

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Tanaman Kopi Robusta**

##### **1. Sistematika tanaman**

Menurut Rahardjo (2012) kopi robusta (*Coffea canephora*) memiliki sistematika sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Asteridae
Ordo	: Rubiales
Famili	: Rubiaceae
Genus	: Coffea
Spesies	: <i>Coffea robusta</i>

##### **2. Morfologi tanaman**

Kopi merupakan salah satu minuman dengan aroma yang sangat khas yang sangat digemari oleh masyarakat di Indonesia terdapat dua macam kopi yaitu kopi robusta (*Coffea canephora*) dan kopi arabika (*Coffea arabica*). Dari kedua jenis kopi ini memiliki kandungan dan rasa yang berbeda dan bahkan daerah tumbuh dari tanaman ini. Kopi robusta biasa dikatakan sebagai kopi kelas 2 karena memiliki rasa yang lebih pahit, kandungan kafein yang lebih tinggi dan rasa yang sedikit asam tetapi kopi ini juga lebih tahan terhadap hama dan penyakit. Pertumbuhan dari tanaman kopi biasanya dipengaruhi oleh iklim daerah tersebut dimana kopi robusta memiliki persyaratan iklim adalah garis lintang 20°LC - 20°LU, tinggi tempat penanaman 300-1500 m dpl, curah hujan 1500 -2500 mm/tahun dan suhu rata-rata adalah 21-24°C (Badri *et al.*, 2018).

##### **3. Manfaat tanaman**

Kopi selain memiliki ciri khas rasa dan aroma, biji buah kopi sering digunakan dan dikonsumsi di masyarakat karena kopi memiliki kandungan senyawa kimia seperti karbohidrat, protein, mineral, kafein, trigonelin, asam alifatik (asam karboksilat), asam klorogenat, lemak dan turunannya, glikosida, dan komponen volatile (Farhaty, 2016). Manfaat asam klorogenat bagi kesehatan manusia yaitu sebagai

antioksidan, antihiperlipidemik, antivirus, hepatoprotektif, dan berperan dalam kegiatan antispasmodik (Farah & Donangelo, 2006).

#### **4. Kandungan tanaman**

Hasil uji fitokim yang telah dilakukan oleh Wigati *et al* (2018) menunjukkan bahwa biji kopi robusta mempunyai kandungan kimia alkaloid, saponin, tanin dan flavonoid. Biji kopi hijau robusta paling banyak mengandung asam klorogenat dibandingkan dengan biji kopi lainnya yaitu 6.1-11.3 g/100g (Farah & Donangelo, 2006). Senyawa lain yang terdapat pada biji kopi robusta adalah kafein yang merupakan golongan dari alkaloid, kafein yang terdapat pada biji kopi hijau robusta yaitu 1.5-2.5 g/100g dan akan meningkat dengan adanya pemanasan yaitu 2.4-2.5 g/100g (Farhaty, 2016).

### **B. Diabetes Melitus**

#### **1. Definisi**

Diabetes melitus adalah penyakit yang ditandai dengan peningkatan kadar gula darah yang disebabkan oleh kurangnya sekresi insulin dan diperberat oleh glukagon yang berlebihan (Dipiro, 2015). Tingginya kadar gula darah disertai dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lipid dan protein sebagai akibat insufisiensi fungsi insulin. insufisiensi fungsi insulin dapat disebabkan oleh gangguan atau defisiensi produk insulin oleh sel-sel beta Langerhans kelenjar pankreas, atau disebabkan oleh kurang responsifnya sel sel tubuh terhadap insulin.

#### **2. Klasifikasi DM**

Menurut American Diabetes Association (2015) klasifikasi diabetes mellitus dibagi dalam 4 jenis yaitu:

**2.1. DM tipe 1.** Diabetes mellitus tergantung insulin (*insulin dependent diabetes melitus*, IDDM) atau DM tipe 1 biasanya berkembang pada masa kanak-kanak atau pada awal masa dewasa. DM tipe 1 ini biasanya terjadi karena adanya kerusakan pada sel beta langerhans sehingga menyebabkan terhambatnya produksi insulin atau bahkan dapat terhenti. Pada tipe diabetes ini kadar glukosa darah sangat tinggi namun hironisnya tubuh tidak dapat memanfaatkan glukosa dengan baik untuk sebagai sumber energi (Nugroho, 2012).

**2.2. DM tipe 2.** Diabetes mellitus tidak tergantung dengan insulin (*non-insulin dependent diabetes melitus* (NIDDM)) atau DM tipe2 ditandai dengan resistensi jaringan terhadap aksi insulin dan

biasanya dikombinasikan dengan defisiensi sekresi insulin. Pada penderita DM tipe 2 sel beta pankreas masih dapat memproduksi insulin namun insulin bersifat tidak aktual sehingga menyebabkan kadar glukosa darah meningkat. Terganggunya kerja insulin juga dapat mengakibatkan peningkatan fungsi asam lemak bebas, kadar trigliserida dan HDL (Katzung *et al.*, 2015).

**2.3. DM gestational.** DM tipe ini merupakan kategori DM yang dapat terdiagnosa ketika hamil (sebelumnya tidak diketahui). DM gestational biasanya terjadi pada kehamilan trimester kedua atau ketiga. Sehingga pengujian kadar gula darah untuk penderita DM gestational dilakukan pada minggu ke-24 dan ke-28 selama kehamilan (World Health Organization, 2013).

**2.4. DM tipe lain.** DM tipe ini biasanya disebabkan karena penggunaan obat-obatan yang dapat menyebabkan terganggunya sekresi insulin seperti fenitoin atau menghambatnya kerja insulin seperti glukokortikoid, dapat juga disebabkan karena penyakit yang dapat menyebabkan kerusakan pada sel beta pankreas seperti pankreatitis, hemokromatis, fibrosis insulin seperti agromegali, sindrom cushing (Arisman, 2011).

### **3. Gejala klinik DM**

Gejala klinik diabetes yang sering dirasakan penderita diabetes adalah poliuria (sering buang air kecil), polidipsia (sering haus), dan polifagia (banyak makan dan mudah lapar). Selain itu sering juga terdapat keluhan seperti penglihatan kabur, koordinasi gerak organ tubuh yang terganggu, kesemutan pada tangan atau kaki, timbul gatal-gatal yang seringkali sangat mengganggu (pruritus), dan berat badan menurun tanpa sebab yang jelas (Depkes, 2005).

### **4. Diagnosis DM**

Diagnosis penderita DM biasanya akan dipertimbangkan ketika memiliki keluhan khas DM yang berupa poliuria, polidipsia, polifagia, dan penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan penyebabnya. Serta keluhan lain yang disampaikan penderita antara lain badan terasa lemah, sering merasa kesemutan, gatal-gatal, mata kabur, disfungsi ereksi pada pria, dan pruritus vulvae pada wanita. Dapat dikatakan penderita positif mengalami DM bila penderita mengalami keluhan khas serta hasil pemeriksaan kadar glukosa darah sewaktu  $>200$  mg/dL serta kadar glukosa darah puasa  $>126$  mg/dL (DepKes, 2005)

## 5. Komplikasi DM

Komplikasi pada penderita diabetes mellitus umumnya terbagi dalam 2 yaitu komplikasi kronis dan akut (DepKes, 2005)

**5.1. Komplikasi akut DM.** Komplikasi akut merupakan hipoglikemia dan ketoasidosis merupakan keadaan gawat darurat yang biasa terjadi pada pasien DM dalam perjalanan penyakitnya. Ketoasidosis merupakan suatu keadaan gawat darurat DM dimana kadar glukosa darah mengalami kenaikan tinggi yang disertai dengan keasaman darah akibat terjadinya timbunan benda keton dan kekurangan cairan. Kondisi ini disebabkan defisiensi insulin berat dan akut. Tanda khasnya adalah kesadaran menurun yang disertai dehidrasi berat. Komplikasi akut ini memerlukan penanganan yang cepat dan tepat karena angka kematiannya tinggi (DepKes, 2005).

**5.2. Komplikasi kronis diabetes melitus.** Komplikasi kronis DM terjadi jika kadar glukosa darah tetap tinggi dalam jangka waktu tertentu. Komplikasi kronis dibagi menjadi dua yaitu makrovaskuler dan mikrovaskuler (Depkes, 2005).

Komplikasi kronis meliputi komplikasi mikrovaskuler dan makrovaskuler. Komplikasi mikrovaskuler terutama terjadi pada penderita DM tipe 1 seperti 10 nefropati, diabetik retinopati (kebutaan), neuropati, dan amputasi sedangkan komplikasi makrovaskuler yang umum berkembang pada penderita DM adalah trombotik otak (pembekuan darah pada sebagian otak), penyakit jantung koroner (PJK), gagal jantung kongestif, dan stroke (Restyana, 2015).

## 6. Terapi DM

**6.1. Tiazolidindion.** Tiazolidindion sering disebut dengan TZDs atau glitazon yang dapat berkerja dengan cara meningkatkan sensitivitas insulin, pada otot, hati, dan jaringan lemak secara tidak langsung, beberapa mekanisme aksi dari kerja perifer yang dapat disebabkan dari stimulasi pelepasan adiposa. Hal ini yang dapat menyebabkan adanya peningkatan sensitivitas insulin sehingga terjadinya stimulasi transport glukosa ke dalam otot dan peningkatan oksidasi lemak oleh adiponektin (Dipiro, 2015).

**6.2. Sulfonilurea.** Efek utama adalah dalam meningkatkan pelepasan insulin dari pankreas. Sulfonilurea dapat mengurangi glukosa yang ada pada darah dan meningkatkan glikogen, lemak, dan protein. Ada beberapa contoh obat pada golongan sulfonilurea diantaranya glipizid, gliburid, glimepirid (Katzung *et al.*, 2015).

**6.3. Biguanide.** Termasuk golongan obat ini adalah metformin hidroklorida. Metformin merupakan obat yang cara kerjanya terutama menurunkan kadar glukosa darah dengan menekan produksi glukosa yang diproduksi hati dan mengurangi resistensi insulin. Metformin biasa digunakan sebagai monoterapi atau dikombinasikan dengan sulfonilurea. Metformin tidak menyebabkan hipoglikemia atau penambahan berat badan, jadi sangat baik digunakan pada pasien diabetes melitus tipe 2 yang menderita obesitas (pada beberapa studi bahkan pasien mengalami penurunan berat badan) (BPOM, 2010)

**6.4. Golongan analog meglitinid.** Termasuk golongan obat ini adalah repaglinid. Mekanisme aksi dan profil efek samping repaglinid hampir sama dengan sulfonilurea. Agen ini memiliki onset yang cepat dan diberikan saat makan, dua hingga empat kali setiap hari. Repaglinid bisa sebagai pengganti bagi pasien yang menderita alergi obat golongan sulfa yang tidak direkomendasikan sulfonilurea. Obat ini bisa digunakan sebagai monoterapi atau dikombinasikan dengan metformin. Harus diberikan hati-hati pada pasien lansia dan pasien dengan gangguan hati dan ginjal (BPOM, 2010).

**6.5. Golongan penghambat alfa glukosidase.** Yang termasuk golongan obat ini adalah akarbosa dan miglitol. Obat ini bekerja secara kompetitif menghambat kerja enzim glukosidase alfa di dalam saluran cerna. Enzim ini berfungsi menghambat proses metabolisme dan penyerapan karbohidrat pada dinding usus halus. Hal ini akan menyebabkan turunnya penyerapan glukosa sehingga dapat menurunkan kadar glukosa dalam darah yang meningkat setelah makan (BPOM, 2010). Efek samping yang sering timbul adalah gangguan pencernaan (mal-adsorpsi flatulen, diare, abdominal diskomfort dan abdominal bloating). Obat ini paling efektif bila diberikan bersama makanan yang berserat, mengandung polisakarida sedikit kandungan sukrosa dan sakarosa (BPOM, 2009).

**6.6. Golongan penghambat dipeptidil peptidase tipe 4.** Yang termasuk golongan obat ini adalah sitagliptin dan vildagliptin. Merupakan antidiabetika oral yang bekerja dengan menghambat dipeptidil peptidase tipe 4. Obat ini merupakan obat baru yang diindikasikan sebagai terapi tambahan pada diet dan olahraga untuk meningkatkan kontrol kadar glukosa darah pada pasien diabetes melitus tipe-2 (BPOM, 2010).

### C. Stres Oksidatif Pada Diabetes Mellitus

Stres oksidatif timbul akibat adanya reaksi metabolik yang menggunakan oksigen dan mengakibatkan gangguan pada keseimbangan antara oksidan dan antioksidan sel. Halliwell (2006) menyatakan stress oksidan adalah suatu keadaan seimbangan antara oksidan dengan antioksidan, pada dasarnya antioksidan dapat terbentuk dalam dua cara yaitu secara endogen (sebagai respon normal proses biokimiawi intrasel maupun ekstrasel) dan secara eksogen (misalnya dari populasi, makanan, serta injeksi ataupun absorpsi melalui kulit). Terdapat beberapa contoh radikal bebas antara lain anion superoksida ( $O_2^-$ ) radikal hidroksil ( $OH^\cdot$ ) nitrit oksida ( $H_2O_2$ ), dan lain lain. Dalam keadaan normal didalam tubuh terjadi keseimbangan antara radikal bebas sebagai oksidan dan antioksidan. Keseimbangan tersebut menjadi terganggu bila terjadi infeksi, radiasi, trauma, atau keadaan lain seperti DM, perokok dan dislipidemia. Keadaan ini menimbulkan terjadinya stress oksidatif dan selanjutnya akan mengakibatkan terjadinya peningkatan peroksidasi lipid (Carr *et al.*, 1999).

Menurut Gutteridge (2007) stres oksidatif dapat diakibatkan oleh berkurangnya antioksidan misalnya mutasi yang menurunkan pertahanan antioksidan seperti GSH atau MnSOD, diet yang salah sehingga kurangnya asupan antioksidan serta unsur-unsur penting lainnya seperti Fe, Zn, Mg, Cu, defisiensi protein seperti kwashiorkor yang dapat menurunkan kadar GSH serta peningkatan produksi spesies reaktif yang berlebihan, misalnya dikarenakan oleh paparan oksigen yang meningkat, serta toksisitas yang menghasilkan spesies reaktif dan aktivitas berlebihan dari system alami penghasil spesies reaktif seperti aktivitas yang tidak tepat dari sel-sel fagositosis pada penyakit-penyakit inflamasi kronis.

Sumber stres oksidasi pada diabetes diantaranya perpindahan keseimbangan reaksi redoks karena perubahan metabolisme karbohidrat dan lipid yang akan meningkatkan pembentukan ROS dari reaksi glikasi dan oksidasi lipid sehingga menurunkan sistem pertahanan antioksidan diantaranya GSH.

Hiperglikemia akan memperburuk dan memperparah pembentukan ROS melalui beberapa mekanisme. ROS akan meningkatkan pembentukan ekspresi Tumour *necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dan memperparah stres oksidatif. TNF- $\alpha$  dapat mengakibatkan resistensi insulin melalui penurunan autofosforilasi (*auto-*

*phosphorylation*) dari reseptor insulin, perubahan reseptor insulin substrat1 menjadi inhibitor insuline receptor tyrosine kinase activity, penurunan insuline-sensitive glucose transporter (GLUT-4), meningkatkan sirkulasi asam lemak, merubah fungsi sel  $\beta$ , meningkatkan kadar trigliserida dan menurunkan kadar HDL. Hasil penelitian menunjukkan injeksi TNF pada hewan uji sehat akan menurunkan sensitivitas insulin yang diakibatkan karena hiperglikemia tanpa disertai penurunan kadar insulin plasma (Tiwari, 2002).

Stres oksidatif pada penderita diabetes akan meningkatkan pembentukan ROS di dalam mitokondria yang akan mengakibatkan berbagai kerusakan oksidatif berupa komplikasi diabetes dan akan memperparah kondisi penderita diabetes, untuk itu perlu menormalkan kadar ROS di mitokondria untuk mencegah kerusakan oksidatif.

#### **D. Antioksidan**

Antioksidan adalah senyawa-senyawa yang mampu menghilangkan, membersihkan, menahan efek radikal. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, selain itu antioksidan juga berguna untuk mengatur agar tidak terjadi proses oksidasi berkelanjutan di dalam tubuh (Selawa *et al.*, 2013). Tubuh manusia menghasilkan senyawa antioksidan, tetapi tidak cukup kuat untuk berkompetensi dengan radikal bebas yang dihasilkan setiap harinya oleh tubuh sendiri. Kekurangan antioksidan dalam tubuh membutuhkan asupan dari luar. Sebenarnya, antioksidan juga berkompetensi sesamanya sehingga membutuhkan campuran yang cukup tepat (Raharjo, 2005). Antioksidan digolongkan berdasarkan sumbernya dan berdasarkan mekanisme kerjanya. Berdasarkan sumbernya antioksidan dibedakan menjadi antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Berdasarkan mekanisme kerjanya antioksidan primer, antioksidan sekunder dan antioksidan tersier.

##### **1. Hubungan aktivitas antioksidan dengan regenerasi sel pankreas.**

Hiperglikemik menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein dan aktivasi jalur metabolisme poliol yang selanjutnya mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif. Pembentukan senyawa oksigen reaktif tersebut dapat mengakibatkan modifikasi lipid, DNA, dan protein pada berbagai jaringan tersebut mengakibatkan

ketidak seimbangan antara antioksidan protektif dan peningkatan radikal bebas. Keadaan ini merupakan awal terjadinya kerusakan oksidatif yang dikenal sebagai stress oksidatif (Setiawan, 2005). Untuk merendam stress oksidatif maka diperlukan antioksidan.

Sel yang normal mempunyai sejumlah enzim pertahanan yang bertugas sebagai antioksidan endogen (katalase, glutathion peroksidase dan superoksidase dismutase) untuk memdetoksifikasi radikal bebas dan mencegah kerusakan sel. Kerentanan suatu jaringan terhadap kerusakan oksidatif tergantung pada mekanisme pertahanan oksidatifnya, antara lain oleh aktivitas dan kandungan enzim antioksidan endogen. Pada keadaan patologis seperti diabetes, peningkatan diabetes dalam tubuh akan meningkatkan penggunaan enzim antioksidan intrasel sehingga menyebabkan kurangnya aktivitas endogen dalam tubuh. Adanya peningkatan suplai antioksidan yang cukup dalam tubuh akan membantu mengurangi resiko komplikasi pada penderita DM (Rahbani, 1999)

## **2. Penggolongan antioksidan**

**2.1. Antioksidan primer.** Pembentukan senyawa radikal bebas yang baru dapat dicegah oleh jenis antioksidan primer. Antioksidan tersebut mengubah radikal bebas menjadi molekul yang berkurang dampak negatifnya, sebelum radikal bebas itu bereaksi. Antioksidan primer seperti enzim GPx (Glutathion peroksidase) yang berfungsi sebagai pelindung hancurnya sel-sel dalam tubuh dan mencegah peradangan karena radikal bebas. Enzim GPx ada di dalam tubuh kita dimana kerjanya membutuhkan bantuan gizi atau mineral lainnya seperti mangan, seng dan tembaga.

**2.2. Antioksidan sekunder.** Fungsi jenis ini adalah menangkap senyawa serta menghentikan terjadinya reaksi yang berantai dalam pembentukan radikal bebas. Contoh antioksidan sekunder yaitu vitamin E (alfa tokoferol), vitamin C (asam askorbat), betakaroten dan kurkuminoid.

**2.3. Antioksidan tersier.** Radikal bebas menyebabkan kerusakan sel dan jaringan. Contoh enzim yang memperbaiki DNA pada inti sel adalah metionin sulfoksida reduktase yang dapat mencegah terjadinya penyakit kanker yang berperan dalam perbaikan biomolekul yang disebabkan oleh radikal bebas (Winarsi, 2007).



### **3. Jenis-jenis antioksidan.**

**3.1. Antioksidan endogen.** Antioksidan endogen yaitu sejumlah komponen protein dan enzim yang disintesis dalam tubuh yang berperan dalam menangkal oksidasi oleh radikal bebas yang terdiri dari katalase, superoksida dismutase, serta protein yang berikatan dengan logam seperti transferin dan seruloplasmin. Antioksidan endogen dibagi menjadi 2 kelompok antioksidan enzimatis dan antioksidan nonenzimatis. Antioksidan enzimatis seperti enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase (GPx). Sedangkan antioksidan nonenzimatis dibagi menjadi 2 kelompok lagi yaitu antioksidan larut lemak seperti tokoferol, karotenoid, flavonoid, quinon, bilirubin dan antioksidan larut air seperti asam askorbat, asam urat, protein pengikat logam, dan protein pengikat heme.

**3.2. Antioksidan eksogen.** Antioksidan eksogen bersumber dari makanan terdiri atas tokoferol (vitamin E), asam askorbat (vitamin C), karotenoid dan flavonoid. Antioksidan jenis eksogen ini dapat dimodifikasi dengan makanan dan suplemen (Winarsi, 2007).

### **4. Radikal bebas.**

Menurut Widodo (2013) radikal bebas adalah suatu atom atau molekul yang sangat reaktif dengan elektron yang tidak memiliki pasangan. Karena secara kimia molekulnya tidak berpasangan, maka radikal bebas cenderung untuk bereaksi dengan molekul sel tubuh. Beberapa komponen tubuh yang rentan terhadap serangan radikal bebas antara lain DNA, membran sel, protein dan lipid. Radikal bebas dapat didefinisikan sebagai molekul atau senyawa yang keadaannya bebas dan mempunyai satu atau lebih elektron bebas yang tidak berpasangan. Elektron dari radikal bebas yang tidak berpasangan ini sangatlah mudah menarik elektron dari molekul lainnya sehingga radikal bebas tersebut menjadi lebih reaktif (Hernani & Rahardjo, 2005).

Radikal bebas mencari reaksi-reaksi agar dapat memperoleh kembali elektron pasangannya. Serangkaian reaksi dapat terjadi yang menghasilkan serangkaian radikal bebas, setelah itu radikal bebas dapat mengalami tabrakan kaya energi dengan molekul lain yang merusak ikatan di dalam molekul. Pada akhirnya radikal bebas dapat merusak membran sel, retikulum endoplasma atau DNA, kesalahan DNA akibat radikal bebas diduga berkontribusi terhadap perkembangan beberapa jenis kanker. Diduga pula bahwa sel endotel yang melapisi pembuluh

darah dapat rusak akibat radikal bebas yang dihasilkan selama metabolisme normal lipid yang mengakibatkan aterosklerosis (Widodo, 2013).

Tubuh terus menerus membentuk radikal oksigen. Radikal bebas juga terbentuk akibat pengaruh respon luar tubuh seperti polusi udara, sinar ultra violet, dan asap rokok (Khlifi *et al.*, 2005). Radikal bebas sebenarnya penting bagi kesehatan dalam memerangi peradangan, membunuh bakteri, dan mengembalikan tonus otot polos pembuluh darah dan organ-organ dalam tubuh kita. Radikal bebas yang dihasilkan melebihi batas proteksi antioksidan seluler, maka akan menyerang sel itu sendiri. Struktur sel yang berubah akan turut merubah fungsinya dan akan mengarah pada proses timbulnya penyakit (Sauriasari, 2006).

### **5. Mekanisme kerja antioksidan.**

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

Antioksidan dapat dikelompokkan menjadi tiga kelompok berdasarkan mekanisme reaksinya, yaitu antioksidan primer, sekunder dan tersier. Antioksidan primer disebut juga antioksidan endogenous atau enzimatis. Antioksidan primer apabila dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada radikal, kemudian radikal antioksidan yang terbentuk segera menjadi senyawa yang lebih stabil. Enzim tersebut menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai (polimerisasi), kemudian mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil. Antioksidan sekunder disebut juga sebagai antioksidan eksogenous atau nonenzimatis. Antioksidan kelompok ini juga disebut sistem pertahanan preventif yaitu terbentuknya senyawa oksigen reaktif dihambat dengan cara pengkelatan metal atau dirusak pembentukannya dengan cara memotong reaksi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkapnya. Kelompok antioksidan tersier meliputi sistem DNA repair dan metionin sulfoksida reduktase. Enzim-enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas. Kerusakan DNA yang tereduksi senyawa

radikal bebas dicirikan oleh rusaknya struktur pada gugus non basa maupun basa (Winarsi, 2007).

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

### E. Streptozotosin dan Nikotinamid

Streptozotosin (STZ) merupakan antibiotik antineoplastik berasal dari *Streptomyces achromogenes* atau sintesis yang dapat berefek pada metabolisme glukosa (Martindale, 1989). Streptozotocin telah umum digunakan untuk memicu diabetes pada hewan uji. Mekanisme kerjanya yakni berespon terhadap sel beta pankreas, dengan melakukan aksi sitotoksik agen diabetogenik melalui pelepasan *reactive oxygen species* (ROS) (Novrial, 2007).

Toksisitas selektif STZ di dalam sel beta pada islet Langerhans pankreas berupa gangguan terhadap oksidasi glukosa, transport glukosa, aktivitas glukokinase penurunan sintesis dan penurunan sekresi insulin. Mekanisme STZ merusak sel beta pankreas melalui 3 jalur yaitu : metilasi, xantin oksidase dan produksi nitrit oksidan (NO) (Ghasemi *et al.*, 2014). STZ bekerja secara toksisitas setelah diinduksi dan berada pada jalur sistemik. STZ memiliki gugus glukosa dan akan memberikan aksi intraseluler terutama dalam mengubah untaian DNA sel beta dan gugus nitrosamida sehingga memberikan pengaruh terjadinya alkilasi DNA pada jalur metilasi.

Alkilasi DNA terjadi karena adanya peningkatan jumlah ion metil karbonium yang sangat reaktif ( $CH_3^+$ ) akibat adanya gugus nitrosida, alkilasi menyebabkan kerusakan DNA sel beta pankreas dan dari kerusakan tersebut menyebabkan poli-ADP ribosa-polimerase 1 (PARP-1) menjadi aktif. PARP-1 merupakan enzim yang berfungsi untuk mempercepat pembentukan ADP-ribosa dari nikotinamid adenin dinukleotida ( $NAD^+$ ). Sehingga pada saat PARP-1 berada dipankreas maka jumlah  $NAD^+$  semakin menurun, diikuti dengan penurunan

jumlah ATP dan juga penurunan sintesis dan penurunan sekresi insulin. Akibatnya kematian sel beta melalui mekanisme apoptosis dan nekrosis tidak dapat dihindari (Ghasemi *et al.*, 2014).

Selain jalur metilasi, melalui jalur xantin oksidase yaitu enzim yang meningkatkan produksi asam urata, juga berperan dalam toksisitas sel beta. Hal disebabkan karena sel beta pankreas beraktivasi terhadap enzim xantin oksidase. Enzim ini mengkatalisis pembentukan radikal bebas yaitu hydrogen peroksidan, anion superoksida dan radikal superoksida yang memicu kerusakan DNA sel beta pankreas dan mampu mengaktivasi PARP-1 yang pada akhirnya menyebabkan kematian sel beta akibat apoptosis dan nekrosis

Mekanisme STZ lain yaitu dapat memproduksi nitrat oksida (NO) melalui metabolisme dengan atau tanpa enzim. NO hasil reaksi sebelumnya berikatan dengan radikal bebas anion superoksida ( $O_2^-$ ) dan selanjutnya akan membentuk radikal bebas baru peroksininitrit dan kemudian berubah lagi menjadi radikal hidroksil yang memiliki racun terhadap komponen genetik. Kenaikan kadar molekul radikal bebas ini ke dalam sel sehingga akan menyebabkan terjadinya stress oksidatif seluler yang berujung pada kematian karena sel beta memiliki aktivitas enzim antioksidan yang rendah (Eleazu *et al.*, 2013).

Dosis streptozotocin (STZ) berkisar antara 40 sampai 60 mg/kg BB diberikan sekali sehari secara intravena pada tikus dewasa untuk merangsang timbulnya diabetes mellitus bergantung insulin (DM tipe 1), namun terkadang digunakan dosis tinggi. Pemberian STZ juga dapat secara intraperitoneal (Szkudelski, 2001). Pada penelitian yang dilakukan oleh Novrial (2007) menggunakan tikus *Sprague-Dawley*, membuktikan induksi streptozotocin multipel dosis rendah 40 mg/kgBB/hari selama lima hari berturut-turut menyebabkan hiperglikemia pada hari keenam atau sehari setelah induksi selesai dilakukan.

Niasin (vitamin B3) merupakan vitamin yang larut dalam air dan memiliki beberapa turunan atau derivet. Salah satunya adalah nikotinamid (NA) yang mengandung rantai samping berupa gugus amida. Nikotinamid merupakan senyawa yang dapat mengurangi toksisitas STZ atau mengandung sel beta dengan bertindak sebagai inhibitor PARP-1. Adanya mekanisme penghambat terhadap PARP-1 menyebabkan sintesis  $NAD^+$  seluler meningkat karena terjadinya penurunan penggunaan  $NAD^+$  sebagai bahan dasar untuk membentuk

ADP-ribosa. Adanya peningkatan  $NDA^+$  diikuti juga dengan peningkatan jumlah ATP dan peningkatan sintesis atau sekresi insulin sehingga dapat menghambat apoptosis dan nekrosis pada sel beta (Alenzi, 2009).

Selain pada jalur penghambatan PARP-1, nikotinamid juga mampu bertindak sebagai precursor biokimia  $NAD^+$ . Diketahui bahwa pada mamalia, pertama pembuatan  $NAD^+$  nikotinamid dikatalisis oleh enzim nikotinamid fosforibosiltransferase (Tolstikov *et al.*, 2014).

## **F. Metode Analisis Kadar Glukosa**

### **1. Metode analisa kadar glukosa darah dengan glukometer**

Kadar glukosa darah ditetapkan dengan menggunakan alat Glucometer (GlucoDr Biosensor AGM-2100). Cuplikan darah yang diambil dari vena lateralis 24 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.

Prosedur penggunaan glukometer adalah masukkan check strip untuk validasi alat dan mengetahui kondisi alat glukometer, dimana alat dinyatakan valid jika pada layar muncul tulisan “OK”, kemudian set kode alat dengan cara mencocokkan kode nomor yang muncul pada layar GlucoDr test meter dengan yang tertera pada tabung wadah GlucoDr strip. Test strip dimasukkan ke lubang alat GlucoDr test meter, ambil sampel darah dengan GlucoDr lancing device, tempelkan darah pada test strip, maka darah akan otomatis terserap ke dalam strip, pastikan test strip terisi penuh. Layar akan memunculkan angka 11, kemudian alat akan segera mengukur dengan menghitung mundur dari angka 11 sampai 1 dan akan keluar hasil pengukuran kadar glukosa darah. Pengukuran selanjutnya digunakan test strip yang baru

Prinsip glukometer yaitu sampel darah akan masuk ke dalam strip melalui aksi kapiler. Glukosa yang ada dalam darah akan bereaksi dengan glukosa oksidase dan kalium ferisianida yang ada dalam strip dan akan dihasilkan kalium ferisianida. Kalium ferisianida yang dihasilkan sebanding dengan konsentrasi glukosa yang ada dalam sampel darah. Oksidasi kalium ferisianida akan menghasilkan muatan listrik yang akan diubah oleh glukometer untuk ditampilkan sebagai konsentrasi glukosa pada monitor alat glucometer.

## 2. Metode GLUC-DH (Glucose Dehidrogenase)

GLUC-DH adalah sebuah metode rutin enzimatis yang dibedakan dari yang lain oleh kespesifikannya yang tinggi, kepraktisan dan keluwesannya. Pengukuran dilakukan pada daerah UV. Prinsip metode ini adalah *glucose dehydrogenase* mengkatalisa oksidasi dari glucose menurut persamaan berikut :

$$3\text{-D-Glukose} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{Gluc DH}} \text{D-Glukonolactone} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

(1) Metode Gluc-DH dapat digunakan pada bahan sampel yang dideproteinisasi atau yang tidak dideproteinisasi, serta untuk hemolysate (Merck, 1987).

## 3. Metode GOD-PAP

Metode GOD-PAP yaitu reaksi kolorimetrik-enzimatis untuk pengukuran pada daerah cahaya yang terlihat oleh mata. Prinsip dari metode ini adalah *glucose oxidase* (GOD) mengkatalisa oksidasi dari glucose menurut persamaan berikut :  $\text{Glukosa} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{GOD}} \text{asam glukonat} + \text{H}_2\text{O}_2$  (2) Hidrogen peroksida yang terbentuk bereaksi dengan *4-aminoantipyrin* dan *2,4-dichlorohenol* dengan adanya peroxidase (POD) dan menghasilkan *antipirylquinonimine*, yaitu suatu zat warna merah. Jumlah zat warna yang terbentuk ini sebanding dengan konsentrasi glukosa (Merck, 1987).

## 4. Metode O-Toluidine

Prinsip metode ini adalah glucose bereaksi dengan o-toluidine dalam asam asetat panas dan menghasilkan senyawa berwarna hijau yang ditemukan secara fotometris. Metode o-toluidine dapat digunakan untuk sampel yang dideproteinisasi maupun yang tidak dideproteinisasi (Merck, 1987).

## G. Simplisia

Simplisia memiliki beberapa jenis yaitu simplisia hewani, simplisia pelican (mineral) dan simplisia nabati. Simplisia nabati merupakan simplisia yang merupakan tumbuhan utuh, atau eksudat tumbuhan. Eksudat tumbuhan adalah isi sel yang secara spontan keluar dari tumbuhannya dan belum berupa kimia murni (BPOM, 2010).

Simplisia yang aman adalah simplisia yang tidak mengandung bahan kimia, mikrobiologis, dan bahaya fisik, serta kandungan zat aktif yang berkhasiat. Ciri simplisia yang baik adalah simplisia yang memiliki kondisi kering (kadar air <10%) untuk simplisia daun, bila diremas bergemrisik dan berubah menjadi serpihan, simplisia bunga

bila diremas bergemirisik dan berubah menjadi serpihan atau mudah dipatahkan, dan simplisia buah dan rimpang (irisan) bila diremas mudah dipatahkan, dan ciri lain dari simplisia adalah tidak berjamur, dan memiliki bau yang khas menyurupai tanaman segarnya (Herawati *et al.*, 2012).

## H. Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu tanaman obat yang dilakukan untuk pemisahan kimia dan fisika dari suatu bahan padatan atau bahan cair dari suatu padatan yaitu tanaman obat (Depkes, 2000). Dari bahan padatan yang dicairkan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Proses ekstraksi dihentikan ketika terjadi kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Proses ekstraksi selesai, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Ekstrak awal sulit dipisahkan melalui teknik pemisahan tunggal untuk mengisolasi senyawa tunggal. Ekstrak awal perlu dipisahkan ke dalam fraksi yang memiliki polaritas dan ukuran molekul yang sama (Mukhriani, 2014).

Ekstrak adalah sediaan kering, kental maupun cair yang dibuat dengan cara menyaring simplisia nabati atau hewani dengan cara yang sesuai dengan karakteristik simplisia, diluar pengaruh cahaya matahari langsung. Ekstrak berdasarkan dari konsentrasinya dibedakan dalam tiga bagian yaitu ekstrak kental, ekstrak cair, dan ekstrak kering. Ekstrak kental adalah sediaan kental yang dibuat dari simplisia yang dilarutkan kemudian kemudian pelarutnya diuapkan. Ekstrak cair adalah sediaan cair yang berasal dari penyaringan simplisia. Ekstrak kering adalah sediaan berbentuk serbuk yang berasal dari simplisia yang dilarutkan dengan pelarut kemudian diuapkan sampai kering (Voight, 1994).

### 1. Metode ekstraksi.

**1.1. Maserasi.** Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali dilakukan pencokan atau pengadukan yang dimana dilakukan pada suhu ruangan (kamar) yang dimana biasanya menggunakan botol coklat kaca (DepKes, 2000). Maserasi berasal dari bahasa latin *macerare* berarti mengairi atau melunakan. Maserasi merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana. Dasar dari maserasi adalah melarutnya bahan kandungan simplisia dari yang telah rusak, yang terbentuk pada saat proses penghalusan, ekstraksi (difusi) bahan kandungan dari sel yang

masih utuh. Setelah selesai waktu maserasi, artinya keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan yang masuk ke dalam cairan, telah mencapai titik yang diperlukan maka proses difusi segera berakhir (Voight, 1994).

Selama proses maserasi dilakukan pengocokan pada botol secara berulang-ulang, dengan upaya pengocokan yang dilakukan menjamin akan keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi yang lebih cepat terjadi didalam cairan difusi yang dilakukan. Sedangkan jika dibiarkan dengan keadaan diam dalam proses maserasi akan menurunkan perpindahan bahan aktif. Secara teoritis pada suatu maserasi tidak memungkinkan untuk terjadinya proses ekstraksi absolut. Semakin besar perbandingan antara simplisia dengan pelarut (pengekstraksi) yang digunakan maka akan semakin banyak hasil yang akan didapatkan (Voight, 1994).

Secara teknologi maserasi merupakan metode pencapaian ekstraksi dengan prinsip konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinerik yang merupakan pengadukan yang dilakukan secara kontinyu atau dapat dikatakan secara terus-menerus. Maserasi merupakan penambahan pelarut yang dilakukan setelah penyaringan maserasi pertama dan dilakukan secara berulang (Depkes, 2000).

**1.2. Perkolasi.** Perkolasi biasanya digunakan untuk mengekstraksi serbuk kering terutama simplisia yang keras seperti kulit batang, kulit buah, biji, kayu dan akar. Umumnya penyari yang digunakan adalah etanol atau campuran etanol-air (Depkes, 2000). Pada metode perkolasi, serbuk sampel dibasahi dengan cara perlahan dalam sebuah perkolator (wadah silinder yang dilengkapi dengan kran pada bagian bawahnya). Pelarut ditambahkan pada bagian atas serbuk sampel, lalu dibiarkan menetes perlahan pada bagian bawah. Kelebihan pada metode ini yaitu sampel selalu dialiri oleh pelarut baru, sedangkan kerugiannya yaitu apabila sampel dalam perkolator tidak homogen maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area, dimana metode ini juga membutuhkan banyak pelarut dan cara pengerjaan yang lama (Mukhriani, 2014).

**1.3. Soxhletasi.** Soxhlet merupakan ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi berkesinambungan dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Pada prinsip soxhletasi pelarut dan sampel dipisahkan ditempat yang berbeda. Soxhletasi



menggunakan pelarut organik tertentu dengan cara pemanasan sehingga uap yang muncul setelah dingin secara kontinyu akan membasahi sampel dan secara teratur pelarut tersebut akan dimasukkan kembali ke dalam labu dengan membawa senyawa kimia yang akan diisolasi.

Ketuntasan dari metode soxhletasi adalah prosesnya berkesinambungan sehingga sampel dapat terekstraksi secara sempurna, juga proses ekstraksi lebih cepat dibandingkan dengan metode maserasi dan pelarut yang digunakan stabil. Sedangkan kerugian atau kelemahan dari metode ini adalah tidak dapat menggunakan sampel yang tidak tahan panas, karena sampel tersebut akan teroksidasi atau tereduksi ketika proses soxhletasi berlangsung (Sarker, 2006).

**1.4. Refluks.** Pada metode refluks, sampel dimasukkan bersama dengan pelarut ke dalam labu yang dihubungkan dengan kondensor. Selanjutnya pelarut dipanaskan sampai diperoleh titik didih. Uap akan terkondensasi dan kembali ke dalam labu (Mukhriani, 2014).

## I. Pelarut

Pelarut adalah zat yang digunakan sebagai media untuk melarutkan suatu zat. Penentuan senyawa biologis aktif dari bahan tumbuhan sangat tergantung pada jenis pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi (Ncube *et al.*, 2008). Pemilihan menstrum didasarkan pada pencapaian ekstrak yang sempurna tetapi ekonomis untuk mendapatkan zat aktif dari bahan obat tumbuhan sambil menjaga agar zat yang tidak aktif terekstraksi seminimal mungkin. Prinsip kelarutan adalah like dissolve like, yaitu pelarut polar akan melarutkan senyawa polar, senyawa non polar akan melarutkan senyawa non polar dan pelarut organik akan melarutkan senyawa organik (Susanti *et al.*, 2012).

Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%. Etanol 70% merupakan pelarut organik yang aman dan tidak berbahaya. Etanol lebih mudah dalam menembus membran sel intraseluler dari bahan tanaman. Etanol mempunyai titik didih yang rendah sehingga mudah diuapkan tanpa harus menggunakan suhu tinggi (Susanti *et al.*, 2012). Pada penelitian ini senyawa yang memiliki efek sebagai penurun berat badan adalah flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin. Senyawa-senyawa tersebut memiliki kelarutan pada pelarut organik polar.

## **J. Fraksinasi.**

Fraksinasi adalah teknik pemisahan dan pengelompokan kandungan kimia ekstrak berdasarkan kepolaran. Pada proses fraksinasi digunakan dua pelarut yang tidak saling bercampur dan memiliki tingkat kepolaran yang berbeda. Syarat pelarut yang dapat digunakan adalah yang memiliki kepolaran sesuai dengan bahan yang akan diekstraksi dan harus terpisah ketika dikocok. Ketika dua zat memiliki konstanta distribusi yang berbeda maka kedua zat tersebut akan menjadi dua fase yang tidak saling bercampur (Wonorahardjo, 2013). Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan pelarut diantaranya selektivitas, toksisitas, kepolaran, kemudahan menguap dan harga pelarut (Akbar, 2010). Masing-masing pelarut secara selektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan terlarut dalam pelarut polar begitu pula sebaliknya. Mula-mula senyawa dipartisi dengan pelarut non polar, kemudian dipartisi dengan pelarut semi polar dan terakhir dipartisi dengan pelarut polar. Pelarut termasuk ke dalam pelarut polar antara air, etanol, metanol. Pelarut semi polar antara lain etil asetat, eter, kloroform. Pelarut nonpolar antara lain n-heksan dan siklo heksan.

Pelarut yang digunakan pada proses fraksinasi dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

### **1. N-heksana**

N-heksana adalah pelarut non polar yang diperoleh dari hasil penyulingan minyak tanah dari suatu campuran hidrokarbon n-heksana yang mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar, larut dalam alkohol, benzene, kloroform, dan eter. Senyawa non polar seperti terpenoid, triterpenoid, sterol, alkaloid dan fenil propanoid larut oleh pelarut n-heksana.

### **2. Etil asetat**

Etil asetat memiliki rumus kimia  $C_4H_8O_2$ . Etil asetat adalah pelarut semi polar yang mudah terbakar, memiliki toksisitas rendah dan mudah menguap. Etil asetat larut dalam 15 bagian air, dapat bercampur dengan eter, etanol, dan kloroform. Penggunaan pelarut etil asetat digunakan dalam ekstraksi flavonoid, alkaloid, saponin, tannin, polifenol dan triterpenoid (Putri, 2013).

### **3. Air**

Aquadest adalah air hasil destilasi atau penyulingan yang biasanya disebut juga dengan air murni. Air merupakan pelarut yang

bersifat universal dan mudah menyerap atau melarutkan berbagai partikel dengan mudah dan rentan kontaminasi. Aquadest berbentuk cairan jernih, tidak berbau, dan tidak berasa (Santoso *et al.*, 2008). Air adalah eksipien yang sering digunakan dalam pembuatan produk farmasi dengan nilai spesifik 100% air juga merupakan pelarut yang bersifat polar. Pelarut air diharapkan menarik senyawa yang polar seperti tanin dan saponin (Kibble, 2000).

## K. Hewan Uji

Hewan uji merupakan hewan yang dipergunakan dalam setiap penelitian biologis maupun biomedis yang telah dipilih berdasarkan syarat atau setandar dasar yang diperlukan dalam penelitian tersebut. Dalam memperlakukan hewan uji harus telah mengetahui pengetahuan yang cukup mengenai berbagai aspek tentang sarana biologis, dalam hal pengetahuan perlakuan hewan uji laboratorium.

### 1. Sistematik hewan uji

Sistematika tikus menurut Depkes (2009), sebagai berikut :

Dunia	:Animalia
Filum	: Chordata
Sub Filum	: Vertebrata
Classis	: Mamalia
Sub Classis	: <i>Plasentalia</i>
Orde	: Rodentia
Familia	: <i>Muridae</i>
Genus	: <i>Rattus</i>
Species	: <i>Rattus norvegicus</i> .

### 2. Karakteristik utama tikus putih.

Tikus adalah hewan yang relative resisten terhadap infeksi dan tikus juga merupakan hewan yang cerdas. Pada umumnya tikus bila ditangani dengan benar tikus putih cenderung tenang dan mudah ditanganin, tikus juga merupakan hewan yang beraktivitas pada malam hari (noktual). Hewan ini tidak diperlakukan dengan kasar karena hewan ini dapat lebih agresif bila merasa terancam. Tikus biasanya memiliki suhu tubuh normal 37,5°C, tikus yang dikembang biakan dilaboratorium biasanya lebih cepat dewasa dan lebih mudah dikembang biakan, berat badan pada tikus biakkan dengan tikus liar biasanya berbeda dan berpengaruh.

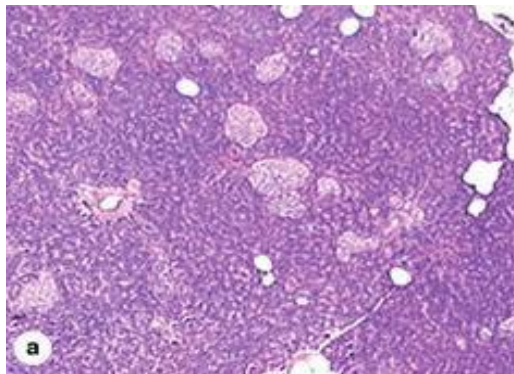
Tikus jantan lebih sering digunakan dan dipilih dalam penelitian karena mempunyai kondisi biologis dan sistem hormonal yang baik

daripada tikus betina, serta lebih tenag dan mudah dalam penanganan. Tikus jantan memiliki kemampuan kecepatan dalam metabolisme obat yang lebih cepat dibandingkan dengan tikus betina. Perbedaan antara tikus betina dan jantan terjadi karena hormon testosteron yang mengakibatkan peningkatan aktivitas metabolisme obat, sedangkan hormone estradiol dapat mengurangi kecepatan metabolisme obat-obatan tertentu. Galur yang digunakan yaitu tikus albino galur wistar karena merupakan salah satu hewan yang banyak dipelajari dalam ilmu pengetahuan (Myers, 2004).

## L. Histopatologi Organ Pankreas

### 1. Pengertian

Histopatologi merupakan studi yang mempelajari tentang tanda-tanda penyakit dengan menggunakan pemeriksaan mikroskopis. Pada histopatologi dapat dibedakan menjadi histopatologi jaringan normal, variasi proses penyakit dan perubahan-perubahan yang mungkin timbul sebagai hasil dari penelitian jaringan penyakit yang dilakukan (Rahayu *et al.*, 2015). Histopatologi ini memberikan suatu peranan yang penting pada pengujian toksikologi dan efek merugikan dari makanan, obat-obatan, bahan kimia, biologi dan perawatan medis sebagai evaluasi sensitif dan efisien pengamatan sementara pada jaringan tubuh dengan menggunakan mikroskop (Crissman *et al.*, 2004). Histopatologi pankreas dapat dilihat pada gambar 1.



**Gambar 1.** Pulau Langerhans merupakan kelompok sel-sel endokrin berwarna pucat terpendam di dalam jaringan asinar eksokrin pankreas (Mescher, 2010).

### 2. Struktur dan anatomi pankreas

Pankreas adalah suatu kelenjar eksokrin sekaligus juga endokrin, mempunyai konsistensi yang lunak karena banyak mengandung jaringan dan dibagi menjadi beberapa bagian yaitu koput, korpus dan kauda dimana memiliki berat rata-rata 80 g.

Secara fisiologis, pankreas berfungsi sebagai kelenjar eksokrin dan endokrin fungsi endokrin pankreas dilakukan oleh sekelompok sel yang disebut pulau Langerhans, yang menghasilkan hormon insulin dan glukagon, yang penting dalam metabolisme karbohidrat. Fungsi eksokrin dilakukan oleh kelenjar tubular, dan pankreas mengeluarkan 500 hingga 1.200 ml getah pankreas setiap hari ke duodenum (Katzung, 2012).

Pulau Langerhans terdiri dari tiga sel utama yakni sel alfa, sel beta dan sel delta yang dapat dibedakan satu sama lain melalui ciri morfologi dan pewarnaannya. Sel beta mencakup 60% dari sel Pulau Langerhans, sel ini berada di bagian tengah dari setiap Pulau dan mensekresikan insulin dan amilin. Sel alfa yang mencakup 25% dari seluruh sel, mensekresikan glukagon, sedangkan sel delta yang mencakup 10% dari seluruh sel mensekresikan somasostatin. Paling sedikit terdapat satu jenis sel lain yang disebut sel PP yang terdapat dalam jumlah yang kecil pada Pulau Langerhans yakni polipeptida pankreas. Hubungan yang erat antara berbagai jenis sel yang terdapat dalam Pulau Langerhans memungkinkan komunikasi dari sel-sel dan pengaturan secara langsung sekresi berbagai jenis hormon oleh hormon lainnya (Guyton & Hall, 2006).

### **3. Kerusakan pankreas**

Hewan percobaan yang diinduksi dengan streptozotoksin akan terjadi pembentukan radikal bebas melalui metabolisme oksidasi reduksi dan akan menyerang komponen penting pada sel seperti DNA (Suarsana *et al.*, 2010). Radikal ini akan mengakibatkan kerusakan pada sel beta pankreas sehingga pada Pulau Langerhans akan terlihat pengurangan jumlah massa sel, beberapa Pulau Langerhans mengalami kerusakan akan mengakibatkan ukurannya menjadi lebih kecil, hancur bahkan hilang. Sel beta yang mengalami kerusakan tidak mampu lagi menghasilkan insulin sehingga terjadi penyakit hiperglikemik (Asghar, 2014).

Penderita DM tipe 1 pada pankreas mengalami pengecilan ukuran (nekrosis), atrofi pada bagian eksokrin pankreas dan strofi sel sel disekitar Pulau Langerhans yang mengalami degenerasi. Pada DM tipe 2 yang terjadi adalah kurangnya kepekaan dari reseptor-reseptor insulin sehingga menyebabkan ketidak seimbangannya sekresi eksokrin pankreas dan gangguan kontrol glukosa darah (Philip, 2008).

#### 4. Histopatologi pankreas

Kerusakan pankreas akibat diabetes dibuktikan dengan perubahan morfologi pulau Langerhans, meliputi diameter, jumlah pulau, jumlah sel endokrin, dan persentase nekrosis sel. Penurunan massa sel beta pankreas kemungkinan disebabkan oleh kematian sel akibat efek toksik gula darah yang berlebihan dalam jangka waktu yang lama (Ridwan *et al.*, 2012). Kematian sel dapat terjadi karena stress oksidatif yang disebabkan karena peningkatan kadar kalsium intraseluler dan peningkatan beban produksi insulin oleh sel beta pankreas sebagai stimulus terhadap hiperglikemia (Farid *et al.*, 2014).

**4.1. Jumlah pulau langerhans.** Hewan percobaan DM akan mengalami penurunan jumlah Pulau Langerhans dibandingkan dengan hewan percobaan normal. Apabila jaringan pankreas normal diamati pada hewan percobaan, maka per lapang pandang pankreas ditemukan lebih dari dua buah Pulau Langerhans. Sedangkan pada hewan percobaan DM tipe 2 kadang-kadang tidak satupun Pulau Langerhans ditemukan (Andayani, 2003).

**4.2. Nekrosis.** Nekrosis adalah kematian sel akibat kerusakan fatal yang ditandai dengan kerusakan struktur dan fungsi sel secara menyeluruh yang diikuti lisis sel dan peradangan jaringan, sehingga timbul ruang kosong pada pulau Langerhans (Nurdiana, 1998). Nekrosis terjadi setelah hilangnya suplai darah atau paparan racun dan ditandai dengan pembengkakan sel, denaturasi protein, kerusakan organel, dan dapat menyebabkan kerusakan (Kumar *et al.*, 2007). Nekrosis membuat perubahan terutama terletak pada inti. Nekrosis memiliki tiga pola yaitu piknosis merupakan penyusutan atau pengerutan inti, warnah inti sel menjadi hitam dan mengakibatkan batas antar sel tidak jelas, karioreksis inti terfragmentasi yaitu inti yang terbagi atas fragmen-fragmen dan kariolisis yaitu pemudaran kromatin basofil akibat aktivase DNase (Lestari, 2011).

3P

#### M. Landasan Teori

Diabetes Melitus (DM) merupakan gejala klinik yang terjadi karena adanya gangguan metabolik yang meningkatkan kadar glukosa darah. Sel beta pankreas merupakan sekelompok sel yang menghasilkan hormon insulin yang sangat berpengaruh pada metabolisme glukosa di dalam tubuh sehingga mampu menurunkan kadar glukosa di dalam darah (Suarsana *et al.*, 2012).

Pada penderita DM yang ditandai dengan kenaikan kadar glukosa darah atau yang biasa disebut sebagai hiperglikemiak, pada penderita penyakit DM terjadi perubahan histopatologi Pulau Langerhans yang disebabkan oleh kondisi hiperglikemik. Hiperglikemik yang terjadi secara kronis akan mengakibatkan timbulnya glukotoksisitas pada sel-sel beta Pulau Langerhans. Glukotoksisitas akan menyebabkan disfungsi dan perubahan massa sel beta, sehingga terjadi penurunan sekresi insulin (Chen, 2008). Hal tersebut terjadi karena hiperglikemik pada penderita dapat memicu terjadinya pembentukan *reactive oxygen specific* (ROS) yang dapat menyebabkan stress oksidatif dan mempengaruhi pankreas (Setiawan & Suhartono, 2005).

Menurut Yuriska (2009) menyatakan bahwa penghambat pembentukan radikal bebas oleh antioksidan memberikan kesempatan bagi tubuh dalam memperbaiki sel dalam kerusakan dan kematian secara mandiri. regenerasi sel beta pankreas diawali dengan perbaikan pada sel sel beta pankreas dan pembelahan sel beta pankreas yang baru sehingga menyebabkan bertambahnya jumlah sel beta pankreas dan diharapkan dengan bertambahnya sel beta pankreas maka produksi insulin akan meningkat dan kadar glukosa darah akan berangsur-angsur menjadi membaik dan kemudian dapat normal kembali.

Hiperglikemik juga dapat ditandai dengan kerusakan sel beta pankreas yang menyebabkan terjadinya perubahan histopatologi Pulau Langerhans pankreas. Gambaran histopatologi pankreas pada kelompok tikus sehat kondisi Pulau Langerhans yang relatif rapat sedangkan pada tikus diabetes kondisi Pulau Langerhans mengalami kerusakan yang ditandai dengan adanya ruang-ruang kosong dibagian tengah Pulau Langerhans karena terjadinya nekrosis dan degenerasi sel-sel endokrin Pulau Langerhans (Ismi *et al.*, 2015).

Studi aktivitas antioksidan alami telah banyak dilakukan dengan menunjukkan bahwa antioksidan alami ternyata mampu melindungi tubuh dari kerusakan yang disebabkan oleh spesies oksigen reaktif dan menghambat penyakit degenerative. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa senyawa fenolik seperti flavonoid mempunyai aktivitas antioksidan penangkap radikal. Senyawa dan flavon menunjukkan sifat antihiperglikemik pada pengujian *in vivo* terhadap hewan uji tikus (Lukacinova, 2009).

Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai antihiperlipidemik dan diharapkan dapat meregenerasi sel-sel beta pankreas yang rusak sehingga defisiensi insulin dapat diatasi dan dapat memperbaiki sensitivitas reseptor insulin adalah biji kopi robusta yang telah digunakan secara empiris untuk pengobatan antivirus, antipasmodi, hepatoprotetik dan antidiabetes (Herawati, 2013; Farah *et al.*, 2006). Pada biji kopi memiliki kandungan senyawa kimia alkaloid, tanin, saponin dan polifenol (Chairgulprasert, 2017).

Biji kopi hijau robusta paling banyak mengandung asam klorogenat dibandingkan dengan biji kopi lainnya yaitu 6.1-11.3 g/100g dan akan mengalami penurunan dengan adanya pemanasan yaitu 3,3-3,8 g/100g (Farah & Donangelo, 2006). Senyawa lain yang terdapat pada biji kopi robusta adalah kafein yang merupakan golongan dari alkaloid, kafein yang terdapat pada biji kopi hijau robusta yaitu 1.5-2.5 g/100g dan akan meningkat dengan adanya pemanasan yaitu menjadi 2.4-2.5 g/100g (Farhaty, 2016).

Menurut Creswell (2005) kafein adalah suatu senyawa organik yang mempunyai nama lain 1,3,7-trimetilxantin, dimana kafein ini merupakan salah satu alkaloid golongan xantin yang merupakan senyawa kimia 2,6-dioksipurin atau 2,6-purinadion. Kristal kafein dalam air berupa jarum-jarum bercahaya sutra. Bila tidak mengandung air, kafein meleleh pada suhu 234°C sampai 239°C dan menyublim pada suhu yang lebih rendah. Kafein mudah larut dalam air panas dan dalam kloroform, tetapi sedikit larut dalam air dingin, alkohol dan beberapa pelarut organik lainnya (Budiman, 2015).

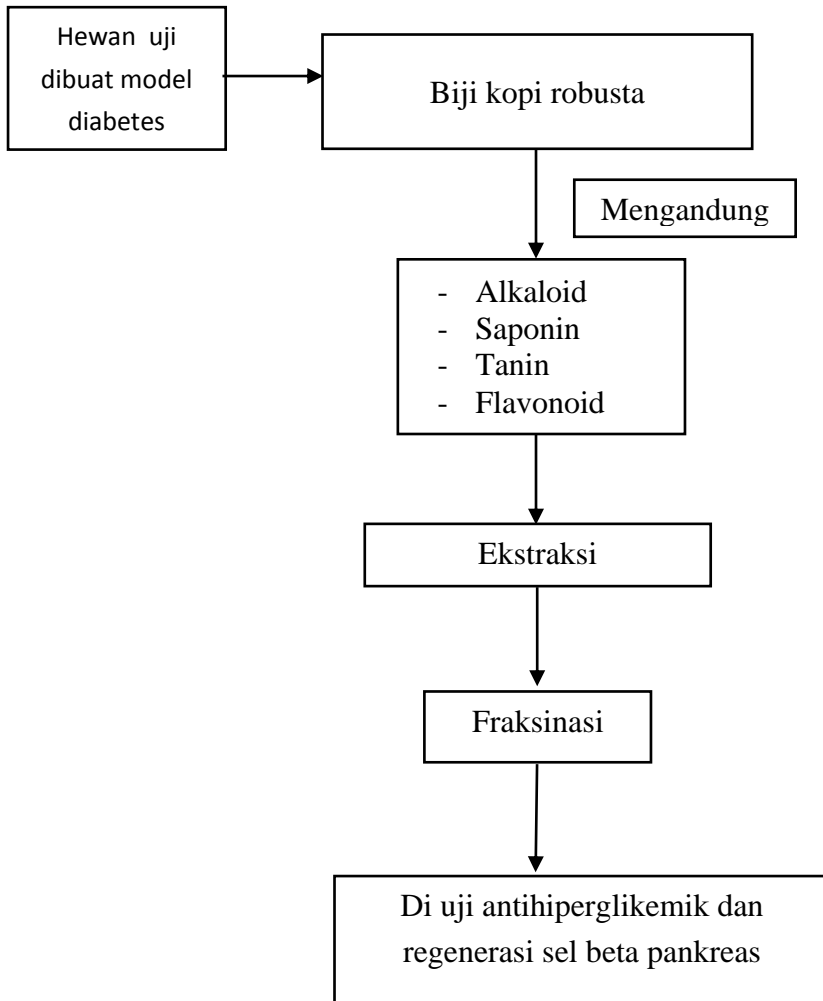
Ekstraksi dengan pelarut didasarkan pada sifat kepolaran zat dalam pelarut saat ekstraksi. Senyawa polar hanya akan larut pada polar, seperti metanol, etanol, butanol dan air. Senyawa non polar hanya akan larut pada pelarut non polar, seperti kloroform dan heksana (Gritter *et al.*, 1991). Jenis dan mutu pelarut yang digunakan menentukan keberhasilan proses ekstraksi. Pelarut yang digunakan harus dapat melarutkan zat yang diinginkan, mempunyai titik didih yang rendah, murah, tidak toksik dan tidak mudah terbakar (Harborne, 1987). Fraksinasi cair-cair merupakan metode untuk mendapatkan komponen bahan alam murni bebas dari komponen kimia lain yang tidak dibutuhkan. Fraksinasi diharapkan akan meningkatkan khasiat senyawa aktif dalam ekstrak (Srijanto *et al.*, 2012). Dari penelitian yang dilakukan oleh (Vifta & Mafitasari, 2020) menyatakan Etil asetat



yang merupakan pelarut semi polar mampu menarik senyawa-senyawa dengan rentang polaritas lebar dari polar hingga nonpolar. Pelarut etil asetat dapat bercampur dengan eter, etanol, dan kloroform. Sehingga sering digunakan untuk menarik senyawa-senyawa seperti flavonoid, alkaloid, saponin, tanin polifenol dan triterpenoid. Sehingga etil asetat diharapkan dapat menarik senyawa polifenol yang ada pada biji kopi robusta.

### N. Kerangka Konsep.

Berikut ini merupakan konsep penelitian aktivitas antihiperqlikemika dan regenerasi sel beta pankreas dari fraksi biji kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap tikus putih jantan yang diinduksi streptozotosin-nikotinamid :



Gambar 2. Sekema kerangka konsep

### O. Hipotesis

Berdasarkan tinjauan pustaka dan landasan teori yang ada dalam penelitian ini maka hipotesis dapat disusun sebagai berikut:

1. Ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan dosis 2,41 mg/kg BB mencit memiliki aktifitas sebagai antihiperglikemik.
2. Fraksi biji kopi robusta (*Coffea canephora*) memiliki aktivitas antihiperglikemik ditinjau dari penurunan kadar glukosa darah mencit.
3. Terdapat dosis efektif pada ekfiltrat fraksi teraktif biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dalam menurunkan glukosa darah tikus.
4. Ekstrak dan fraksi biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dapat mempengaruhi regenerasi sel beta pankreas pada tikus putih jantan yang diinduksi Streptozotosin-Nikotinamid.