfhidril terikat protein misalnya SH-containing enzyme (Wilson *et al.*, 1984; Szkudelski, 2001; Walde *et al.*, 2002).

Pembuatan diabetes pada tikus dilakukan dengan menginjeksi aloksan monohidrat 150 mg/KgBB secara intraperitoneal pada tikus. Larutan aloksan dibuat dengan cara melarutkan aloksan monohidrat dengan *aquabidest steril for injection*. Hari pertama kadar glukosa darah tikus diukur sebagai kadar glukosa awal, kemudian tikus diinjeksi aloksan secara intraperitoneal, lalu hari ketiga setelah injeksi aloksan, kadar glukosa darah diukur lagi untuk dibandingkan dengan kadar glukosa pada awal sebelum diberikan injeksi aloksan. Apabila terjadi kenaikan kadar glukosa darah tikus yaitu menjadi  $\pm 200$  mg/dL, maka tikus sudah terjadi diabetes (Yuriska, 2009).

### **3. Metode analisa kadar glukosa darah**

Pemeriksaan kadar glukosa darah bertujuan untuk melakukan skrining atau pemantauan penyakit diabetes mellitus. Akurasi hasil pemeriksaan kadar glukosa darah dipengaruhi oleh banyak faktor, antara lain persiapan pasien yaitu puasa atau tidak, pengumpulan sampel, penyiapan sampel, dan metode pemeriksaan untuk pengukuran kadar glukosa darah (Julitania, 2011). Beberapa jenis pemeriksaan yang berhubungan dengan pemeriksaan glukosa darah yaitu, pemeriksaan kadar glukosa darah puasa (*nuchter*), glukosa darah sewaktu (*random*)

dan Glukosa sesudah makan (*Postprandial*) (Suyono, 2009)

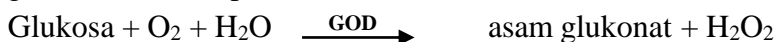
**3.1 Glukometer.** Kadar glukosa darah ditetapkan dengan menggunakan alat Glukometer. Cuplikan darah yang diambil dari vena lateralis ekor tikus dalam jumlah sangat sedikit yang berkisar hanya 1  $\mu$ L disentuhkan dalam test strip, kemudian alat tersebut akan segera mengukur kadar glukosa darah setelah strip terisi oleh darah. Alat ukur kadar gula darah (glucometer) adalah alat ukur kadar gula dalam darah dengan prinsip kerja glukosa pada darah bereaksi dengan enzim yang berada pada strip pengukur kadar gula darah. Reaksi tersebut memunculkan arus listrik yang terhubung dengan alat ukur gula darah, intensitas arus listrik tersebut dikalkulasi sehingga kadar gula darah bisa teridentifikasi (Nugroho, 2021).

**3.2 GLUC-DH (*Glucose Dehidrogenase*).** GLUC-DH adalah sebuah metode rutin enzimatik yang dibedakan dari yang lain oleh kespesifikannya yang tinggi, kepraktisan dan keluwesannya. Pengukuran dilakukan pada daerah UV. Prinsip metode ini adalah glucose dehidrogenase mengkatalisa oksidasi dari glucose menurut persamaan berikut:



Metode Gluc-DH dapat digunakan pada bahan sampel yang dideproteinisasi atau yang tidak dideproteinisasi, serta hemolisate.

**3.3 GOD-PAP.** GOD-PAP merupakan reaksi kolorimetri-enzimatik untuk pengukuran pada daerah cahaya yang terlihat oleh mata. Prinsip glukosa oksidase (GOD) mengkatalisasi oksidasi dari glukosa menurut persamaan berikut :



Hydrogen peroksida yang terbentuk dalam reaksi ini bereaksi dengan 4- aminoantipyrin (4-Hydroxybenzoic acid ), adanya peroksidase (POD) dan membentuk N-(4-antipyril)-P benzoquinone imine. Jumlah zat warna yang terbentuk sebanding dengan konsentrasi glukosa.

## F. Uji Histopatologi

Organ pankreas terdiri atas eksokrin dan endokrin. Bagian sel endokrin membentuk Pulau Langerhans (Tallitsch & Guastaferrri, 2009). Pulau Langerhans dikelilingi oleh jaringan ikat retikulin dan berada tersebar di antara asini, yaitu bagian eksokrin pankreas.

Diameter pulau Langerhans sebesar 0,1-0,2 mm dan di dalamnya berisi ribuan sel. Pulau Langerhans biasanya berbentuk *egg-shaped* dan terdiri atas sel-sel yang berbentuk poligonal atau bulat (Mescher, 2010). Pulau Langerhans tampak lebih pucat dibandingkan dengan area eksokrin karena tidak memiliki granula zimogen. Bagian eksokrin dari pankreas dibagi menjadi beberapa lobus oleh septa jaringan ikat. Lobus tersebut dibagi lagi menjadi beberapa lobulus oleh sedikit jaringan ikat dan tidak memiliki batas yang tegas (Gartner *et al.*, 2012). Bagian eksokrin terdiri atas sel-sel asiner yang berbentuk piramid dan memiliki inti sel di bagian basal. Karakteristik sel asiner adalah sitoplasma dengan sifat basofilik terang pada bagian basal dan asidofilik granula zimogen pada bagian apeks (Mescher, 2010).

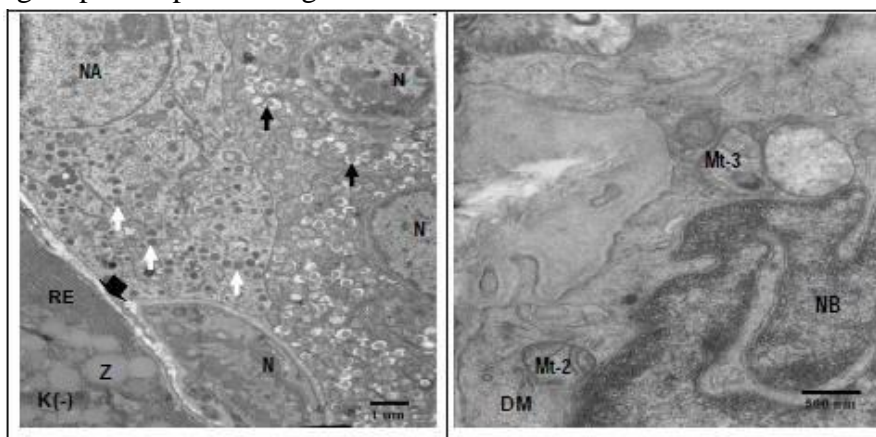
Perubahan histopatologis pulau Langerhans pada penderita diabetes telah dilaporkan sejumlah peneliti. Perubahan ini dapat terjadi baik secara kuantitatif, seperti pengurangan jumlah atau ukuran, maupun secara kualitatif, seperti terjadi nekrosis, degenerasi, dan amyloidosis. Kerusakan sel-sel beta pankreas dapat disebabkan oleh banyak faktor. Faktor tersebut di antaranya faktor genetik, infeksi oleh kuman, faktor nutrisi, zat diabetogenik, dan radikal bebas (stres oksidatif). Diabetes ditandai dengan perubahan progresif pada pulau Langerhans, termasuk perubahan deplesi atau berkurangnya sekretori granula insulin pada sel beta pankreas, lepasnya pertautan sel pulau Langerhans, dan pergantian sel-sel eksokrin oleh jaringan ikat (fibrosis) (Diani *et al.*, 2004). Senyawa aloksan merupakan salah satu zat diabetogenik yang bersifat toksik, terutama terhadap sel beta pankreas, dan apabila diberikan kepada hewan coba seperti tikus dapat menyebabkan hewan coba tikus menjadi diabetes. Menurut Szkudelski (2001), aloksan di dalam tubuh mengalami metabolisme oksidasi reduksi menghasilkan radikal bebas dan radikal aloksan. Radikal ini mengakibatkan kerusakan pada sel beta pankreas. Pada pulau Langerhans terlihat pengurangan jumlah massa sel, beberapa pulau Langerhans mengalami kerusakan, dimana ukuran menjadi lebih kecil bahkan ada yang hancur dan menghilang. Pada tikus dewasa, sebaran sel-sel beta pada pulau Langerhans berada di tengah-tengah, sementara sel-sel lainnya seperti sel alfa, delta, dan sel PP tersebar di bagian perifer (Kim *et al.*, 2007).



**Tabel 1. Skor penilaian kerusakan sel beta pankreas**

Kerusakan pankreas	Pengertian	Nilai skor
Sel normal	Normal tidak ada perubahan dari batas organ P. <i>Langerhans</i> , jumlah sel, nekrotik sel dan bentuk sel	0
Piknosis	Batas jelas, jumlah sel mulai berkurang, nekrotik sel blm terlihat hanya degenerasi sel, bentuk sel normal	1
Karioreksis	Batas mulai tidak jelas, jumlah sel berkurang, degenerasi sel dan bentuk sel ada yang tdk normal	2
Kariolisis	Batas tidak jelas, jumlah sel berkurang, nekrotik sel terlihat dan bentuk sel banyak tidak normal	3

Kondisi morfologi pulau Langerhans pada diabetes tipe 2 secara detail diteliti oleh Deng *et al.* (2004). Hasilnya dilaporkan bahwa pada keadaan normal, jumlah sel beta diperkirakan 65% dan sel alpha 35%. Pada tikus diabetes derajat sedang, ditemukan hampir 67% pulau Langerhans berdiameter kurang dari 150  $\mu\text{m}$ , sedangkan pada tikus normal jumlah pulau Langerhans yang berdiameter lebih dari 150  $\mu\text{m}$  sekitar 50%. Selain terjadi perubahan pada ukuran, dan bentuk juga terjadi fragmentasi pulau Langerhans. Pada kondisi diabetes derajat sedang, jumlah sel beta secara nyata berkurang bahkan pada diabetes parah sel beta tidak ditemukan namun sel alpha masih ditemukan di bagian perifer pulau Langerhans.



RE : retikulum endoplasma  
 NA : nukleus sel alpha  
 NB : nukleus sel beta  
 ND : nukleus sel delta  
 Z : zimogen

Kepala panah: batas sel asinar degan pulau Langerhans  
 Mt-1: mitokondria kehilangan krista

Mt-2: membran mitokondria bocor  
 Mt-3: mitokondria dengan *cristae centralized*  
 NB-1 : inti sel beta piknotis  
 (K-) : kontrol negatif  
 DM : kelompok positif diabetes mellitus  
 Panah hitam : granula sekretori insulin  
 Panah putih : granula sekretori glukagon

**Gambar 6. Sel beta pulau Langerhans pankreas normal dan nekrosis tikus percobaan (Suarsana et al., 2010)**

## G. Ekstraksi

Menurut Departemen Kesehatan RI (2006), ekstraksi adalah proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut dari suatu serbuk simplisia, sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut. Beberapa metode yang banyak digunakan untuk ekstraksi bahan alam antara lain:

### 1. Maserasi

Maserasi adalah terjadinya waktu kontak yang cukup antara pelarut dengan jaringan yang diekstraksi (Guether,1987). Maserasi merupakan cara ekstraksi yang sederhana, pelaksanaannya yaitu dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut. Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif sehingga zat aktif akan larut. Peristiwa tersebut dapat terjadi karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel, sehingga larutan terpekat di desak keluar. Pelarut yang digunakan antara lain: air, etanol, air-etanol, dan lain-lain (Ahmad, 2006).

Keuntungan dari maserasi adalah cara pengerjaan dan pelarut yang digunakan sederhana dan mudah untuk didapatkan (Ahmad, 2006). Proses maserasi dilakukan dengan cara 10 bagian simplisia atau campuran simplisia dengan derajat halus yang cocok dimasukkan ke dalam suatu bejana, kemudian dituangi 75 bagian penyari ditutup dan dibiarkan selama 5 hari untuk memungkinkan berlangsungnya proses melarutnya bahan simplisia. Hindarkan dari paparan sinar matahari sambil berulang-ulang diaduk. Campuran tersebut diperas, dicuci ampasnya dengan cairan penyari sampai mendapat 100 bagian. Maserat dipindah dalam bejana tertutup dan dibiarkan ditempat yang sejuk, terlindung dari cahaya matahari, maserat disaring kemudian disuling pada tekanan rendah pada suhu tidak lebih dari 50°C hingga konsentrasi yang dikehendaki (DepKes, 1986).

### 2. Perkolasi

Perkolasi merupakan proses mengekstraksi senyawa terlarut dari jaringan selular simplisia dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna yang umumnya dilakukan pada suhu ruangan. Perkolasi cukup sesuai, baik untuk ekstraksi pendahuluan maupun dalam jumlah besar (Departemen Kesehatan RI, 2006).

### 3. Soxhlet

Metode ekstraksi *soxhlet* adalah metode ekstraksi dengan prinsip pemanasan dan perendaman sampel. Hal itu menyebabkan terjadinya pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan

tekanan antara di dalam dan di luar sel. Dengan demikian, metabolit sekunder yang ada di dalam sitoplasma akan terlarut ke dalam pelarut organik. Larutan itu kemudian menguap ke atas dan melewati pendingin udara yang akan mengembunkan uap tersebut menjadi tetesan yang akan terkumpul kembali. Bila larutan melewati batas lubang pipa samping soxhlet maka akan terjadi sirkulasi. Sirkulasi yang berulang itulah yang menghasilkan ekstrak yang baik (Departemen Kesehatan RI, 2006).

#### **4. Refluks**

Ekstraksi dengan cara ini pada dasarnya adalah ekstraksi berkesinambungan. Bahan yang akan diekstraksi direndam dengan cairan penyari dalam labu alas bulat yang dilengkapi dengan alat pendingin tegak, lalu dipanaskan sampai mendidih. Cairan penyari akan menguap, uap tersebut akan diembunkan dengan pendingin tegak dan akan kembali menyari zat aktif dalam simplisia tersebut. Ekstraksi ini biasanya dilakukan 3 kali dan setiap kali diekstraksi selama 4 jam (Departemen Kesehatan RI, 2006).

### **H. Cairan Penyari atau Pelarut**

Pemilihan cairan penyari harus mempertimbangkan banyak faktor. Cairan penyari yang baik harus memenuhi kriteria yaitu: selektivitas, kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut, ekonomis, ramah lingkungan, keamanan (Kementrian Kesehatan RI, 2000). Cairan penyari yang aman digunakan adalah air, etanol, etanol-air atau eter (Kementrian Kesehatan RI, 1986).

Etanol merupakan golongan alkohol dengan jumlah atom karbon dua dan mempunyai nilai kepolaran 0,68 (Ashurst, 1995). Keuntungan penggunaan etanol sebagai pelarut adalah mempunyai titik didih yang rendah sehingga lebih mudah menguap, oleh karena itu, jumlah etanol yang tertinggal di dalam ekstrak sangat sedikit. Etanol dipertimbangkan sebagai penyari karena lebih selektif, mikrobia sulit tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun, netral, absorpsinya baik, etanol dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kurkumin kumarin, antraknon, flavonoid, steroid, damar dan klorofil, dengan demikian zat pengganggu yang terlarut hanya sedikit (Kementrian Kesehatan RI, 1986). Etanol tidak menyebabkan pembengkakan

membran sel dan memperbaiki stabilitas bahan obat terlarut. Keuntungan lain dari etanol mampu mengendapkan albumin dan menghambat kerja enzim. Etanol (70%) sangat efektif dalam menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal, dimana bahan pengganggu hanya skala kecil yang turun ke dalam cairan pengekstraksi (Kementrian Kesehatan RI, 1986).

## **I. Hewan Uji**

### **1. Sistematika hewan uji**

Sistematika tikus putih jantan galur wistar menurut Sugiyanto (1995) adalah sebagai berikut:

Filum	: Chordata
Sub filum	: Verterbrta
Classis	: Mamalia
Sub classis	: placentalia
Ordo	: Rodentia
Familia	: Muridae
Genus	: Rattus
Species	: <i>Rattus norvegicus</i>

### **2. Karakteristik utama tikus putih**

Tikus putih merupakan hewan yang cerdas dan relative resisten terhadap infeksi. Pada umumnya tikus tenang dan mudah untuk dikendalikan, tidak terlalu bersifat fotofobik seperti mencit. Kecenderungan untuk berkumpul dengan jenisnya tidak terlalu besar sehingga dapat ditinggal di kandang sendiri asalkan dapat melihat dan mendengar tikus lain. Tikus yang dibiakkan di laboratorium lebih cepat dewasa dan berkembang biak (Smith & Mangkoewidjojo 1988).

### **3. Biologi tikus**

Tikus tumbuh dewasa pada umur 40-60 hari. Berat badan tikus jantan dewasa berkisar 300-400 Gram, sedangkan betina 250-300 Gram (Smith & Mangkoewidjojo 1998). Tikus jantan memiliki kondisi biologis serta system hormonal yang lebih stabil dibandingkan dengan tikus betina, selain itu tikus jantan memiliki kecepatan metabolisme obat lebih cepat dibandingkan dengan tikus betina (Blodinger, 1994).

## **J. Landasan Teori**

Diabetes mellitus telah menjadi salah satu masalah kesehatan masyarakat yang paling umum secara global. Diperkirakan 382 juta

orang di seluruh dunia menderita diabetes dan jumlah ini diperkirakan akan mencapai 592 juta pada tahun 2035 (Guariguata *et al.*, 2014). Indonesia masih mengalami peningkatan kasus hingga menempati urutan keenam di dunia dengan jumlah penderita DM sebesar 10,3 juta jiwa (Kementrian Kesehatan RI, 2019a).. Prevalensi DM di Indonesia berdasarkan konsensus Perkeni 2011 diketahui juga meningkat dari 6,9% pada tahun 2013 menjadi 8,5% pada tahun 2018 (KemenKes RI, 2018).

Pada diabetes melitus terjadi kegagalan sekresi insulin melalui disfungsi sel  $\beta$  pankreas dan kegagalan aksi insulin melalui resistensi insulin. Apabila kondisi resistensi insulin lebih dominan, maka sel  $\beta$  pankreas akan mengalami transformasi sebagai usaha untuk meningkatkan jumlah insulin dan mengkompensasi permintaan yang berlebihan yang selanjutnya akan menyebabkan peningkatan kadar insulin plasma. Insulin yang tidak dapat bekerja secara optimal menyebabkan peningkatan glukosa darah atau hiperglikemia yang dapat meningkatkan stres oksidatif. Peningkatan stres oksidatif ditandai dengan peningkatan produksi radikal bebas dan penurunan antioksidan dalam tubuh. Status stres oksidatif yang terus meningkat menghabiskan antioksidan endogen seperti superoksida dismutase (SOD) dan glutathione peroxidase (GPx) (Jimenez *et al.*, 2018). Stres oksidatif adalah suatu kondisi yang disebabkan oleh adanya peningkatan produksi radikal bebas atau berkurangnya aktivitas pertahanan antioksidan atau keduanya. Dalam kaitan dengan kondisi ini dikenal dengan istilah *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS) (Oyenihi, 2015). *Reactive Oxygen Species* (ROS) mampu mengoksidasi protein seluler, asam nukleat, dan lipid. Studi dan bukti klinis telah menunjukkan bahwa pembentukan ROS meningkat pada kedua jenis diabetes dan bahwa permulaan diabetes terkait erat dengan stres oksidatif terutama melalui oksidasi, glikasi protein nonenzimatik, dan degradasi oksidatif protein terglykasi (Johansen *et al.*, 2005).

Salah satu pendekatan terapeutik untuk mengelola diabetes mellitus adalah dengan memperlambat penyerapan glukosa melalui penghambatan enzim pencernaan di organ pencernaan seperti  $\alpha$ -glukosidase dan  $\alpha$ -amilase (Rosak dan Mertes, 2009). Selama 20 tahun terakhir, flavonoid alami dan analog sintetik telah dipelajari secara

ekstensif sebagai inhibitor  $\alpha$ -glukosidase (Zhenhua *et al.*, 2014). Flavonoid yang menunjukkan aktivitas antioksidan kuat telah disarankan dalam pengelolaan diabetes mellitus. Kemampuan antioksidan untuk melindungi dari efek merusak akibat hiperglikemia dan juga untuk meningkatkan metabolisme dan penyerapan glukosa harus dipertimbangkan sebagai alternatif utama dalam pengobatan diabetes mellitus. Selain efek antioksidannya, flavonoid dapat bekerja pada target biologis yang terlibat dalam diabetes mellitus tipe 2 seperti  $\alpha$ -glukosidase dan DPP-4. Sebagai pengikat radikal bebas, flavonoid dapat secara efektif mencegah diabetes mellitus tipe 2. Efek protektif flavonoid dalam sistem biologi dikaitkan dengan kemampuannya untuk mentransfer hidrogen atau elektron radikal bebas, mengaktifkan enzim antioksidan, katalis logam khelat, mereduksi radikal  $\alpha$ -tokoferol, dan menghambat oksidase.

Menurut Zou *et al.*, (2021) ekstrak etanol daun kemuning dengan dosis 35 dan 70 mg/Kg BB secara signifikan menghambat peningkatan kadar glukosa pada tikus *diabetic cardiomyopathy*. Efek perlindungan terkait dengan peningkatan ekspresi gen Nrf2 dan HO-1 serta menghambat stres oksidatif, inflamasi dan apoptosis. Pada penelitian yang dilakukan oleh Gupta *et al.*, (2012), ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera* L.) 150 dan 300 mg/Kg BB, peroral selama 21 hari pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan mampu menurunkan kadar glukosa. Daun kelor mengandung dua jenis zat bioaktif yaitu *quercetin* dan *kaempferol*. Studi fitokimia menunjukkan bahwa daun kelor mengandung glukosinolat (glukomoringin), flavonoid (*quercetin* dan *kaempferol*), dan asam fenolat (asam klorogenat) adalah tiga kelas fitokimia yang ada dalam kelor dan ketiga fitokimia ini menunjukkan antikanker, hipotensi, antiinflamasi, antioksidan, efek hipoglikemik, dan antidislipidemik (Yassa & Tohamy, 2014). Penggunaan bersama pada daun kemuning dan daun kelor memberikan efek yang sinergis yaitu pada penelitian yang dilakukan oleh Sayar *et al.*, (2014), menunjukkan ekstrak daun kemuning yang mengandung alkaloid, kumarin, fenol, terpenoid dan flavonoid dapat menurunkan kadar glukosa darah dan memperbaiki kerusakan jaringan pankreas, sedangkan kandungan senyawa yang terdapat pada daun kelor diantaranya yaitu *quercetin* bekerja dengan meningkatkan sensitivitas insulin dan memperbaiki sel  $\beta$ -pankreas (Alkhalidy *et al.*, 2015).

Prinsip dari penelitian ini adalah ekstraksi dari daun kemuning dan daun kelor dibuat kombinasi. Penelitian kombinasi ekstrak daun kemuning dan ekstrak daun kelor ini untuk mengetahui pengaruh ekstrak kombinasi keduanya dengan uji *in vivo* untuk melihat kadar glukosa, aktivasi SOD dan GPx, serta uji histopatologi sel islet pankreas. Pengujian antidiabetes menggunakan tikus yang diinduksi STZ-NA. STZ-NA merupakan senyawa diabetogenik yang bersifat sitotoksik terhadap sel  $\beta$  pankreas melalui pembentukan radikal bebas dan stress oksidatif (Nugroho, 2006). Induksi STZ-NA pada hewan uji merusak jaringan pankreas sehingga terjadi penurunan produksi insulin oleh sel  $\beta$  pankreas (Szkuldeski,2001; Nugroho, 2006).

### **K. Hipotesis**

Hipotesis yang dapat disusun dalam penelitian ini adalah:

1. Kombinasi ekstrak etanol daun kemuning dan daun kelor dengan dosis 70 mg/Kg BB : 300 mg/Kg BB memiliki aktivitas antidiabetes pada tikus yang diinduksi STZ-NA ditinjau dari kadar glukosa darah.
2. Kombinasi ekstrak etanol daun kemuning dan daun kelor dengan dosis 70 mg/Kg BB : 300 mg/Kg BB memiliki aktivitas antioksidan pada tikus yang diinduksi STZ-NA ditinjau dari aktivitas SOD dan GPx.
3. Kombinasi ekstrak etanol daun kemuning dan daun kelor dengan dosis 70 mg/Kg BB : 300 mg/Kg BB memiliki aktivitas perlindungan sel pankreas pada tikus yang diinduksi STZ-NA