

**AKTIVITAS ANTIHIPERGLIKEMI DAN REGENERASI SEL β
PANKREAS DARI EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL ASETAT
DAUN KERSEN (*Muntingia calabura*) PADA TIKUS DIABETES YANG
DIINDUKSI STREPTOZOTOSIN-NIKOTINAMID**

TESIS



Oleh:

**Septian Maulid Wicahyo
SBF051310060**

**PROGRAM STUDI S2 FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

**AKTIVITAS ANTIHIPERGLIKEMI DAN REGENERASI SEL β
PANKREAS DARI EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL ASETAT
DAUN KERSEN (*Muntingia calabura*) PADA TIKUS DIABETES YANG
DIINDUKSI STREPTOZOTOSIN-NIKOTINAMID**



Oleh:

Septian Maulid Wicahyo
SBF051310060

PROGRAM STUDI S2 FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018

PENGESAHAN TESIS
berjudul

**AKTIVITAS ANTIHIPERGLIKEMIA DAN REGENERASI SEL β
PANKREAS DARI EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL ASETAT
DAUN KERSEN (*Muntingia calabura*) PADA TIKUS DIABETES YANG
DIINDUKSI STREPTOZOTOSIN-NIKOTINAMID**
oleh

Nama : Septian Maulid Wicahyo

NIM : SBF051310060

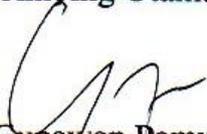
Dipertahankan di hadapan Dewan Penguji Tesis
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 7 Maret 2018



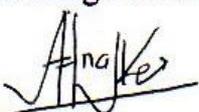
Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi
Dekan,

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

Pembimbing Utama,


Dr. Gunawan Pamudji W., M.Si., Apt.

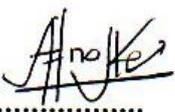
Pembimbing Pendamping,


Dr. Ana Indrayati, M.Si.

Dewan Penguji

1. Dr. Gunawan Pamudji W., M.Si., Apt.
2. Dr. Ana Indrayati, M.Si.
3. Dr. Rina Herowati, M.Si., Apt.
4. Dr. Wiwin Herdwiani, M.Sc., Apt.

1.....


2.....


3.....

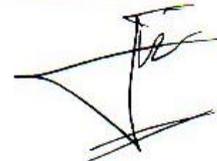

4.....


PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan ~~tidak~~ terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di ~~suatu~~ perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau ~~pendapat~~ yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara ~~tertulis~~ diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila tesis ini merupakan jiplakan dari penelitian/ karya ilmiah/ skripsi/ ~~tesis~~ disertasi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademisi maupun hukum.

Surakarta, 27 Maret 2018



Septian Maulid Wicahyo

PERSEMBAHAN

"Be a loner. That gives you time to wonder, to search the truth. Have holy curiosity. Make your live worth living." (Albert Einstien)

"you never fail until you stop trying" (Albert Einstein)

"the hardest walk you can make is the walk you make alone, but that is the walk that makes you the strongest" (Fearless Motivation)

"keep thinking and get hurt by it. Keep struggling then get nothing from it. Keep praying and waiting and waiting... if it's not like that, then that's not genuine."

The writer done this assignment not for anybody nor for the writer self.

This thesis is just another assignment from another.

This is done then it is done, no deep meaning whatsoever.

of course the writer aware of the higher consciousness and thanked for the unlimited guidances.

After this, it's just another gate to the new things.

And, of course, the writer aware and will ready for those.

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan ke hadapan Tuhan, atas segala berkat anugrah dan kasihnya yang membuat penulis tetap kuat dan semangat dalam menyelesaikan tesis dengan judul " AKTIVITAS ANTIHIPERGLIKEMI DAN REGENERASI SEL β PANKREAS DARI EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL ASETAT DAUN KERSEN (*Muntingia calabura*) PADA TIKUS DIABETES YANG DIINDUKSI STREPTOZOTOSIN-NIKOTINAMID" ini. Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Magister Sains pada program Pascasarjana Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

Penulis menyadari selama proses observasi, penelitian hingga pada penyusunan tesis ini tidak lepas dari bimbingan, dorongan, dan bantuan baik materi, moril dan spiritual dari banyak pihak. Melalui kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr. Djoni Tarigan, MBA, selaku Rektor Universitas Setia Budi.
2. Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Dr. Gunawan Pamudji W, M.Si., Apt., selaku pembimbing utama yang selalu mengingatkan, membantu, menyemangati dan mengarahkan penulis.
4. Dr. Ana Indrayati, M.Si., selaku pembimbing pendamping yang selalu membantu dalam pemahaman naskah, mengoreksi isi naskah, mengingatkan materi dalam naskah.

5. Dr. Rina Herowati, M.Si., Apt., sebagai penguji satu yang membantu banyak dalam pengoreksian, kelaiakan dan kepantasan Tesis ini.
6. Dr. Wiwin Herdwiani, M.Sc., sebagai penguji dua yang membantu banyak koreksi isi dari Tesis ini.
7. Seluruh staf pengajar Pascasarjana Farmasi yang telah banyak memberikan ilmu dan pengetahuannya.
8. Reinhard Bee dan Margareta Ida, sebagai wali penulis yang banyak membantu mengarahkan pemikiran, motivasi dan menguatkan penulis.
9. Kang Bey Rangga Carita, sebagai guru yang selalu memberikan bantuan materi, moril dan spiritual kepada penulis.
10. Civitas Akademika Universitas Setia Budi Surakarta

Mengingat keterbatasan pengalaman, pengetahuan maupun pustaka yang ditinjau, penulis menyadari bahwa tesis ini masih sangat banyak kekurangan dan perlu pengembangan lebih lanjut agar bermanfaat, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran dari pembaca agar tesis ini menjadi lebih baik.

Akhir kata, penulis berharap tesis ini memberikan secuil informasi yang bermanfaat bagi mereka yang membutuhkan terutama untuk pengembangan ilmu pengetahuan kefarmasian.

Surakarta, 27 Maret 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
INTISARI.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah.....	7
C. Tujuan Penelitian	7
D. Keaslian Penelitian.....	8
E. Kegunaan penelitian.....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
A. Tumbuhan Kersen (<i>Muntingia calabura</i>).....	9
1. Kedudukan taksonomi.....	10
2. Morfologi tumbuhan kersen.....	10
3. Nama lain tumbuhan kersen.....	10
4. Kegunaan tumbuhan kersen.....	11
5. Kandungan kimia.....	11
5.1.Flavonoid.....	11
5.2.Alkaloid.....	12
5.3.Tanin.....	12
5.4.Steroid.....	12

5.5.Glikosida.....	12
5.6.Saponin.....	13
5.7.Polifenol.....	13
B. Pankreas dan Islet Langerhans.....	13
C. Diabetes Melitus.....	15
1. Definisi DM.....	15
2. Klasifikasi DM.....	15
2.1.DM tipe I.....	15
2.2.DM tipe II.....	15
2.3.DM tipe lain.....	16
2.4.Diabetes gestasional.....	16
3. Patofisiologi DM.....	16
4. Komplikasi DM.....	17
5. Status Oksidatif DM.....	18
6. Terapi DM.....	19
6.1.Golongan sulfonilurea.....	19
6.2.Golongan biguanid.....	20
6.3.Golongan meglitinid.....	21
6.4.Golongan thiazolidin atau glitazon.....	21
6.5.Golongan inhibitor α -glukosidase.....	22
D. Stres Oksidatif.....	22
1. Radikal Bebas.....	22
2. ROS (<i>Reactive Oxygen Species</i>).....	24
3. RNS (<i>Reactive Nitrogen Species</i>).....	25
4. Mekanisme stres oksidatif yang diinduksi hiperglikemia.....	26
5. Hubungan antara aktivitas antioksidan dengan regenerasi sel β pankreas.....	27
E. Metode Uji Aktivitas Antidiabetes.....	29
1. Metode induksi diabetes tikus uji.....	29
1.1.Diabetes yang diInduksi senyawa kimia.....	29
1.2.Induksi resistensi insulin.....	30
2. Metode analisa kadar glukosa darah.....	31
2.1.Metode glukometer.....	31
2.2.Metode <i>glucose dehidrogenase</i> (GLUC-DH).....	31
2.3.Metode GOD-PAP.....	31
2.4.Metode O-toludine.....	32
F. Antioksidan.....	32
1. Pengertian antioksidan.....	32
2. Jenis-jenis antioksidan.....	32

2.1.Antioksidan endogen.....	32
2.2.Antioksidan eksogen.....	33
3. Mekanisme kerja antioksidan.....	33
3.1.Antioksidan primer.....	33
3.2.Antioksidan sekunder.....	34
3.3.Antioksidan tersier.....	34
4. Metode uji aktivitas antioksidan.....	34
4.1.MDA scavenging assay.....	34
4.2.SOD activity assay.....	35
4.3.Glutathione peroxidase activity assay.....	36
G. Streptozotosin dan nikotinamid.....	37
H. Hewan Uji.....	41
1. Sistematika tikus.....	41
2. Karakteristik utama tikus putih.....	41
I. Simplisia dan Metode Penyarian.....	42
1. Simplisia.....	42
2. Ekstraksi.....	42
3. Metode ekstraksi.....	43
3.1.Infundansi.....	43
3.2.Soxhletasi.....	43
3.3.Metode maserasi.....	44
3.4.Metode perkolasi.....	44
4. Fraksinasi.....	44
5. Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	45
6. Cairan penyari.....	45
J. Histopatologi Organ Pankreas.....	46
1. Pengertian histopatologi.....	46
2. Kerusakan pankreas.....	47
3. Nekrosis.....	47
4. Metode pembuatan preparat histologi.....	48
K. Landasan Teori.....	49
L. Hipotesis.....	52
BAB III METODE PENELITIAN.....	53
A. Rancangan Penelitian.....	53
B. Subyek dan Lokasi Penelitian.....	53
C. Populasi dan Sampel.....	54
D. Variabel Penelitian.....	54
1. Identifikasi variabel penelitian.....	54
2. Definisi operasional.....	55

E. Kerangka Konsep Penelitian.....	57
F. Bahan dan Alat.....	58
1. Bahan.....	58
2. Alat.....	58
3. Hewan percobaan.....	58
G. Jalannya penelitian.....	59
1. Pengambilan bahan.....	59
2. Identifikasi daun kersen.....	59
3. Pengeringan daun kersen.....	59
4. Pembuatan serbuk daun kersen.....	59
5. Penetapan susut pengeringan serbuk daun kersen.....	59
6. Pembuatan ekstrak etanol daun kersen.....	60
7. Pembuatan fraksi etil asetat daun kersen.....	60
8. Identifikasi flavonoid fraksi-fraksi ekstrak etanol daun kersen.....	61
9. Pembuatan suspensi Na CMC 0,5%.....	61
10. Pembuatan suspensi ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kersen.....	62
11. Pembuatan larutan streptozotosin dan nikotinamid.....	62
12. Persiapan dan perlakuan hewan percobaan.....	62
13. Pengukuran kadar glukosa darah hewan percobaan.....	64
14. Preparasi jaringan dan pembuatan homogenat jaringan.....	64
15. Pengujian aktivitas SOD.....	65
16. Pengujian aktivitas GPx.....	65
17. Pengujian penurunan kadar MDA.....	67
18. Pembuatan dan pengamatan preparat histologi.....	67
H. Analisa Hasil.....	68
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	72
A. Hasil penelitian.....	72
1. Identifikasi Daun Kersen.....	72
2. Pengumpulan Bahan dan Pembuatan Serbuk Simplisia Daun Kersen.....	72
3. Hasil Penetapan susut pengeringan Serbuk Daun Kersen.....	72
4. Hasil Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kersen.....	73
5. Hasil Fraksinasi Ekstrak Etanol Daun Kersen.....	74
6. Hasil Identifikasi Senyawa Flavonoid.....	74
7. Hasil Pengukuran Berat Badan Tikus.....	77

8. Hasil penentuan Rata-rata Kadar Glukosa Darah Tikus.....	80
9. Hasil penentuan AUC dari rata-rata kadar glukosa darah.....	84
10. Hasil Pengukuran Aktivitas Enzim SOD, GPx dan kadar MDA.....	86
11. Hasil Pengamatan Preparat Histologi Organ Pankreas dengan Pewarnaan Hematoksilin Eosin.....	89
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	101
A. Kesimpulan.....	101
B. Saran.....	101
RINGKASAN.....	102
DAFTAR PUSTAKA.....	108
LAMPIRAN.....	116

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
1. Pankreas dan Pulau Langerhans.....		14
2. Generasi Spesies Reaktif pada Diabetes.....		28
3. Struktur Streptozotosin, Glukosa, N-asetil glukosamin dan Metilnitrosurea.....		38
4. Mekanisme Streptozotosin Merusak Sel β Pankreas.....		40
5. Kerangka Konsep Penelitian.....		57
6. Skema Pembuatan Ekstrak etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Kersen.....		69
7. Alur Penelitian Terhadap Tikus Uji.....		70
8. Skema Pembuatan Preparat Histopatologi Pankreas Tikus Uji.....		71
9. Kromatogram Identifikasi Flavonoid Fraksi Etil Asetat dan Fraksi Heksane.....		75
10. Kromatogram Identifikasi Flavonoid Fraksi Air.....		76
11. Grafik Rata-rata Berat Badan Tikus Dari Awal Adaptasi Hingga Hari ke-18.....		79
12. Grafik Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Kersen Terhadap Glukosa Darah Tikus.....		82
13. Foto preparat jaringan pankreas kelompok I dengan pewarnaan HE.....		90
14. Foto preparat islet langerhans kelompok II dengan pewarnaan HE.....		91
15. Foto preparat islet langerhans kelompok III dengan pewarnaan HE.....		93
16. Foto preparat islet langerhans kelompok IV dengan pewarnaan HE.....		95
17. Foto preparat islet langerhans kelompok V dengan pewarnaan HE.....		96
18. Foto preparat islet langerhans kelompok VI dengan pewarnaan HE.....		99
19. Foto preparat islet langerhans kelompok VII dengan pewarnaan HE.....		100

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Penetapan Susut Pengerinan Serbuk Daun Kersen.....	71
2. Randemen Ekstrak Etanol Daun Kersen.....	71
3. Randemen Fraksi Daun kersen.....	72
4. Luas AUC total Rata-rata Kadar Glukosa Darah Tikus (mg.dl ⁻¹ .h).....	88
5. Rata-rata Hasil Pengukuran Enzim SOD, GPx, dan Penurunan Kadar MDA Pada Hati Tikus.....	92

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil determinasi tanaman kersen	116
2. Surat keterangan pembuatan preparat pankreas	117
3. Hasil Pembuatan Ekstrak Maserasi Daun Kersen.....	118
4. Perhitungan Dosis Glibenklamid.....	118
5. Perhitungan Dosis Terhadap Hewan Uji.....	119
6. Pengolahan Data Berat Badan Tikus.....	120
7. Perhitungan pembuatan larutan stok ekstrak dan fraksi daun kersen.....	121
8. Penentuan Kadar Glukosa Darah dengan GOD-PAP.....	123
9. Perhitungan Rata-rata Kadar Glukosa Darah.....	124
10. Perhitungan AUC dari Rata-rata Kadar Glukosa.....	125
11. Penentuan Aktivitas Enzim Antioksidan SOD dan GPx dan Kadar SOD.....	127
12. Hasil Uji Statistik Kadar Glukosa Darah T4.....	128
13. Hasil Uji Statistik Aktivitas SOD Hati Tikus.....	130
14. Kumpulan foto saat praktek.....	131

INTISARI

WICAHYO, S., M., 2018, AKTIVITAS ANTIHIPERGLIKEMI DAN REGENERASI SEL β PANKREAS DARI EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL ASETAT DAUN KERSEN (*Muntingia calabura*) PADA TIKUS DIABETES YANG DIINDUKSI STREPTOZOTOSIN, TESIS, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Kadar glukosa darah dan aktivitas antioksidan yang normal adalah kunci yang dapat mencegah diabetes melitus dan komplikasinya. Beberapa tanaman herbal memiliki aktivitas tersebut. Tanaman kersen (*Muntingia calabura*) adalah tumbuhan di sekitar kita yang memiliki kegunaan empiris, salah satunya menurunkan glukosa darah. Tujuan penelitian untuk mengetahui aktivitas daun kersen dalam menurunkan glukosa darah, meningkatkan aktivitas enzim antioksidan dan memperbaiki pulau langerhans.

Empat puluh dua tikus galur Wistar Jantan berumur 16-18 bulan dengan berat 180-200 g diinduksi diabetes menggunakan streptozotosin dan dibagi secara acak. Kelompok I kontrol normal, kelompok II kontrol negatif, kontrol III kontrol positif menggunakan glibenklamid, kelompok IV dan V uji ekstrak etanol daun kersen 250 dan 350 mg/kg bb dan kelompok VI dan VII uji fraksi etil asetat 250 dan 350 mg/kg bb. Perlakuan dilakukan secara oral sekali sehari selama 18 hari. Kadar glukosa diukur pada hari ke-1, ke-4, ke-11 dan ke-18.

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak dan fraksi dapat menurunkan kadar glukosa darah dengan fraksi etil asetat 350 mg/kg bb menurunkan paling tinggi (tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif) dan keduanya dapat meningkatkan aktivitas enzim SOD, GPx dan menurunkan kadar MDA serta memperbaiki islet langerhans pankreas. Kesimpulannya ekstrak dan fraksi daun kersen memiliki aktivitas antihiperqlikemia dan regenerasi islet pankreas.

Kata kunci: antihiperqlikemia, sel β pankreas, *Muntingia calabura*, ekstrak etanol, fraksi etil asetat.

ABSTRACT

WICAHYO, S.,M., 2018, ANTIHYPERGLICEMIC AND REGENERATION PANCREATIC β CELL ACTIVITY FROM KERSEN LEAVES (*Muntingia calabura*) ETHYL ACETATE FRACTION AND ETHANOL EXTRACT ON DIABETIC RATS BY STREPTOZOTOCIN, THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Balance blood glucose concentration and antioxidant activity are keys to prevent Diabetes Melitus and its complications. Kersen (*Muntingia calabura*) a plant that have empirical usage for reducing blood glucose that can do both. This study's purposes are for observing leaves extract and fraction effects in reducing blood glucose and langerhans islet regeneration.

Forty two Wistar male white rats of 16-18 weeks with weight 180-200 g were made diabetes with streptozotosin and randomly divided into 7 groups. Group I as normal rats, group II diabetic rats, group III diabetic with glibenclamid treatment, group IV dan V treated by ethanol extract 250 and 350 mg/kg BW and group VI and VII treated by ethil acetate fraction 250 dan 350 mg/kg BW. treatment had done orally once a day within 18 days. Blood glucose was measured on the 1st, 4th, 11th and 18th day.

This study had shown extract and fraction were able reducing blood glucose whereas ethil acetat 350 mg/kg BW has the highgest activity (not significantly different with positive control) and both could improving SOD and GPx activity and reducing MDA concentration and regenerating pancreatic langerhans islet.

Keywords: antihyperglycemic, regeneration, pancreatic β -cell, *Muntingia calabura*, ethanol extract, ethyl acetate fraction.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Diabetes mellitus (DM) merupakan sindrom metabolik yang umumnya ditandai dengan hiperglikemia, resistensi insulin dan kekurangan insulin. Terjangkitnya penyakit tersebut merupakan reaksi dari beberapa faktor seperti genetik, lingkungan, gaya hidup dan umur. Penyakit ini semakin meningkat prevalensinya di dunia dari tahun ke tahun karena perubahan gaya hidup, pola makan yang kaya karbohidrat dan lemak tapi kurang serat. Pasien terdiagnosa DM tipe 2 biasanya setelah terjadi komplikasi terutama pada daerah-daerah minim sumber daya (Abdulfatai *et al.*, 2012). Berdasarkan hasil RISKEDAS (Riset Kesehatan Dasar) tahun 2007 hingga 2013 yang dipaparkan oleh Kementerian Kesehatan, menunjukkan ada peningkatan pada jumlah penderita DM dan pada tahun 2013, jumlah penderita DM di pemukiman pedesaan tidak lagi lebih rendah dibandingkan perkotaan. WHO juga memprediksi bahwa Indonesia sebagai negara nomor 4 di dunia dengan jumlah penderita DM sebesar 21,3 juta pada tahun 2030, setelah India, Cina dan Amerika Serikat (Kemenkes RI, 2014).

Kadar gula darah yang selalu tinggi (hiperglikemia) dapat menyebabkan stres oksidatif karena tubuh terus –menerus dipaparkan pada keadaan kadar gula darah tinggi dalam jangka waktu lama sehingga menyebabkan perubahan metabolisme akibat keadaan tersebut.. Stres oksidatif diperkirakan menjadi salah faktor yang nantinya akan mengakibatkan komplikasi lanjut seperti gangguan

mikrovaskular, gangguan toleransi glukosa, resistensi insulin, disfungsi sel β pankreas dan disfungsi mitokondria. Stres oksidatif adalah suatu keadaan lingkungan dari sistem biologis dimana kadar oksidan (seperti *Reactive Oxygen Species/ ROS*) jauh meningkat melebihi kadar antioksidan di tubuh sehingga mengganggu aktivitas seluler. ROS yang tinggi menyebabkan perubahan lingkungan sistem biologis dalam tubuh dan merusak komponen-komponen sel seperti DNA dan protein. ROS secara spesifik merusak sel β pankreas dan merubah protein reseptor insulin pada sel mengakibatkan kurang sensitifnya reseptor apabila berikatan dengan insulin (Joseph *et al.* 2003). Keadaan tersebut disebabkan utamanya karena pola makan kurang sehat dan kurang aktivitas fisik (Aklima *et al.*, 2010).

Stres oksidatif dapat dicegah salah satunya dengan meningkatkan kadar antioksidan ke dalam tubuh selain dengan mengubah pola hidup menjadi lebih baik. Antioksidan adalah senyawa yang khusus memerangi oksidan-oksidan berbahaya yang mengancam tubuh kita. Antioksidan bekerja dengan mengikat radikal-radikal bebas sehingga membuat senyawa racun tersebut menjadi kurang reaktif. Antioksidan secara umum dikelompokkan menjadi antioksidan endogen dan eksogen. Antioksidan endogen yaitu sejumlah komponen protein dan enzim yang disintesis dalam tubuh yang berperan dalam menangkal oksidasi oleh radikal bebas. Antioksidan endogen dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok enzimatis (*Superoxide Dismutase*, katalase dan *Glutathione Peroxidase*) dan non-enzimatis (tokoferol, karotenoid, flavonoid, quinon, bilirubin, asam askorbat, asam urat, protein pengikat logam, dan protein pengikat heme) (Winarsi, 2007).

Kersen atau talok (*Muntingia calabura*) adalah salah satu tanaman yang memiliki efek antioksidan dan menurunkan kadar gula darah. Buah kersen dipercaya dapat menyembuhkan penyakit seperti hipertensi, asam urat dan DM. Penelitian tentang buah kersen sebagai antidiabetes dan antioksidan tersebut telah dilakukan oleh Rakhmi (2008). Hasil penelitiannya menunjukkan terjadinya penurunan kadar gula darah dan menghambat kerusakan sel-sel β pankreas pada hewan uji yang diinduksi aloksan karena, ekstrak tersebut mengandung flavonoid yang berperan sebagai antioksidan.

Penelitian yang dilakukan Sridhar (2011) menunjukkan ekstrak etanol daun kersen dengan dosis 500 mg/kg bb tikus uji dapat memberikan efek penurunan kadar gula darah dengan hasil signifikan terhadap tikus uji yang diinduksi aloksan. Ekstrak etanol daun kersen tersebut dapat menurunkan kadar gula darah hewan uji sebesar 26,47 % dan pemberian glipizide 5 mg/ kg bb sebesar 36,75 % dalam rentang waktu 6 jam. Peneliti juga meneliti ekstrak etanol daun kersen terhadap gula darah tikus normal dimana tikus dipuasakan sebelum diambil darahnya. Hasil penelitian menunjukkan dosis 500 mg/kg bb memberikan efek penurunan kadar gula darah sebesar 18,05 % dalam rentang waktu 6 jam secara progresif kemudian kembali normal pada jam ke-8 dan induksi glipizide 5 mg/kg bb menurunkan gula darah tikus sebesar 21,4 % dalam rentang waktu 2 jam. Peneliti mengemukakan bahwa mungkin ekstrak etanol daun kersen tersebut memberikan efek stimulan terhadap sel β pankreas yang masih sehat untuk mensekresikan insulin atau meningkatkan pemasukan glukosa ke dalam sel. Peneliti juga menegaskan bahwa

daun kersen memiliki aktivitas antidiabetes karena senyawa flavonoid yang terkandung didalamnya.

Vembriarto dan Rahmat (2014) melakukan penelitian ekstrak etanol buah kersen terhadap kadar gula darah tikus putih yang diinduksi Streptozotosin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol buah kersen dengan dosis 100 mg/kg berat badan mampu menurunkan kadar gula darah tikus hingga 109 mg/dl (\pm 37,23) dimana 2 minggu sebelum ekstrak diberikan kadar gula darah tikus tersebut adalah 513 mg/dl (\pm 102,38) . Pemberian ekstrak etanolik buah kersen diberikan selama 2 minggu sebanyak 2 ml dengan 3 seri dosis yang diberikan yaitu 100 mg/kg bb, 200 mg/kg bb dan 400 mg/kg bb. Verdayanti (2009) mengemukakan bahwa buah kersen mengandung bahan yang dapat menurunkan kadar gula darah yang mekanismenya menghambat penyerapan gula di usus dan mempercepat proses pencernaan sehingga karbohidrat yang diserap lebih sedikit jumlahnya.

Penelitian daun kersen sebagai antioksidan dan antidiabetes pernah dilakukan oleh Yadaf *et al.* (2013) dengan membuat ekstrak kental menggunakan pelarut air, etanol, eter dan kloroform. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa ekstrak etanol dan air karena memiliki aktivitas antioksidan tinggi karena kedua ekstrak tersebut tinggi akan senyawa fenolik dan flavonoid. Kedua ekstrak tersebut juga dapat menurunkan kadar gula darah dimana dosis yang diberikan 250 mg/kg bb, 500 mg/kg bb dan 1000 mg/kg bb tikus selama 2 minggu dengan tikus diberi injeksi streptozotosin. Penurunan kadar gula tikus berbanding lurus dengan dosis yang diberikan. Berat badan semua tikus uji (kecuali kontrol negatif) mengalami kenaikan.

Rinakit (2011) melakukan penelitian menggunakan fraksi etil asetat dengan 3 macam dosis (60, 120 dan 240 mg/kg bb) yang diberikan ke mencit. Penelitian ini menggunakan hewan uji mencit yang diinduksi aloksan. Hewan uji dibagi menjadi 5 kelompok, kontrol negatif (hanya induksi DM), kontrol positif (menggunakan glibenklamid 1,3 mg/kg bb), fraksi etil asetat dosis 60 mg/kg bb, fraksi etil asetat dosis 120 mg/kg bb dan fraksi etil asetat dosis 240 mg/kg bb. Hasil penelitian menunjukkan persen penurunan gula darah pada semua kelompok adalah kontrol negatif (6,05%), kontrol positif (42,19%), fraksi etil asetat dosis 60 mg/kg bb (39,04%), fraksi etil asetat dosis 120 mg/kg bb (52,17%) dan fraksi etil asetat dosis 240 mg/kg bb (69,52%). Pada uji LSD didapat nilai signifikansi $p < 0,05$ pada dosis 240 mg/kg bb memberikan efek penurunan yang bermakna (69,52 %) dibandingkan kontrol positif (glibenklamid 1,3 mg/kg bb) (42,19 %) dan dosis 120 mg/kg bb memberikan efek penurunan yang tidak bermakna terhadap kontrol positif (52,17 %) dan dosis 60 mg/kg bb pun demikian (39,04 %). Peneliti mengemukakan bahwa fraksi etil asetat daun kersen mengandung kalkon, isoliquiritigenin, kirsin dan flavonoid yang diduga bekerja secara sinergis menurunkan kadar glukosa darah mencit.

Zainul *et al.* (2016) mengemukakan daun kersen mengandung flavonoid kaempferol, quercetin, kirsin, quersitrin dan rutin. Ekstrak metanol dan fraksi etil asetat daun kersen mengandung flavonoid-flavonoid tersebut. Flavonoid-flavonoid tersebut terbukti memiliki aktivitas penurun kadar glukosa darah pada tikus yang terinduksi DM, memperbaiki aktivitas enzim antioksidan dan membantu perbaikan sel β pankreas. Senyawa-senyawa flavonoid tersebut berkontribusi memberikan

aktivitas penurun glukosa darah dengan meningkatkan penyerapan glukosa ke jaringan otot rangka melalui GLUT-4, meningkatkan ekspresi GLUT-4 di otot rangka, menurunkan penyerapan glukosa darah di usus dengan menghambat GLUT-2 di usus, menghambat jalur-jalur apoptosis sel β pankreas, menurunkan stres oksidatif, meningkatkan produksi insulin melalui jalur depolarisasi sel β dengan penyerapan ion kalsium, meningkatkan aktivitas enzim antioksidan dan merangsang proliferasi sel β (Ramachandran & Baojun, 2015).

Berdasarkan penelitian terdahulu tentang aktivitas antihiperglikemia dan antioksidan daun kersen, maka peneliti tertarik untuk meneliti fraksi etil asetat dan ekstrak etanol dari daun kersen sebagai sebagai antihiperglikemia dan regenerasi pada sel β pankreas tikus yang diinduksi kombinasi streptozotosin-nikotinamid.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan penjelasan tentang aktivitas fraksi etil asetat dan ekstrak etanol daun kersen sebagai antihiperglikemia dan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan dalam memperbaiki sel β pankreas pada keadaan DM. Hasil penelitian ini nantinya dapat digunakan dalam pemanfaatan sediaan obat tradisional antidiabetes dan sebagai terapi pencegahan terjadinya komplikasi yang disebabkan stres oksidatif yang diinduksi hiperglikemia.

B. Perumusan Masalah

Dari latar belakang tersebut dapat dirumuskan permasalahan yang akan diteliti yaitu :

1. Apakah fraksi etil asetat dan ekstrak etanol daun kersen mempunyai aktivitas antihiperqlikemia terhadap tikus yang diinduksi streptozotosin?
2. Apakah fraksi etil asetat dan ekstrak etanol daun kersen dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan SOD, GPx dan menurunkan kadar MDA?
3. Apakah fraksi etil asetat dan ekstrak etanol daun kersen dapat membantu regenerasi sel β pankreas?

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang ada, maka tujuan penelitian yang akan dilakukan yaitu:

1. Untuk mengetahui aktivitas antihiperqlikemia dari fraksi etil asetat dan ekstrak etanol daun kersen.
2. Untuk mengetahui kemampuan fraksi etil asetat dan ekstrak etanol daun kersen dalam meningkatkan aktivitas enzim antioksidan SOD dan GPx dan meurunkan kadar MDA.
3. Untuk mengetahui aktivitas regenerasi sel β pankreas oleh fraksi etil asetat dan ekstrak etanol daun kersen.

D. Keaslian Penelitian

Penelitian tentang fraksi etil asetat daun kersen sebagai antidiabetes pada mencit DM yang diinduksi aloksan pernah dilakukan dilakukan oleh Rinakit (2011). Penelitian tersebut menggunakan fraksi etil asetat dengan 3 macam dosis (60, 120 dan 240 mg/kg bb) yang diberikan ke mencit.

Penelitian tentang aktivitas fraksi etil asetat dan ekstrak etanol daun kersen sebagai sebagai pembantu regenerasi sel β pada pankreas pada tikus DM yang diinduksi menggunakan streptozotosin-nikotinamid lalu meninjau aktivitas SOD, GPx dan kadar MDA belum pernah dilakukan. Penelitian ini akan menggunakan preparat histologi untuk melihat tingkat kekuatan regenerasi sel β pankreas dan aktivitas enzim antioksidan SOD dan Gpx dan penurunan kadar MDA.

E. Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengetahui efek penurunan kadar glukosa darah, pengaruhnya terhadap enzim antioksidan dan tingkat kekuatan regenerasi sel β pankreas dari daun kersen pada keadaan DM. Diharapkan pula dari penelitian ini dapat meningkatkan rasionalitas penggunaan obat tradisional khususnya sebagai terapi DM dengan dasar penjelasan mekanisme kerja dan efek farmakologis dari daun kersen ini dapat memberikan alternatif terapi dengan obat tradisional untuk mempertahankan kadar gula darah dan mencegah komplikasi pada penderita DM.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tumbuhan Kersen (*Muntingia calabura*)

1. Kedudukan taksonomi

Menurut Gembong (1991), tumbuhan kersen (*Muntingia calabura*) memiliki kedudukan taksonomi sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Anak Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Anak kelas	: Dialypetalae
Bangsa	: Malvales/ Columniferae
Suku	: Elaeocarpaceae
Genus	: <i>Muntingia</i>
Spesies	: <i>Muntingia calabura</i> L.

2. Morfologi tumbuhan kersen

Tumbuhan kersen merupakan perdu atau pohon kecil yang tingginya mencapai 12 m. Tumbuhan kersen adalah pohon yang selalu hijau (*evergreen*), berbunga dan berbuah sepanjang tahun. Cabang-cabang mendatar, menggantung di ujungnya membentuk naungan yang rindang. Ranting-ranting berambut halus bercampur dengan rambut kelenjar, demikian pula daunnya. Daun-daun terletak mendatar, berseling, helaian daun tidak simetris, bundar telur lanset, tepi bergerigi dan berujung runcing, 1-4 x 4-14 cm, sisi bagian bawah berambut kelabu rapat,

bertangkai pendek. Daun penumpu yang sebelah meruncing berbentuk benang \pm 0,5 cm, agak lama lalu mengering dan rontok. Bunga dalam berkas berisi 1-3(-5) kuntum, terletak di ketiak agak di sebelah atas tumbuhnya daun, bertangkai panjang, berkelamin dua dan berbilangan lima, kelopak berbagi dalam, taju meruncing bentuk benang, berambut halus, mahkota bertepi rata, bundar telur terbalik, putih tipis gundul \pm 1 cm. Benang sari berjumlah banyak, 10 sampai lebih dari 100 helai. Bunga mekar menonjol keluar, ke atas helai-helai daun, namun setelah menjadi buah menggantung ke bawah, tertutupi oleh daun-daun. Umumnya hanya satu-dua bunga yang menjadi buah dalam tiap berkasnya. Bertangkai panjang, bulat hampir sempurna, diameter 1-1,5 cm, hijau kuning dan akhirnya merah apabila matang, bermahkota sisa tangkai putik yang tidak rontok serupa bintang hitam bersudut lima. Berisi beberapa ribu biji kecil-kecil, halus, putih dan kekuningan, terbenam dalam daging dan sari buah yang manis sekali (Gembong, 1985; George, 1951).

3. Nama lain tumbuhan kersen

Muntingia calabura memiliki nama lain *kersen* dan *talok* (nama umum di Jawa) dan memiliki nama yang berbeda-beda di wilayah Asia Tenggara seperti *datiles*, *aratiles* dan *manzanitas* (Filipina); *mât sâm* (Vietnam); *khoom sômz* (Laos); *takhop farang* (Thailand); *krâkhôb barang* (Kamboja); *kerukup siam* (Malaysia). Di negara-negara nama lain kersen adalah *capulin blanco*, *cacaniqua*, *niguito* (Spanyol); *Jamaican cherry*, *Panama berry*, dan *Singapore cherry* (Inggris); dari Belanda adalah *Japanse kers* yang kemudian menjadi kersen dalam bahasa Indonesia (Vembriarto dan Rahmat, 2014; Zainul *et al.*, 2014).

4. Kegunaan tumbuhan kersen

Tumbuhan kersen di Indonesia digunakan sebagai obat tradisional dimana infus daun kersen digunakan untuk memperlancar dahak dengan menurunkan viskositas lendir pada batuk produktif. Konsumsi buah kersen matang dapat menyembuhkan asam urat dan diabetes pada kasus-kasus tertentu yang pernah ditemukan (Rakhmi, 2008).

Negara-negara lain juga menggunakan tumbuhan kersen sebagai obat tradisional. Negara Peru, secara tradisional menggunakan bunga dan kulit kayu sebagai antiseptik dan mengurangi pembengkakan bagian bawah badan seperti kaki atau lutut dan rebusan atau rendaman daunnya berfungsi untuk mengurangi perih pada borok lambung, pembengkakan kelenjar prostat dan gejala flu disertai sakit kepala (Julia, 1997; Zakaria *et al.*, 2006). Negara Kolombia menggunakan infus bunga tumbuhan kersen untuk penenang dan tonik (Kaneda *et al.*, 1991). Negara Meksiko menggunakan tumbuhan ini untuk menangani penyakit campak, borok mulut dan sakit kepala (Yasunaka *et al.*, 2005).

5. Kandungan kimia

Kandungan kimia yang terdapat dalam daun kersen menurut penelitian yang telah dilakukan Verdayanti (2009) dapat berupa zat-zat seperti asam askorbat, serat, betakaroten, riboflavin, tiamin dan niacin. Penelitian yang dilakukan Marimutu (2014) menyatakan bahwa kandungan kimia dari ekstrak air daun dan buah kersen adalah senyawa fenolik, steroid, sterol, *fixed oil*, alkaloid, glikosida, saponin, flavonoid dan tanin, selain karbohidrat dan protein.

5.1. Flavonoid. Senyawa flavonoid termasuk golongan fenol, karena itu warnanya kuning atau menjadi merah jingga bila ditambah basa atau amonia jadi,

senyawa ini mudah dideteksi pada kromatogram atau dalam larutan (Harborne, 1987).

5.2. Alkaloid. Merupakan metabolit sekunder yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen dan memiliki aktivitas farmakologi. Memberikan rasa pahit dan biasanya beracun. Alkaloid pada suhu ruang kebanyakan berwujud kristal dan sedikit yang berwujud cairan, tanpa warna, dan sering kali bersifat optis aktif (Harborne, 1987).

5.3. Tanin. Senyawa yang tersebar luas dalam tumbuhan berpembuluh, pada golongan angiospermae terdapat khusus dalam jaringan kayu. Senyawa ini bereaksi dengan protein membentuk suatu senyawa polimer yang mantap tidak larut air. Tanaman yang mengandung banyak senyawa tanin biasanya akan dijauhi oleh hewan karena rasanya yang sepat dan polimer yang susah dicerna (Harborne, 1987).

5.4. Steroid. Senyawa ini terdistribusi sangat luas di alam dan memiliki aktivitas biologik yang bervariasi termasuk aktivitasnya dalam perkembangan dan pengendalian jalur reproduksi pada manusia (estradiol, progesteron, testoteron), penginduksi reproduksi seksual fungi (antheridiol). Beberapa senyawa golongan steroid memiliki aktivitas terapeutik seperti sebagai kardiotonik (digitoxin), prekursor vitamin D (ergosterol), kontrasepsi oral (semisintetik estrogen dan progesteron), agen antiinflamasi (kortikosteroid) dan agen anabolik (androgen) (Varro *et al.*, 1988) .

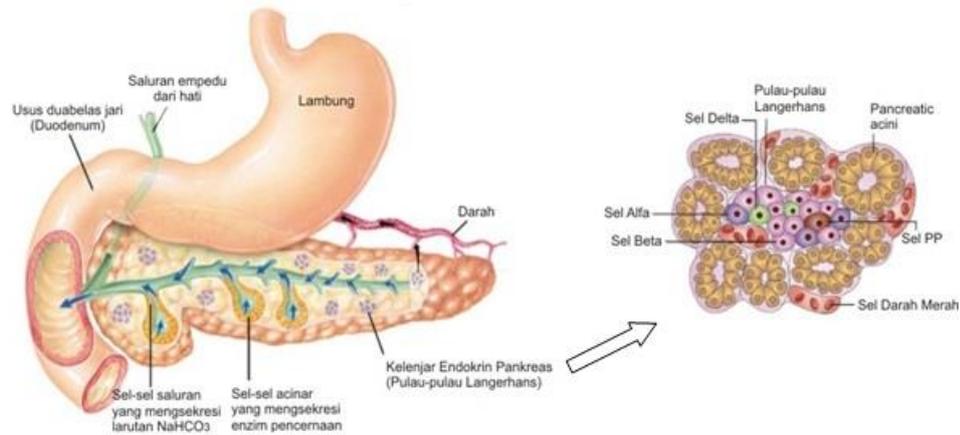
5.5. Glikosida. Glikosida, merupakan sebutan untuk senyawa yang tersusun atas gugus gula dan gugus aglikon. Aglikon yang dimaksud adalah senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas farmakologi (William, 2009).

5.6. Saponin. Saponin adalah metabolit sekunder yang banyak terdapat di alam, terdiri dari gugus gula yang berikatan dengan aglikon atau sapogenin. Saponin mempunyai sifat menyerupai sabun. Busa yang ditimbulkan saponin karena adanya kombinasi struktur senyawa penyusunnya yaitu rantai sapogenin nonpolar dan rantai samping polar yang larut dalam air. Saponin terdiri dari dua jenis yaitu glikosida triterpenoida dan glikosida struktur steroida tertentu yang mempunyai rantai samping spiroketal. Kedua jenis saponin ini larut dalam air dan etanol, tetapi tidak larut dalam eter. Aglikonnya disebut sapogenin, diperoleh dengan hidrolisis dalam suasana asam atau hidrolisis memakai enzim (Robinson, 1995; Harborne, 1987).

5.7. Polifenol. Senyawa polifenol merupakan bahan polimer penting dalam tumbuhan dan cenderung mudah larut dalam air, karena berikatan dengan gula sebagai glikosida (Harborne, 1987).

B. Pankreas dan Islet Langerhans

Pankreas merupakan organ padat yang panjang dan ramping. Panjang sekitar 15 hingga 20 cm dan lebarnya 3,8 cm. Pankreas terletak retroperitoneal diantara duodenum dan limfa, di depan aorta abdominalis dan arteri serta vena mesenterica superior. Pankreas dibagi menjadi 3 segmen utama: kaput, korpus dan kauda. Kaput terletak pada bagian cekung duodenum, dan kauda menyentuh limpa (Kent, 1984).



Gambar 1 Pankreas dan pulau langerhans (Anne dan Arthur, 2009).

Pankreas memiliki 2 macam jaringan dengan fungsi berbeda yaitu jaringan eksokrin dan jaringan endokrin. Jaringan eksokrin yang berbentuk seperti anggur dan berkelompok-kelompok terdiri dari kumpulan sel asini yang menghasilkan enzim pencernaan atau getah pankreas ke dalam duodenum dan jaringan ini predominan di organ pankreas sekitar 80%. 2% volume organ pankreas tersusun oleh jaringan endokrin atau pulau langerhans yang tersebar di seluruh jaringan pankreas yang menghasilkan sekret endokrin (Lauralee, 2011).

Pulau langerhans memiliki 4 macam sel yaitu sel α yang mensekresikan glukagon, sel β yang memproduksi insulin, sel δ yang memproduksi somatostatin dan sel PP (Polipeptida Pancreas) yang memproduksi polipeptida pankreas. Pulau langerhans tersusun dominan oleh sel β sekitar 60-70 %. Sel β pada umumnya tersebar di pulau berkumpul seperti anggur dan sel berbentuk bulat cenderung elips. Kumpulan sel ini berdekatan atau hampir dikelilingi oleh sel-sel α yang menyusun 20% pulau langerhans (Lauralee, 2011; Arthur, 1990).

C. Diabetes Melitus

1. Definisi DM

DM didefinisikan oleh World Health Organization (WHO) sebagai suatu penyakit atau gangguan metabolisme kronik dengan multietiologi yang ditandai dengan tingginya kadar gula darah disertai dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lipid, dan protein sebagai akibat kurangnya kadar insulin dimana insulin adalah hormon penting yang mengatur keseimbangan kadar gula darah. Insufisiensi insulin dapat disebabkan oleh gangguan atau defisiensi produksi insulin oleh sel-sel β Langerhans kelenjar pankreas, atau disebabkan oleh kurang responsifnya sel-sel tubuh terhadap insulin (Abdulfatai *et al.*, 2012; KEMENKES RI, 2014).

2. Klasifikasi DM

American Diabetes Association (ADA) mengklasifikasikan DM menjadi empat kelas yaitu DM tipe I, DM tipe II, diabetes tipe lain (diabetes karena penyebab lain, misalnya disebabkan karena cacat genetik) dan diabetes gestasional.

2.1. DM tipe I. DM tipe I merupakan DM yang tergantung pada insulin. DM tipe I dicirikan dengan hilangnya sel β pada pulau-pulau Langerhans pankreas sehingga terjadi defisiensi insulin yang absolut pada tubuh. DM tipe ini dapat diderita oleh anak-anak maupun orang dewasa. DM tipe I saat ini hanya dapat diobati dengan menggunakan insulin dan pengawasan yang teliti terhadap tingkat glukosa darah melalui alat monitor pengujian darah.

2.2. DM tipe II. DM tipe II ini disebabkan oleh kurang sensitifnya jaringan tubuh terhadap insulin. DM tipe II ini merupakan diabetes yang paling umum terjadi dibandingkan dengan jenis diabetes lainnya. Etiologi dari DM tipe II belum

sepenuhnya diketahui secara jelas. Faktor genetik dan pengaruh lingkungan cukup berperan menyebabkan DM tipe II, antara lain obesitas, diet tinggi lemak dan rendah serat serta aktivitas yang kurang.

2.3. DM tipe lain. Faktor-faktor penyebab diabetes jenis ini diantaranya penyakit pada pankreas yang merusak sel β , seperti hemokromatosis, pankreatitis, fibrosis kistik, sindrom hormonal yang mengganggu sekresi dan atau menghambat kerja insulin, seperti akromegali, feokromositoma, dan sindrom Cushing, obat-obat yang mengganggu sekresi insulin antara lain fenitoin (Dilantin) atau menghambat kerja insulin (estrogen dan glukokortikoid), kondisi tertentu yang jarang terjadi, seperti kelainan pada reseptor insulin dan sindrom genetik (Arisman, 2011).

2.4. Diabetes gestational. Diabetes yang terjadi saat masa kehamilan didefinisikan sebagai setiap intoleransi glukosa yang timbul atau terdeteksi pada kehamilan pertama, tanpa memandang derajat intoleransi serta tidak memperhatikan apakah gejala ini lenyap atau menetap selepas melahirkan. Diabetes jenis ini biasanya muncul pada kehamilan trimester kedua dan ketiga. Kategori ini mencakup DM yang terdiagnosa ketika hamil (sebelumnya tidak diketahui). Wanita yang sebelumnya diketahui telah mengidap DM, kemudian hamil, tidak termasuk ke dalam kategori ini (Arisman, 2011).

3. Patofisiologi DM

Pankreas berperan penting dalam metabolisme karbohidrat dalam tubuh manusia. Sel acini dan islet Langerhans yang berupa sel α , sel β dan sel σ pada pankreas normal memiliki fungsi dan perannya masing-masing. Sel α berperan dalam mensekresi glukagon sebagai respon dari penurunan kadar gula dalam darah. Sel β berperan penting terhadap sekresi insulin sebagai respon dari peningkatan

kadar gula dalam darah. Sel α berperan sebagai pengatur sel β dan sel alfa dengan mensekresi somatostatin (Lauralee, 2011).

Hormon insulin dan glukagon berperan dalam pengaturan metabolisme karbohidrat dalam tubuh. Kedua hormon tersebut mengatur kadar gula dalam darah sehingga tetap pada kisaran normal dan menjamin ketersediaan glukosa untuk disuplai ke sel-sel syarat pusat pada keadaan normal. Insulin berperan penting dalam menghambat glikogenolisis, menstimulasi lipogenesis, serta menstimulasi glikogenesis sehingga kadar glukosa dalam darah menurun. Glikogenolisis merupakan perubahan glikogen menjadi glukosa. Lipogenesis bekerja memfasilitasi glukosa masuk ke dalam jaringan lemak. Sel alfa mengeluarkan glukagon dan menstimulasi hormon-hormon *counterregulatory* seperti hormon kortisol, adrenalin, yang meningkatkan kadar glukosa darah dengan menstimulasi glikogenolisis, glukoneogenesis disertai lipolisis pada saat kadar gula dalam darah turun. Pengaturan kadar gula dalam darah tidak berjalan dengan normal pada keadaan DM (Abdulfatai, 2012).

4. Komplikasi DM

American Diabetes Association (2012) menyatakan pasien diabetes jika dibandingkan dengan yang non-diabetes, memiliki rentang hidup sekitar 7 tahun lebih pendek akibat berbagai komplikasi. Komplikasi mikro terutama terjadi pada DM tipe I. Komplikasi mikro dari DM seperti retinopati, nefropati dan neuropati. Retinopati diabetika yaitu kerusakan mata seperti katarak dan glukoma atau meningkatnya tekanan pada bola mata. Bentuk kerusakan yang paling sering terjadi adalah bentuk retinopati yang dapat menyebabkan kebutaan. Nefropati diabetika yaitu gangguan ginjal yang diakibatkan karena penderita menderita diabetes dalam

waktu yang cukup lama. Neuropati diabetika yaitu gangguan sistem syaraf pada penderita DM. Indera perasa pada kaki dan tangan berkurang disertai dengan kesemutan, perasaan baal atau tebal serta perasaan seperti terbakar.

Komplikasi makro yaitu komplikasi yang mengenai pembuluh darah arteri yang lebih besar sehingga menyebabkan aterosklerosis dan timbul angiopati kardiovaskuler, periperalvakuler dan hipoglikemi. Penderita diabetes memiliki risiko yang lebih besar menderita kanker, komplikasi kardiovaskular dan gagal ginjal karena kerentanan mereka terhadap penyakit. Kontrol gula darah yang ketat dapat mengurangi resiko komplikasi DM (Ferdinando dan Michael, 2010; Abdulfatai *et al.*, 2012).

5. Status Oksidatif DM

Keadaan *diabetes melitus* membuat pertahanan antioksidan dan sistem perbaikan seluler terinduksi sebagai respon tantangan oksidatif. Sumber stres oksidatif yang terjadi berasal dari peningkatan produksi radikal bebas akibat autooksidasi glukosa, penurunan konsentrasi antioksidan berat molekul rendah di jaringan, dan gangguan aktivitas pertahanan antioksidan enzimatik. Keadaan stres oksidatif sulit untuk dinyatakan jelas keparahannya pada pasien DM karena radikal bebas yang jumlahnya tak tentu tiap individu dan jenisnya yang sangat banyak (Setiawan dan Suhartono, 2005).

Stres oksidatif mengakibatkan perubahan-perubahan fisiologis karena radikal-radikal bebas yang mengubah molekul-molekul penting sel dan senyawa-senyawa protein dan lemak. Keadaan stres oksidatif dapat membuat radikal bebas seperti ROS berikatan dengan lemak. Lemak merupakan target utama ROS dalam membentuk senyawa radikal toksik seperti MDA yang dapat merusak membran sel.

MDA menjadi biomarker utama sebagai penanda tingginya lemak yang teroksidasi menjadi radikal bebas. Tingkat MDA yang tinggi biasanya ditemukan pada pasien DM dengan komplikasi aterosklerosis dan kelainan syaraf. Protein yang terpapar oleh ROS dapat termodifikasi menjadi protein yang tidak fungsional sehingga dapat mengganggu aktivitas-aktivitas seluler seperti aktivitas *bio signaling* dan enzimatik. AOPP (*Advanced Oxidation Protein Product*) menjadi parameter total keadaan oksidasi protein di sel atau jaringan. Kadar enzim-enzim antioksidan endogen juga berubah termasuk SOD, GSH, GPx dan catalase yang cenderung menurun. Hal ini disebabkan radikal bebas yang merusak protein gen yang memproduksi enzim-enzim tersebut (Ferdinando dan Michael, 2010).

6. Terapi DM

Obat antidiabetes oral yang tersedia saat ini ada lima golongan obat antidiabetes oral untuk DM tipe II, yaitu golongan sulfonilurea (contoh: glimepirid, glibenklamid), biguanida (contoh: metformin), meglitinida, inhibitor α -glukosidase (contoh: akarbose dan miglitol), dan agonis reseptor PPAR- γ (glitazon). Berdasarkan mekanisme penurunan kadar glukosa, biguanida dan glitazon dikategorikan sebagai sensitivator insulin karena kemampuannya mereduksi resistensi insulin, sedangkan sulfonilurea dan meglitinida dikategorikan sebagai peningkat sekresi insulin karena kemampuannya meningkatkan pelepasan insulin endogen (Bertram, 2012).

6.1 Golongan sulfonilurea. Sulfonilurea adalah turunan sulfonamide. Ditemukan sebagai antidiabetes pada tahun 1940. Ketika reaksi hipoglikemik parah menimpa pasien demam thypoid diterapi dengan thiodiazole. Penelitian kemudian

berlanjut dan terus berkembang sehingga ditemukan tolbutamid dan klorpropamid yang dikenal sebagai sulfonilurea generasi pertama.

Golongan sulfonilurea telah digunakan sejak lama dan diklasifikasikan dalam generasi pertama (tolbutamid, klorpropamid) dan generasi kedua (glimepirid, glipizid, dan glibenklamid). Generasi kedua berbeda dalam hal potensi, keamanan, dan profil farmakokinetika. Generasi kedua lebih poten dan menunjukkan profil keamanan dan farmakokinetika lebih baik. Golongan sulfonilurea bekerja menurunkan kadar glukosa darah dengan meningkatkan sekresi insulin dari sel β pankreas, namun efeknya tergantung pada kadar glukosa. Penggunaan jangka panjang sering menyebabkan hilangnya efikasi, dan ini merupakan salah satu masalah terapi dengan golongan sulfonilurea. Masalah lain adalah efek samping yang timbul, yaitu hipoglikemia dan peningkatan berat badan (Modi, 2007).

6.2 Golongan biguanida. Metformin merupakan salah satu obat golongan biguanid yang bekerja dengan cara meningkatkan sensitivitas reseptor insulin sehingga meningkatkan ambilan glukosa di perifer. Efek utama golongan biguanida seperti metformin adalah melalui penghambatan produksi glukosa dan stimulasi proses transport glukosa ke dalam sel. Kombinasi metformin dengan sulfonilurea menunjukkan peningkatan kontrol terhadap kadar gula darah dan hiperlipidemia, serta menunda komplikasi yang berhubungan dengan DM.

Metformin tidak mempengaruhi pelepasan insulin dari sel β pankreas sehingga tidak menyebabkan hipoglikemik. Untuk pasien DM obesitas, terapi dengan metformin lebih tepat dari pada golongan sulfonilurea, terutama karena tidak menyebabkan peningkatan berat badan. Kelebihan lain metformin adalah efek

positifnya pada metabolisme lipid dan mampu menekan kadar trigliserida dan kolesterol jahat (Bertram, 2012).

6.3 Golongan meglitinid. Golongan meglitinid (repaglinid, nateglinid) bekerja dengan menstimulasi sekresi insulin dari sel β pankreas. Sama dengan sulfonilurea, meglitinid juga menyebabkan efek hipoglikemia serta peningkatan berat badan. Meglitinid mempunyai onset kerja yang sangat cepat dengan efek puncak tercapai sekitar 1 jam setelah ditelan, namun lama kerjanya 5-8 jam. Obat golongan ini sebaiknya digunakan untuk mengendalikan lonjakan kadar glukosa darah saat setelah makan. Obat golongan ini harus digunakan secara hati-hati pada pasien dengan gangguan fungsi ginjal dan hati. Tidak terdapat sulfur dalam molekul obat ini sehingga dapat digunakan pada penderita DM tipe 2 yang alergi sulfonilurea atau sulfur (Bertram, 2012).

6.4 Golongan tiazolidinedion atau glitazon. Golongan ini bekerja dengan meningkatkan aksi insulin di jaringan otot, lemak dan jaringan lain sehingga dikenal sebagai sensitisator insulin. Selain itu golongan ini juga menurunkan produksi glukosa hepatic. Thiazolidindion merupakan agonis poten dan selektif pada *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma* (PPAR- γ). Reseptor ini ditemukan di otot, lemak dan hati. Reseptor ini bersifat kompleks dan aktivasi pada reseptor ini akan memodulasi ekspresi gen yang terlibat dalam metabolisme glukosa dan lipid, transduksi sinyal insulin dan diferensiasi adiposit dan jaringan lemak lainnya. Obat golongan ini juga memperbaiki fungsi sel β pankreas dengan cara mereduksi asam lemak bebas. Tiazolidinedion tidak menyebabkan hipoglikemia karena tidak langsung mempengaruhi sekresi insulin. Golongan ini juga efektif bila dikombinasikan dengan metformin atau golongan sulfonilurea.

Efek samping utama dari golongan ini berhubungan dengan edema dan peningkatan berat badan. Peningkatan berat badan bisa disebabkan oleh perubahan distribusi lemak dan peningkatan lemak subkutan (Bertram, 2012).

6.5 Golongan inhibitor α -glukosidase. Golongan ini mampu menurunkan laju absorpsi karbohidrat dari usus kecil, sehingga berakibat pada penurunan kadar gula darah. Obat golongan ini bekerja dengan menghambat α -glukosidase secara kompetitif. Mekanisme kerjanya adalah dengan menghambat secara kompetitif enzim α -glukosidase (di usus kecil) dan α -amilase (di pankreas), yang masing-masing berperan mengubah karbohidrat tak terabsorpsi dan sukrosa menjadi glukosa, serta menghidrolisis pati kompleks.

Obat ini tidak mempengaruhi kadar insulin sehingga tidak menyebabkan hipoglikemia bila digunakan tunggal. Obat ini jarang digunakan untuk terapi, kecuali pada pasien yang mengalami peningkatan tinggi kadar gula darah setelah makan. Golongan ini efektif bila digunakan bersama obat antidiabetes oral lain. Efek samping golongan ini adalah gangguan saluran cerna, seperti perdarahan, kembung, diare dan nyeri perut. Efek samping ini dapat diatasi dengan diet rendah karbohidrat. Hipoglikemia dan kenaikan berat badan jarang terjadi (Bertram, 2012).

D. Stres Oksidatif

1. Radikal bebas

Radikal bebas adalah spesies molekul yang memiliki elektron bebas tak berpasangan di dalam orbital atom terluarnya. Keberadaan elektron bebas ini membuat molekul spesies ini sangat reaktif dan tidak stabil. Molekul-molekul ini bisa memberikan atau menerima elektron dari molekul lainnya. Radikal bebas juga

merupakan molekul penting sebagai perantara pada proses alami biologis seperti toksisitas sel, pengendalian ketegangan vaskular dan neurotransmisi. Beberapa radikal bebas adalah molekul reaktif yang berbahaya karena dapat merusak molekul penting seperti DNA, protein, karbohidrat dan lipid. Serangan radikal bebas terhadap molekul-molekul penting tersebut dapat mengganggu homeostatis sel bahkan dapat menyebabkan kematian sel (Abheri *et al.*, 2010).

Radikal bebas diproduksi dari dalam tubuh dan dapat dari luar tubuh. Sistem pertahanan tubuh seperti sel-sel memproduksi radikal oksidasi dan ROS sebagai senjata secara terus-menerus untuk melawan zat asing, produksi energi selular yang secara terus-menerus dalam jumlah banyak, metabolisme-metabolisme sel, penuaan dan reaksi terhadap stress merupakan sumber radikal-radikal bebas dari dalam tubuh. Sumber radikal dari luar contohnya polusi, racun dan zat-zat asing (Abheri *et al.*, 2010).

Radikal bebas terlibat dalam adisi dan substitusi radikal sebagai intermediet reaktif saat reaksi kimia terjadi. Reaksi rantai yang melibatkan radikal bebas biasanya dapat dibagi menjadi 3 proses yaitu reaksi inisiasi (jumlah produk akhir radikal bebas bertambah), reaksi propagasi (jumlah radikal bebas tetap) dan reaksi terminasi (menghasilkan turunya jumlah radikal bebas, membentuk molekul yang stabil) (Abheri *et al.*, 2010; Mohammed *et al.*, 2015).

Target radikal-radikal bebas adalah semua molekul dalam tubuh, tapi target utamanya adalah DNA, protein dan lipid. Lipid peroksidasi yang terbentuk karena serangan radikal bebas dapat merusak membran lipid dengan mengganggu permeabilitas dan fluiditasnya dan juga dapat mempengaruhi ikatan membran protein seperti enzim dan reseptor berakibat terganggunya fungsi perlindungan sel

yang mengancam kesehatan sel. Radikal bebas bisa berikatan dengan molekul protein menyebabkan rusaknya protein karena struktur yang berubah sehingga tak berfungsi. DNA dapat terfragmentasi oleh radikal bebas yang menyebabkan aktivasi enzim poli (ADP-Ribose) sintetase. Enzim ini memisahkan NAD^+ untuk membantu perbaikan DNA. NAD^+ memiliki peran penting dalam metabolisme ATP. Apabila kerusakan pada DNA oleh radikal bebas banyak dapat menyebabkan berkurangnya NAD^+ dalam jumlah tinggi mengakibatkan defisiensi ATP dan berujung pada kematian sel. Bagian yang terserang oleh radikal bebas akan berubah struktur dan fungsinya tergantung spesies radikal bebas yang menyerang. Kerusakan parah dapat membuat sel nekrosis atau termodulasi apoptosis (Abheri *et al.*, 2010; Esra *et al.*, 2012).

Radikal bebas bukan senyawa mutlak merugikan. Radikal bebas juga memiliki manfaat dalam tubuh. Radikal bebas memiliki peran penting pada pengendalian aliran darah melalui arteri, untuk melawan infeksi, untuk membuat otak fokus dan tajam. Sel-sel fagosit sistem imun memproduksi dan menggerakkan radikal bebas oksigen untuk melawan bakteri dan sel-sel asing. Radikal bebas seperti nitrat oksida dan superoksida diproduksi sistem imun dalam jumlah besar untuk meracuni virus-virus dan bakteri. Beberapa radikal bebas dalam konsentrasi rendah merupakan molekul persinyalan. Beberapa radikal bebas memiliki fungsi melawan sel kanker (Abheri *et al.*, 2010; Mohammed *et al.*, 2015).

2. ROS (*Reactive Oxygen Species*)

Reactive Oxygen Species (ROS) adalah istilah yang merujuk semua molekul yang mengandung oksigen dan sangat reaktif, termasuk radikal bebas. ROS

memiliki molekul yang sangat kecil dan sangat reaktif karena memiliki elektron bebas tak berpasangan (Abheri *et al.*, 2010).

ROS terbentuk karena proses metabolisme alami oksigen sebagai produk tambahan dan memiliki fungsi dalam *Cell Signalling Pathway*. Semua organisme aerobik memproduksi ROS dalam fisiologis normal. ROS berbahaya apabila konsentrasinya melonjak tinggi di dalam sel karena sangat mungkin bisa berikatan dengan molekul-molekul organel sel yang fungsional sehingga menyebabkan rusaknya organel tersebut. Jenis-jenis ROS seperti radikal hidroksil, radikal anion superoksida, hidrogen peroksida dan jenis-jenis lipid peroksida dapat bereaksi dengan membran lipid, asam nukleat, protein dan enzim dan molekul-molekul kecil dalam sel. ROS terutama terbentuk dari reaksi enzimatik NAD(P)H oksidase, xantin oksidase, nitrat oksida sintetase tak terkopling. Sumber enzimatik lainnya seperti mieloperoksidase, aldehyd oksidase, siklooksigenase, lipooksigenase, dehidrogenase, triptofan dioksigenase dan flavoprotein dihidrogenase (Mohammed *et al.*, 2015; Weidinger dan Kozlov, 2015).

3. RNS (*Reactive Nitrogen Species*)

Reactive Nitrogen Species (RNS) adalah istilah kolektif yang merujuk pada radikal bebas yang memiliki atom nitrogen termasuk nitrat oksida, peroksi nitrit, radikal nitrogen dioksida dan oksida-oksida nitrogen lain dan produk-produk reaksi antara nitrat oksida dan superoksida. Nitrat oksida adalah contoh radikal bebas yang memiliki peran penting dalam perantara sinyal seluler, vasodilasi dan respon imun (Mohammed *et al.*, 2015).

4. Mekanisme stres oksidatif yang diinduksi hiperglikemia

Stres oksidatif merupakan suatu keadaan dimana terjadi ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan dan terjadinya penurunan kemampuan eliminasi molekul-molekul yang bersifat sangat reaktif di dalam tubuh seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS). ROS seperti superoksida ($\cdot\text{O}_2^-$), hidroksil ($\cdot\text{OH}$), peroksil ($\cdot\text{RO}_2$), hidroperoksil ($\cdot\text{HRO}_2$) dan RNS seperti nitrat oksida ($\cdot\text{NO}$) dan nitrat dioksida ($\cdot\text{NO}_2$) (Johansen *et al.*, 2005).

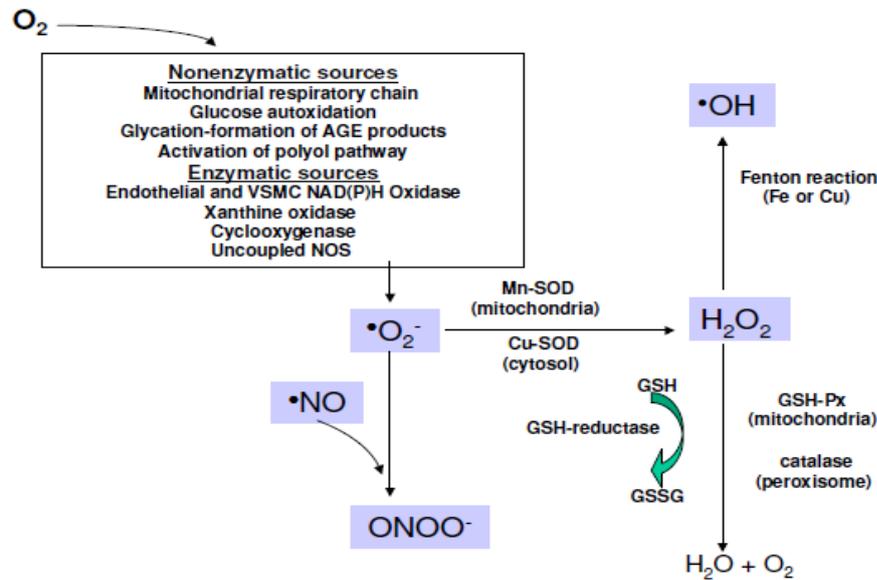
ROS dan RNS terbentuk sebagai hasil dari mekanisme pertahanan tubuh seperti pada proses fagositosis, aktivitas mitokondria, dan *shear stress* sel endotelial pembuluh darah. Produksi radikal bebas yang berlebihan akan menyebabkan stres oksidatif sehingga mengakibatkan kerusakan protein, lipid dan DNA. Radikal superoksida pada DM dapat mengakibatkan berbagai kerusakan melalui pembentukan *Advanced Glycation End Products* (AGEs) dan aktifnya jalur poliol, jalur heksosamin dan protein kinase-C (PKC) yang pada akhirnya menimbulkan komplikasi mikro dan makrovaskular (Johansen *et al.*, 2005).

Bukti adanya stres oksidatif pada DM didasarkan pada penelitian yang memfokuskan pada pengukuran indikator stres oksidatif seperti kadar *F2-isoprostan* di dalam urin dan plasma serta kadar nitrotirosin dan superoksida di dalam plasma dan jaringan. Terdapat banyak sumber stres oksidatif pada DM seperti jalur-jalur non enzimatis, jalur enzimatis dan jalur mitokondria. Sumber non enzimatis berasal dari sifat oksidatif glukosa itu sendiri. Keadaan hiperglikemia secara langsung akan menyebabkan peningkatan produksi ROS. Glukosa dapat mengalami autooksidasi membentuk radikal-radikal hidroksil. Glukosa, lebih lanjut

dapat bereaksi dengan protein membentuk *Amadori products* yang selanjutnya diikuti oleh pembentukan AGEs.

Metabolisme glukosa akan meningkat pada keadaan hiperglikemia melalui jalur poliol (sorbitol) yang juga meningkatkan produksi radikal superoksida. Jalur-jalur enzimatik pada DM dapat meningkatkan produksi ROS dan RNS, seperti jalur NOS, NAD(P)H oksidase dan xantin oksidase. Semua isoform NOS membutuhkan 5 kofaktor yaitu flavin adenina dinukleotida (FAD), flavin mononukleotida (FMN), heme, tetra hidrobiopterina (BH₄) dan Ca^{2++} -*calmodulin*. NOS yang kehilangan substrat L-arginin atau salah satu dari kofaktornya akan membentuk superoksida dimana keadaan ini disebut dengan “*the uncoupled state of NOS*”. NAD(P)H oksidase adalah suatu enzim yang terdiri dari 5 subunit dan merupakan sumber utama produksi radikal superoksida.

Sumber lain produksi nonenzimatik dari ROS dan RNS adalah dari rantai respirasi mitokondria. Elektron akan ditransfer dari pengangkut elektron NADH dan FADH₂ melewati bagian dalam membran mitokondria menuju oksigen untuk membentuk ATP selama proses fosforilasi oksidatif berlangsung. Radikal superoksida yang terbentuk akan segera dieliminir melalui mekanisme pertahanan tubuh yang normal. Penelitian terbaru membuktikan bahwa pembentukan radikal superoksida yang dipicu oleh hiperglikemia di dalam mitokondria merupakan proses awal dari lingkaran stres oksidatif yang terjadi pada DM. Sel-sel endotel yang terpapar dengan keadaan hiperglikemia akan mengakibatkan terjadinya peningkatan produksi ROS terutama radikal superoksida, yang mengawali aktivasi rangkaian 4 jalur utama dalam patofisiologi komplikasi DM seperti yang diperlihatkan dalam gambar 2 dibawah ini (Johansen *et al.*, 2005).



Gambar 2 Generasi spesies reaktif pada diabetes (Johansen *et al.*, 2005).

Guzik dan Harrinson (2006), dalam penelitiannya menjelaskan bahwa pencegahan pembentukan ROS, dengan menargetkan sumber spesifik dari anion superoksida dan ROS lainnya terbukti bermanfaat untuk menghambat stres oksidatif. Target potensial penghambatan atau pencegahan pembentukan ROS yaitu oksidase NADPH (*Nox enzim*), xantin oksidase, endotel oksida nitrat sintase dan oksidase mitokondria.

5. Hubungan antara peningkatan aktivitas enzim antioksidan dengan regenerasi sel β pankreas

Sel yang normal mempunyai sejumlah enzim pertahanan yang beraksi sebagai antioksidan endogen (katalase, SOD dan GPx) untuk mendetoksifikasi radikal bebas dan mencegah kerusakan sel. Kerentanan suatu jaringan terhadap tekanan oksidatif tergantung pada mekanisme pertahanan oksidatifnya, antara lain oleh aktivitas dan kandungan enzim antioksidan endogen. Peningkatan tekanan oksidatif dalam tubuh pada keadaan patologik diabetes akan meningkatkan

pemakaian enzim antioksidan intrasel sehingga menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan endogen dalam tubuh. Upaya peningkatan suplai antioksidan yang cukup dalam tubuh akan membantu mengurangi resiko komplikasi pada penderita diabetes (Rahbani *et al.*,1999).

Penghambatan pembentukan radikal bebas oleh antioksidan memberikan kesempatan bagi tubuh untuk memperbaiki sel dan melakukan regenerasi sel yang rusak dan mati. Regenerasi sel β pankreas diawali dengan perbaikan sel-sel β pankreas dan pembelahan sel β pankreas yang baru (mitosis) yang menyebabkan sejumlah sel β pankreas bertambah sehingga diharapkan produksi insulin meningkat dan kadar glukosa darah berangsur-angsur menjadi normal kembali (Udayakumar dan Keun-Gyu. 2013)

E. Metode Uji Aktivitas Antidiabetes

1. Metode induksi diabetes tikus uji

Metode induksi diabetes yang sebagian besar dilakukan terarah pada upaya merusak sebagian atau merusak total pankreas, dimana di dalam pankreas terdapat sel β pulau Langerhans yang berfungsi memproduksi hormon insulin.

1.1. Diabetes yang diinduksi senyawa kimia. Keadaan diabetes dapat diinduksi pada hewan percobaan dengan cara injeksi senyawa kimia yang toksik terhadap sel β pankreas. Zat kimia yang digunakan dapat berupa aloksan, streptozotocin, ditizon dan 8-hidroksiquinolon (Asghar & Sajad, 2014). Prinsip dari metode ini yaitu keadaan diabetes melitus dilakukan dengan sengaja terhadap hewan uji dengan suntikan kimia yang merusak sel β pankreas dengan dosis tertentu dengan jalur penyuntikan tertentu sesuai penelitian yang akan dilakukan.

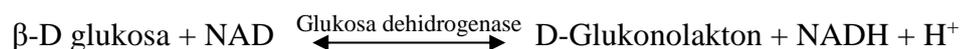
Perkembangan hiperglikemia kemudian diperiksa dengan penentuan kadar glukosa darah (Asghar dan Sajad, 2014; I Nyoman *et al.*, 2010). Streptozotocin dan aloksan memiliki mekanisme induksi diabetes hampir sama yaitu merusak sel β pankreas dengan masuk ke dalam sel kemudian mengganggu metabolisme sel, merusak DNA, mengurangi produksi energi seluler dan meningkatkan produksi radikal bebas dalam sel. Dinitrofenol dan 8-hidroksi-6-kuinolon menginduksi diabetes dengan menghambat pengeluaran insulin dengan cara masuk ke dalam sel β melalui permeasi membran, kemudian senyawa ini masuk ke dalam granula sel yang mengandung insulin, membentuk kompleks dengan zinc dan mengeluarkan proton dalam granula, tekanan osmotik pada granula meningkat kemudian granula yang membawa insulin akan pecah, sementara insulin disekresikan ke dalam pembuluh darah harus melalui granula dengan jalur eksositosis (Vineeta & Janeshwer, 2014).

1.2. Induksi resistensi insulin. Induksi dilakukan pada hewan percobaan yang dijadikan obesitas dengan pemberian *High Fat Diet* (HFD). Pemberian HFD bertujuan untuk meningkatkan berat badan dari hewan percobaan. Hewan percobaan diberi HFD selama waktu tertentu, biasanya 6 minggu. Pakan kaya lemak memiliki 55% kalori lemak. Pemberian pakan kaya lemak merupakan cara yang umum yang digunakan untuk menginduksi resistensi insulin pada mencit dengan cepat sehingga menyebabkan gangguan metabolisme yang progresif. Untuk memastikan apakah hewan percobaan telah mengalami resistensi insulin adalah dengan melakukan tes toleransi insulin. Mencit dipuasakan selama 5 jam. Dilakukan injeksi insulin secara intra peritoneal dengan dosis 0,75 U/kg bb kemudian mengukur kadar glukosa darah dengan menggunakan glukometer (Chao-Yung dan James, 2012).

2. Metode analisa kadar glukosa darah

2.1. Metode glukometer. Metode ini merupakan metode yang paling banyak dipilih dan paling sering digunakan. Metode ini paling mudah dan cepat dilakukan. Mekanisme kerja glukometer dimana sampel darah akan masuk ke dalam test strip melalui aksi kapiler. Glukosa yang ada dalam darah akan bereaksi dengan glukosa oksidase dan kalium ferisianida yang ada dalam strip dan akan dihasilkan ferisianida. Kalium ferisianida yang dihasilkan sebanding dengan konsentrasi glukosa yang ada dalam sampel. Oksidasi kalium ferisianida akan menghasilkan muatan listrik yang kemudian akan diubah oleh glukometer untuk ditampilkan sebagai konsentrasi glukosa pada layar (Yoo & Lee, 2010).

2.2. Metode *glucose dehidrogenase* (GLUC-DH). GLUC-DH adalah sebuah metode pembacaan kadar gula darah yang menggunakan reaksi enzimatik. Pengukuran dilakukan dengan spektrofotometri UV-Vis daerah 340 nm untuk membaca serapan NADH yang konsentrasinya sebanding dengan glukosa. Prinsip metode ini adalah berdasarkan pada reaksi berikut:



Metode GLUC-DH dapat digunakan pada bahan sampel dideproteinisasi serta untuk hemolisis (Merck, 1987).

2.3. Metode GOD-PAP. Metode ini menggunakan metode kolorimetri dari reaksi enzimatik berdasarkan glukosa pada darah dengan glukosa oksidase pada reagen dengan hasil akhirnya adalah cairan berwarna merah dimana persamaan reaksi kimianya:



Pembacaan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 492-520 nm. Persamaan perhitungan konsentrasi adalah (Yoo & Lee, 2010) :

$$C \text{ sampel} = \frac{A \text{ sampel}}{A \text{ standar}} \times C \text{ standar}$$

A= absorbansi C= konsentrasi (mg/dl)

2.4. Metode O-toludine. Prinsip kerja dari metode ini adalah glukosa bereaksi dengan o-toludine dalam asam asetat panas dan menghasilkan senyawa berwarna hijau yang ditemukan secara fotometris (Charles *et al.*, 1972).

F. Antioksidan

1. Pengertian antioksidan

Antioksidan adalah zat yang berperan penting dalam menunda atau mencegah penyakit degeneratif yang disebabkan oleh kerusakan oksidatif komponen sel dalam tubuh karena pengaruh radikal bebas. Antioksidan bekerja dengan membuat radikal-radikal reaktif hasil dari proses metabolisme dalam badan menjadi tidak aktif dan stabil (Qader *et al.*, 2011).

2. Jenis-jenis antioksidan

2.1. Antioksidan endogen. Antioksidan endogen yaitu sejumlah protein dan enzim yang disintesis dalam tubuh yang berperan dalam menangkali oksidasi oleh radikal bebas. Antioksidan endogen terdiri dari katalase, superoksida

dismutase, serta protein yang berikatan dengan logam seperti transferin dan seruloplasmin. Antioksidan endogen berfungsi sebagai sistem pertahanan yang bekerja dengan mengkelat dan memberhentikan aktivitas ROS intraseluler serta menjaga keseimbangan reduksi-oksidasi intraseluler. Antioksidan endogen dibagi menjadi 2 kelompok antioksidan enzimatik dan antioksidan non enzimatik. Antioksidan enzimatik seperti enzim SOD, katalase dan GPx. Antioksidan non enzimatik 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 (Winarsi, 2007).

2.2. Antioksidan eksogen. Antioksidan eksogen adalah antioksidan yang sumbernya dari luar tubuh. Antioksidan jenis eksogen ini berasal dari makanan dan suplemen. Makanan yang mengandung tokoferol (vitamin E), asam askorbat (vitamin C), karotenoid dan flavonoid serta Tanaman-tanaman yang mengandung senyawa fenolik dan flavonoid (Basu *et al.*,1999; Fuchs-Tarlovsky, 2012).

3. Mekanisme kerja antioksidan

Antioksidan dapat digolongkan menjadi tiga golongan berdasarkan mekanisme kerjanya.

3.1. Antioksidan primer. Antioksidan primer berfungsi mencegah radikal bebas yang baru dengan mengubah radikal tersebut menjadi molekul yang berkurang efek negatifnya sebelum terjadinya reaksi dengan molekul sel. Contoh antioksidan primer yaitu enzim SOD, GPx dan katalase. Antioksidan primer disebut juga antioksidan endogenous atau enzimatik. Senyawa dikatakan sebagai 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 (Winarsi, 2007).

3.2. Antioksidan sekunder. Antioksidan sekunder berfungsi menangkap radikal bebas serta mencegah terjadinya reaksi berantai sehingga tidak terjadi kerusakan yang lebih besar. Contoh antioksidan sekunder adalah asam askorbat (vitamin C) dan α -tokoferol. Antioksidan sekunder disebut juga sebagai antioksidan eksogenoous atau nonenzimatis. Antioksidan kelompok ini juga disebut sistem pertahanan preventif, yaitu terbentuknya senyawa oksigen reaktif dihambat dengan cara pengkelatan logam atau dirusak pembentukannya dengan cara memotong reaksi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkapnya (Winarsi, 2007).

3.3. Antioksidan tersier. Antioksidan tersier merupakan senyawa yang memperbaiki sel-sel pada jaringan yang rusak karena serangan radikal bebas. 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).

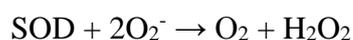
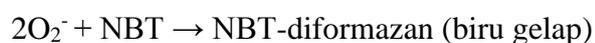
4. Metode uji aktivitas antioksidan

4.1. MDA scavenging assay. Pada keadaan oksidatif stres, ROS yang tinggi dapat mengoksidasi lipid (peroksidasi lipid) seperti terhadap asam lemak tak jenuh berantai panjang (*Polyunsaturated Fatty Acid*) menjadi radikal bebas yang reaktif salah satunya adalah MDA. MDA menjadi indikator stres oksidatif yang

menunjukkan telah terjadi lipid peroksidasi. Aktivitas antioksidan suatu senyawa dapat ditentukan dengan tingkat pengurangan kadar MDA setelah penambahan senyawa antioksidan. Metode penentuan kadar MDA dilakukan dengan menggunakan *malondialdehyde assay kit*. Reaksi lipid peroksidasi membentuk MDA dan 4 hidroksinonerial (4-HNE). Pengukuran produk akhir peroksidasi lipid adalah salah satu tes yang paling banyak digunakan untuk kerusakan oksidatif (Hermann dan Kevin, 1999). MDA dalam sampel direaksikan dengan asam thiobarbituric (TBA) untuk menghasilkan kompleks MDA-TBA. Kompleks MDA-TBA dapat ditentukan secara kalorimetri pada $\lambda = 532$ nm atau fluorometri Ex / Em = 532/553 nm (Biovision, 2013).

4.2. SOD activity assay. Metode pemeriksaan yang dilakukan adalah metode enzimatik dengan menggunakan kit *Superoxide Dismutase Activity Assay*. Enzim SOD merupakan salah satu enzim oksidatif yang paling penting untuk mengkatalisis dismutasi anion superoksida menjadi hidrogen peroksida dan molekul oksigen. Sensitivitas *SOD assay kit* menghasilkan perwarnaan larutan formazan yang menyebabkan pengurangan anion superoksida. Tingkat pengurangan anion superoksida berbanding lurus dengan aktivitas xantin oksidase dan dihambat oleh SOD (Biovision, 2013).

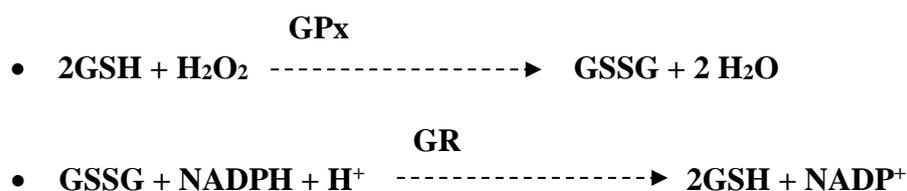
Metode pengukuran SOD digunakan untuk mengukur kapasitas menangkap radikal anion superoksida. Reaksi kimia yang menjadi dasar pengukuran adalah



Enzim SOD merupakan enzim antioksidan endogen yang mempunyai peranan penting secara langsung melindungi sel dari gangguan radikal bebas, dan secara tidak langsung memelihara keseimbangan oksigen yang bersifat toksik (Wresdiyati *et al.*, 2006). Pengukuran kandungan enzim antioksidan SOD merupakan cara untuk mengetahui kondisi pertahanan sel terhadap radikal bebas. Aktivitas SOD bervariasi pada beberapa organ. Aktivitas SOD tertinggi terdapat pada hati, diikuti kelenjar adrenal, ginjal, darah, limpa, pankreas, otak, paru-paru, usus, ovarium, dan timus (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Enzim SOD berperan dalam proses degradasi senyawa ROS. ROS ialah senyawa yang mempunyai gugus oksigen reaktif dan memiliki bentuk serta aktivitas sebagai radikal bebas. Senyawa ini cenderung menyumbangkan atom oksigen atau elektron pada senyawa lainya (Halliwell & Gutteridge, 1999).

4.3. GPx activity assay. Metode pemeriksaan yang dilakukan adalah metode enzimatis dengan menggunakan kit *Glutathione peroxidase assay (Biovision)*. GPx mengkonversi glutathione tereduksi (GSH) dan hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi glutathione teroksidasi (GSSG) dan air (H_2O). Reagen GPx mereduksi hidrogen peroksida saat terjadi oksidasi GSH ke GSSG. GSSG yang dihasilkan selanjutnya direduksi menjadi GSH oleh GR (Glutation reduktase) dengan menggunakan NADPH.

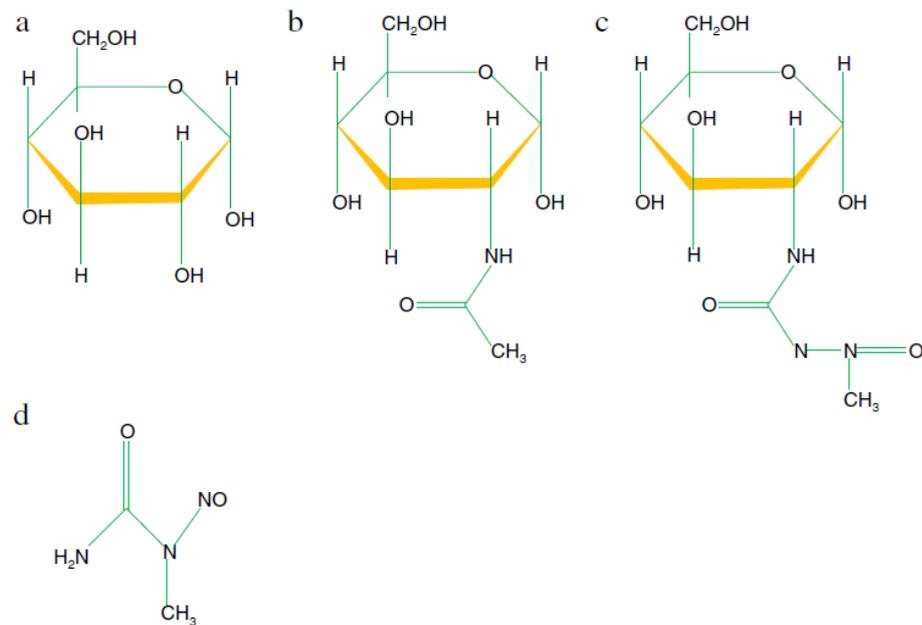


Penurunan NADPH (biasanya diukur pada panjang gelombang 340 nm) sebanding dengan aktivitas GPx (Biovision, 2013; Winarsi, 2007).

G. Streptozotosin dan Nikotinamid

Streptozotosin (STZ) (2-deoksi-2-(3-metil-3-nitrosurea)1-D- glukopiranosose) adalah senyawa alami yang diproduksi oleh bakteri *Streptomyces achromogenes* yang memiliki aktivitas antibakteri spektrum luas. Streptozotosin larut dalam air, keton, dan alkohol rendah dan agak larut dalam pelarut organik polar. Streptozotosin memiliki rumus molekul $C_8H_{15}N_3O_7$, berat molekul 265 g/mol dan terdiri dari nitrosurea dengan ujung satu berikatan dengan grup metil dan ujung lainnya berikatan dengan glukosa (Eleazu *et al.*, 2013).

Streptozotosin adalah senyawa kimia sitotoksik mirip gula. Struktur kimia streptozotosin dapat dilihat pada gambar 3c. Streptozotosin pada mulanya digunakan sebagai agen alkilasi pada kemoterapi metastase tumor sel islet pankreas. Pada tahun 1963, Rakietyen beserta kolega-koleganya melaporkan bahwa streptozotosin senyawa diabetogenik, kemudian STZ beralih fungsi sebagai menjadi salah satu agen kimia yang menginduksi diabetes pada hewan eksperimental. Streptozosin memiliki sifat kimia:



Gambar 3 Struktur streptozotocin (c), glukosa (a), N-asetil glukosamin (b), metilnitrosurea (d) (Eleazu *et al.*, 2013).

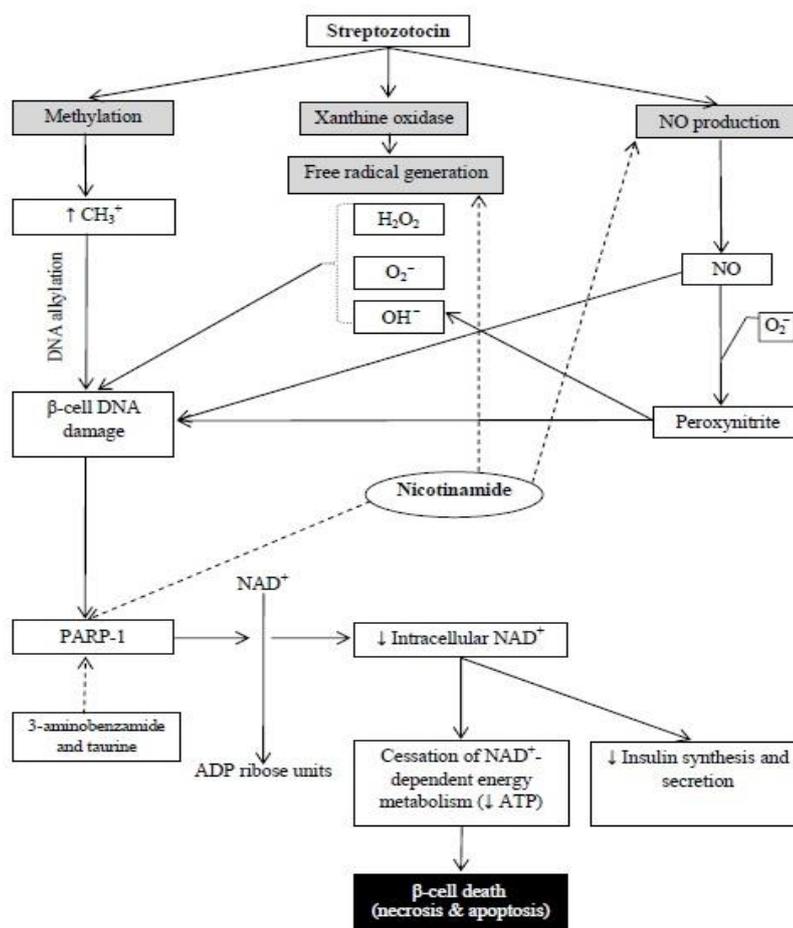
- a. Senyawa sitotoksik dengan bagian separuh metil nitrosurea (N-metil-N-nitrosurea) (gambar 3d) berikatan dengan bagian separuh lagi yaitu molekul glukosa (2-deoksiglukosa) (gambar 3a).
- b. Senyawa derivat glukosamin (gambar 3b).
- c. Senyawa mirip gula yang toksik terhadap sel β pankreas.
- d. Senyawa hidrofilik.
- e. Senyawa agen alkilasi.
- f. Senyawa analog gula toksik dan N-asetil glukosamin yang diakumulasi terutama oleh GLUT 2 transporter ke dalam sel β pankreas.
- g. Stabil pada pH 7,4 dan 37°C paling tidak selama lebih dari 1 jam.
- h. Memiliki waktu paruh biologis 5 – 15 menit.

- i. Apabila dibentuk ulang menjadi larutan, dapat disimpan pada suhu ruang atau di kulkas tapi, harus digunakan dalam selang waktu 12 jam jam apabila pada suhu ruang dan terlindung dari sinar matahari.

Aksi toksik selektif STZ terjadi di dalam sel β pada islet langerhans pankreas. Bagian lain molekul STZ adalah molekul gula yang membuat senyawa ini bisa masuk ke dalam sel karena sel β sangat sensitif dalam menyerap glukosa melalui protein pembawa GLUT-2 transporter. Sel β saja yang memiliki ekspresi protein GLUT-2 di islet. Sel-sel yang mengekspresikan protein GLUT-2 seperti hepatosit dan sel tubular renal juga terkena dampak STZ. Sel α yang secara anatomi berdekatan dengan sel β tetap utuh saat setelah induksi STZ (Eleazu *et al.*, 2013).

Proses mekanisme STZ merusak sel β pankreas melalui 3 jalur utama. Gambar 3 menunjukkan bahwa STZ masuk ke sel β dan merusak DNA (alkilasi DNA) melalui produksi ion carbonium, meningkatkan radikal bebas dalam sel (di dalam sel, STZ dimetabolisme dengan dan tanpa enzim) dan mengurangi jumlah produksi ATP sehingga sel menjadi rusak. Bagian molekul metilnitrosurea streptozotosin memiliki aktivitas metilasi DNA. Atom O ke-6 di guanin menjadi target utama metilasi streptozotosin selain pada cincin nitrogen dan atom luar cincin pada basa DNA. Molekul metilnitrosurea streptozotosin memproduksi ion karbonium (CH_3^+) yang kemudian memetilasi DNA. Metilasi ini mengaktifkan protein enzim perbaikan DNA poliADP-ribose polimerase 1 (PARP-1) yang berakibat pengurangan selular NAD^+ dan akhirnya mengurangi ATP selular dalam jumlah sangat banyak. PARP-1 adalah enzim nuklear yang mengkatalis sintesis poli(ADP) dari NAD^+ . Akibat proses aktivitas PARP yang tinggi mengakibatkan kehabisan energi selular ditambah dengan terjadinya metilasi DNA. Streptozotosin

dapat memproduksi nitrat oksida (NO) melalui metabolisme dengan atau tanpa enzim. NO hasil reaksi sebelumnya berikatan dengan radikal bebas anion superoksida (O_2^-) lebih lanjut akan membentuk radikal bebas baru peroksinitrit dan akan berubah lagi menjadi radikal hidroksil yang racun terhadap komponen genetik. Kenaikan kadar molekul radikal bebas ini dalam sel dapat menyebabkan stres oksidatif selular yang berujung kematian karena sel β memiliki aktivitas enzim antioksidan rendah (Eleazu *et al.*, 2013; Asghar & Sajad, 2014).



Gambar 4 Mekanisme streptozotocin merusak sel β pankreas (Asghar & Sajad, 2014).

Nikotinamid adalah derivat vitamin B3 (piridin-3-karboksamida) yang memiliki aktivitas antioksidan dalam mencegah kerusakan oleh streptozotosin. Mekanisme perlindungan nikotinamid bisa dilihat pada gambar 4. Nikotinamid bekerja dengan menghalangi radikal bebas oksigen dan nitrat oksida, menghambat aktivitas enzim PARP dalam memperbaiki DNA dan memproduksi NAD⁺ sehingga sel β tidak mengalami defisiensi ATP selular (Asghar & Sajad, 2014).

H. Hewan Uji

1. Sistematika tikus

Sistematika tikus putih menurut Sugiyanto (1995), adalah sebagai berikut :

Filum	: Chordata
Sub filum	: Vertebrata
Kelas	: Plasentalia
Bangsa	: Rodentia
Suku	: Muidae
Marga	: Ratus
Jenis	: <i>Rattus novergicus</i>

2. Karakteristik utama tikus putih

Tikus putih memiliki suhu tubuh normal 37,5° C dan aktivitasnya nokturnal (pada malam hari). Tikus tenang dan mudah ditangani jika dipegang dengan cara yang benar. Tikus yang dibiakkan dilaboratorium lebih cepat dewasa dan lebih mudah berkembang biak. Berat badan tikus laboratorium lebih ringan dibandingkan berat badan tikus liar (Smith & Mangoenwidjojo, 1988).

I. Simplisia dan Metode Penyarian

1. Simplisia

Simplisia adalah bentuk jamak dari kata simpleks yang berasal dari kata *simple*, berarti satu atau sederhana. Simplisia adalah bahan alami yang digunakan sebagai bahan obat dan belum mengalami perubahan proses apapun, kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia terdiri atas tiga golongan yaitu simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan atau mineral. Simplisia nabati adalah simplisia yang dapat berupa tanaman utuh, bagian tanaman, eksudat tanaman, atau gabungan antara ketiganya. Simplisia hewani adalah simplisia berupa hewan utuh atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa bahan kimia murni. Simplisia pelikan atau mineral adalah simplisia berupa bahan pelikan atau mineral yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan tidak berupa bahan kimia murni (Gunawan dan Mulyani, 2004).

2. Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu cara penyarian terhadap simplisia dengan menggunakan suatu penyari tertentu. Ekstraksi yang tepat bergantung pada jenis senyawa yang diisolasi dan pelarut yang digunakan. Ekstraksi senyawa yang terdapat dalam tumbuhan terlebih dahulu enzimnya dinaktifkan dengan mengeringkan bagian tumbuhan yang akan diambil sebelum diekstraksi. Ekstraksi bisa menggunakan cara maserasi, soxhlet, dan perkolasi. Cairan penyari yang dapat digunakan eter, *n*-heksana, dan alkohol (Harborne, 1987).

3. Metode ekstraksi

Metode ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut yang cocok. Dasar dari metode ekstraksi adalah adanya perbedaan kelarutan (Gunawan dan Mulyani, 2004). Cara ekstraksi dapat dibedakan menjadi infudasi, maserasi, soxhletasi, dan perkolasi.

3.1. Infudasi. Infusa adalah sediaan cair yang dibuat dengan menyari simplisia dengan air pada suhu 90 °C selama 15 menit. Infudasi adalah proses penyarian yang umumnya digunakan untuk menyari zat kandungan aktif yang larut dalam air dari bahan-bahan nabati. Penyarian dengan cara ini menghasilkan sari yang tidak stabil dan mudah tercemar oleh kuman dan kapang. Sari yang diperoleh dengan cara ini tidak boleh disimpan lebih dari 24 jam (Depkes, 1986).

3.2. Soxhletasi. Soxhletasi merupakan penyarian dimana bahan yang akan diekstraksi berada dalam sebuah kantong ekstraksi (kertas, karton dan sebagainya) di dalam sebuah alat ekstraksi dari gelas yang bekerja kontinyu (perkolator). Wadah gelas yang mengandung kantong diletakkan diantara labu suling dan suatu pendingin aliran balik dan dihubungkan melalui pipa pipet. Labu tersebut berisi bahan pelarut yang menguap dan mencapai ke dalam pendingin aliran balik melalui pipa pipet kemudian berkondensasi di dalamnya menetes ke atas bahan yang diekstraksi dan membawa keluar bahan yang diekstraksi. Larutan berkumpul di dalam wadah gelas dan setelah mencapai tinggi maksimal secara otomatis ditarik ke dalam labu, kemudian zat yang terekstraksi tertimbun melalui penguapan kontinyu dari bahan pelarut murni. Kekurangan metode soxhletasi adalah dibutuhkan suatu ekstraksi beberapa jam pada umumnya dan dengan demikian

kebutuhan energinya tinggi, serta dapat merusak bahan aktif yang tidak tahan terhadap panas (Voigt, 1994).

3.3. Metode maserasi. Maserasi (*macerace* = mengairi, melunakkan, merendam) merupakan cara penyarian yang sederhana. Proses maserasi diawali dengan merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari sampai meresap dan melunakan susunan sel sehingga zat-zat akan terlarut. Rendaman tersebut kemudian disimpan agar terlindung dari cahaya matahari langsung (mencegah terjadinya reaksi katalis akibat cahaya dan terjadinya perubahan warna) kemudian dikocok kembali (Voigt 1994). Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah dilakukan, sedangkan kerugian maserasi adalah pengerjaannya lama dan penyariannya kurang sempurna (Depkes, 1986).

3.4. Metode perkolasi. Perkolasi adalah cara penyarian yang dilakukan dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Prinsip perkolasi adalah serbuk simplisia ditempatkan dalam wadah berbentuk silinder atau kerucut yang bagian bawahnya diberi sekat berpori. Cairan penyari dialirkan dari atas ke bawah melalui serbuk tersebut, cairan penyari akan melarutkan zat aktif sel-sel yang dilalui sampai mencapai keadaan jenuh (Depkes, 1986).

4. Fraksinasi

Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan kandungan kimia dalam sampel menjadi beberapa golongan berdasarkan tingkat kepolarannya. Pemisahan jumlah dan jenis senyawa menjadi fraksi yang berbeda, tergantung pada jenis tumbuhan. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut yang polar demikian

pula sebaliknya. Fraksinasi dilakukan secara bertahap mulai dari pelarut yang lebih nonpolar lalu pelarut yang lebih polar. Salah satu metode yang dapat digunakan dalam fraksinasi adalah ekstraksi cair-cair (Harborne, 1987)

5. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi adalah istilah yang digunakan untuk metode pemisahan dari larutan yang kompleks berisi banyak senyawa menjadi larutan yang lebih sederhana. Semua metode kromatografi memiliki 2 komponen yang sama yaitu fase gerak (atau fase cair) dan fase diam (atau fase padat). Senyawa dalam larutan yang akan dipisahkan dilarutkan dalam fase gerak yang kemudian fase gerak akan bergerak melewati fase diam membawa senyawa yang akan dipisahkan. Senyawa-senyawa yang terlarut dalam fase gerak, bergerak melalui fase diam dengan keadaan dan kecepatan yang berbeda-beda sehingga menyebabkan pemisahan.

Kromatografi lapis tipis salah satu metode pemisahan yang banyak digunakan dalam pemisahan dan isolasi senyawa tumbuhan. Kromatografi ini menggunakan fase diam berupa pelat inert yang permukaannya dilapisi adsorben seperti silika gel, alumina atau selulosa. Campuran yang akan dipisahkan ditotolkan di dekat ujung pelat KLT kemudian pelat dimasukkan ke dalam wadah tertutup yang dasarnya berisi sedikit eluen sebagai fase gerak yang cukup hanya merendam bagian ujung pelat. Eluen ini akan bergerak perlahan ke atas melalui adsorben karena aksi kapiler (Sanjeet *et al.*, 2012).

6. Cairan penyari

Sistem pelarut yang digunakan dalam ekstraksi dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah yang maksimum dari zat aktif dan

seminimum mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan. Pelarut yang biasa digunakan adalah air, eter, etanol atau campuran etanol dengan air (Ansel, 1989).

Etanol merupakan pelarut yang baik untuk ekstraksi. Etanol dipertimbangkan sebagai pelarut karena mempunyai beberapa sifat antara lain lebih selektif, kapang dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 20 % keatas, tidak beracun, bersifat netral, absorpsinya baik, dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih rendah (Depkes, 1986). Etanol diketahui sangat efektif dalam menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal. Keuntungan etanol adalah tidak menyebabkan pembengkakan membran sel dan memperbaiki stabilitas bahan obat terlarut, etanol juga mempunyai sifat yang mampu mengendapkan albumin dan menghambat kerja enzim (Voigt, 1994).

Air memiliki gaya ekstraksi yang menonjol untuk banyak bahan kandungan simplisia yang aktif secara terapeutik, tetapi sekaligus juga mampu mengekstraksi sejumlah besar bahan simplisia (Voigt 1994). Air merupakan penyari polar yang mudah didapat, harganya murah, stabil, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun dan kerja melarutkannya baik untuk banyak zat aktif dalam tanaman, dalam beberapa hal air digunakan untuk ekstraksi obat terutama dalam kombinasi dengan pelarut lain (Depkes, 1986; Ansel, 1989).

J. Histopatologi Organ Pankreas

1. Pengertian histologi

Kata *histology* berasal dari bahasa Yunani yaitu dari akar kata *histos* yang berarti jaringan dan kata *logos* yang berarti ilmu pengetahuan atau ilmu yang mempelajari. Jadi secara harafiah dapat diartikan bahwa *histology* adalah ilmu

pengetahuan yang mempelajari tentang jaringan dasar tubuh (Muntiha, 2001). Pemeriksaan histopatologi bertujuan untuk mengetahui perubahan-perubahan yang terjadi pada pankreas tikus yang mengalami hiperglikemia akibat induksi streptozotosin (Rahayu *et al*, 2006).

2. Kerusakan pankreas

Hewan percobaan yang diinduksi streptozotosin akan mengalami metabolisme dengan atau tanpa enzim menghasilkan radikal bebas yang menyerang komponen sel penting seperti DNA. Radikal ini mengakibatkan kerusakan pada sel β 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. Sel β yang rusak tidak mampu menghasilkan insulin sehingga terjadi penyakit diabetes yang dikarakterisasi dengan keadaan hiperglikemia (Asghar & Sajad, 2014).

Penderita DM tipe I ditemukan perubahan-perubahan pada pankreas berupa pengecilan ukuran dari pankreas (nekrosis), atrofi pada bagian eksokrin pankreas dan atrofi sel-sel asinar di sekitar pulau Langerhans yang mengalami degenerasi. DM tipe II yang terjadi adalah ketidakseimbangan dari sekresi eksokrin pankreas dan gangguan kontrol glukosa darah (Sanberg & Philip, 2008).

3. Nekrosis

Nekrosis yaitu kematian sel akibat kerusakan yang fatal ditandai oleh kerusakan struktur dan fungsi sel secara menyeluruh yang diikuti dengan lisisnya sel dan peradangan jaringan sehingga terdapat ruang-ruang kosong pada islet Langerhans disebabkan karena nekrosis dari sel β (Nurdiana, 1998). Sel yang mengalami nekrosis dapat dilihat dari perubahan inti selnya yaitu adanya piknotik

(Vinay *et al.*, 2007). Perubahan inti piknotik dengan ciri-ciri sebagai berikut: inti sel yang mati menyusut, batasnya tidak teratur dan berwarna gelap. Proses ini dinamakan piknotis, sedangkan intinya disebut inti piknotik (Price & Wilson, 1992).

4. Metode pembuatan preparat histopatologi

Tahap pembuatan preparat terdiri dari *tissue sampling*, *fixation*, *Dehydration*, *clearing*, *embedding*, *sectioning*, dan *staining*. *Tissue sampling* adalah tahap pengambilan jaringan yang akan dijadikan preparat sebagai tahap awal dalam pembuatan preparat histopatologi. *Fixation* atau fiksasi adalah tahap perendaman organ di dalam cairan kimia. Fiksasi dilakukan untuk mengawetkan jaringan dan agar tidak mengalami kerusakan akibat enzim dan bakteri dan menjaga keadaan jaringan saat masih segar. Cairan fiksasi yang digunakan adalah formalin 10% (pH 7). *Dehydration* atau dehidrasi adalah tahap pengeluaran air di jaringan dan cairan fiksatif menggunakan cairan dehidrasi. Tahap ini dilakukan dengan perendaman sampel di dalam etanol dengan konsentrasi bertingkat. Pertama sampel jaringan organ direndam dalam etanol 50% selama 1 jam, kemudian dilanjutkan di etanol 60% selama 1 jam dan seterusnya hingga etanol 100%. *Clearing* atau penjernihan adalah tahap pengeluaran cairan dehidrasi menggunakan cairan yang bisa bercampur dengan cairan dehidrasi dan cairan pengeras. *Embedmen* atau penanaman adalah tahap penanaman cairan ke dalam jaringan yang dimana cairan tersebut bisa memadatkan organ agar bisa dipotong menggunakan mikrotom. *Sectioning* atau pengirisan adalah tahap pembuatan irisan tipis jaringan organ menggunakan alat mikrotom. *Staining* adalah tahap pewarnaan irisan. Pewarnaan irisan menggunakan dapat menggunakan pewarna hemaktosilin dan eosin (HE). HE

termasuk dalam jenis pewarnaan ganda (*double staining*) karena mengandung dua jenis zat warna untuk mengamati preparat jaringan. Pada pewarnaan ganda umumnya pewarna yang digunakan bersifat asam dan yang lain bersifat basa (Runiana, 2009). Hematoxylin akan memberi warna biru pada nukleus, sementara eosin memberi warna merah muda pada sitoplasma. Masih terdapat berbagai zat warna lain yang biasa digunakan dalam mikroteknik, tergantung pada jaringan yang ingin diamati (Muntiha, 2001). Pengamatan jaringan pankreas dengan pewarnaan hematoxylin dan eosin dilihat dari morfologi umum jaringan pankreas meliputi keadaan sel-sel pada pulau Langerhans dan sel-sel asinar, adanya peradangan, serta menghitung jumlah pulau Langerhans per lapangan pandang (Taufan *et al.*, 2009).

K. Landasan Teori

Kondisi hiperglikemia menyebabkan aktifnya metabolisme glukosa lainnya seperti autooksidasi glukosa, glikasi protein dan aktivasi jalur metabolisme poliol yang selanjutnya mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif (Uneo *et al.*, 2002). Pembentukan senyawa oksigen reaktif pada kondisi hiperglikemia dapat meningkatkan modifikasi lipid, DNA dan protein pada berbagai jaringan tubuh karena kadar gula darah tinggi mengakibatkan ketidakseimbangan antara antioksidan protektif dan peningkatan produksi dan aktivitas radikal bebas. Hal ini merupakan awal dari kerusakan oksidatif yang dikenal dengan istilah stres oksidatif. Peningkatan dan perkembangan komplikasi dari DM merupakan akibat dari kontribusi stres oksidatif yang besar (Abheri *et al.*, 2010; Basu *et al.*, 1999).

Sumber radikal bebas terbesar terjadi selama proses transpor elektron adalah superoksida dan produksinya dapat meningkat dalam keadaan hiperglikemia.

Superoksida diubah menjadi hidrogen peroksida dan selanjutnya masuk ke dalam membran sel dan dapat menyebabkan kerusakan jaringan pankreas. Selain itu pada proses autooksidasi glukosa juga dihasilkan radikal bebas hidroksil. Radikal bebas menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid dengan membentuk MDA dan kadar MDA yang tinggi dapat digunakan sebagai penanda kerusakan oksidatif (Suarsana *et al.*, 2011). Senyawa antioksidan diperlukan untuk meredam stres oksidatif. Senyawa antioksidan adalah senyawa yang mampu menangkal atau meredam dampak negatif oksidan dalam tubuh (Shashank & Abhay, 2013).

Penghambatan pembentukan radikal bebas oleh antioksidan memberikan kesempatan bagi tubuh untuk memperbaiki sel dan melakukan regenerasi sel yang rusak dan mati. Regenerasi sel β pankreas diawali dengan perbaikan sel-sel β pankreas dan pembelahan sel β pankreas yang baru (mitosis) yang menyebabkan sejumlah sel β pankreas bertambah sehingga diharapkan produksi insulin meningkat dan kadar glukosa darah berangsur-angsur menjadi normal kembali (Yuriska, 2009).

Studi aktivitas antioksidan alami telah banyak dilakukan dan menunjukkan bahwa antioksidan alami mampu melindungi tubuh terhadap kerusakan yang disebabkan spesies oksigen reaktif dan menghambat penyakit degeneratif. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa senyawa fenolik seperti flavonoid mempunyai aktivitas antioksidan penangkap radikal (Sunarni *et al.*, 2007). Senyawa golongan flavonol dan flavon menunjukkan sifat antidiabetes pada uji *in vivo* pada tikus (Lukacinova *et al.*, 2008).

Tanaman kersen adalah tanaman yang mempunyai aktivitas antioksidan dan antidiabetes (Aruna *et al.*, 2013; Vembriarto & Rahmat, 2014; M. Shidar *et al.*,

2011). Senyawa tanin, fenolik dan flavonoid merupakan senyawa yang terkandung dalam daun kersen dan memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Penelitian yang dilakukan oleh Aruna *et al.* (2013) mengenai aktivitas antioksidan pada daun kersen (selain aktivitas penurun kadar gula darah) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kersen memberikan aktivitas antioksidan yang paling tinggi dibandingkan ekstrak air, eter dan kloroform walaupun belum mendekati standar yang digunakan. Nilai IC50 aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun kersen yang diberikan melalui metode DPPH sebesar $79,96 \pm 0,91 \mu\text{g}/\text{mL}$. Penelitian yang telah dilakukan oleh Mahmoud (2014) terhadap beberapa tanaman menunjukkan bahwa beberapa metabolit sekunder yang dapat mengontrol kadar glukosa darah adalah flavonoid, quercetin, quinolizidine, antosianin, katekin, flavon dan kumarin. Rinakit (2011) melakukan penelitian menggunakan fraksi etil asetat dengan 3 macam dosis (60, 120 dan 240 mg/kg bb) yang diberikan ke mencit. Penelitian ini menggunakan hewan uji mencit yang diinduksi aloksan. Hewan uji dibagi menjadi 5 kelompok, kontrol negatif (hanya induksi DM), kontrol positif (menggunakan glibenklamid 1,3 mg/kg bb), fraksi etil asetat dosis 60 mg/kg bb, fraksi etil asetat dosis 120 mg/kg bb dan fraksi etil asetat dosis 240 mg/kg bb. Hasil penelitian menunjukkan persen penurunan gula darah pada semua kelompok adalah kontrol negatif (6,05%), kontrol positif (42,19%), fraksi etil asetat dosis 60 mg/kg bb (39,04%), fraksi etil asetat dosis 120 mg/kg bb (52,17%) dan fraksi etil asetat dosis 240 mg/kg bb (69,52%). Pada uji LSD didapat nilai signifikansi $p < 0,05$ pada dosis 240 mg/kg bb memberikan efek penurunan yang bermakna (69,52 %) dibandingkan kontrol positif (glibenklamid 1,3 mg/kg bb) (42,19 %) dan dosis 120 mg/kg bb memberikan efek penurunan yang tidak bermakna terhadap kontrol positif (52,17 %) dan dosis

60 mg/kg bb pun demikian (39,04 %). Peneliti mengemukakan bahwa fraksi etil asetat daun kersen mengandung kalkon, isoliquiritigenin, krisin dan flavonoid yang diduga bekerja secara sinergis menurunkan kadar glukosa darah mencit. Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kersen diketahui mengandung senyawa-senyawa flavonoid seperti quercetin, rutin, kirsin, quersitrin dan kaempferol dimana flavonoid-flavonoid tersebut memiliki aktivitas antihiperglikemia (Shasank & Abhay, 2013).

L. Hipotesis

1. Fraksi etil asetat dan ekstrak etanol daun kersen mempunyai aktivitas antihiperglikemia terhadap tikus yang diinduksi streptozotosin.
2. Fraksi etil asetat dan ekstrak etanol daun kersen dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan SOD, GPx dan menurunkan kadar MDA.
3. Fraksi etil asetat dan ekstrak etanol daun kersen dapat memperbaiki sel β pankreas.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan rancangan *post test only control group design*. Desain penelitian ini adalah terdapat dua kelompok yang masing-masing dipilih secara acak. Penelitian dilakukan terhadap tikus jantan strain Wistar yang diinduksi *Diabetes melitus* (DM) dengan menggunakan streptozotosin-nikotinamid. Kelompok eksperimen dengan variasi dosis dan kelompok yang tidak diberi perlakuan disebut kelompok kontrol. Perbedaan yang signifikan yang terjadi antara kelompok eksperimen terhadap kelompok kontrol memberikan makna perlakuan yang diberikan berpengaruh secara signifikan.

B. Subyek dan Lokasi Penelitian

Subyek penelitian ini adalah tikus Wistar jantan yang dikondisikan DM dengan induksi streptozotosin yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Gadjah Mada, berumur 2 bulan dengan berat badan 150-250 gram. Pengamatan dilakukan di PAU (Pusat Antar Universitas) Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM. Hati dan pankreas tikus yang diambil setelah masa perlakuan selesai diolah untuk uji aktivitas enzim antioksidan dan regenerasi sel β pankreas. Pengukuran kadar glukosa darah, aktivitas enzim antioksidan SOD dan GPx dan penentuan kadar MDA dilakukan di PAU (Pusat Antar Universitas)

Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM. Pembuatan preparat histologi dilakukan di Laboratorium Histologi Universitas Sebelas Maret dan pengamatan preparat histologi dilakukan di Laboratorium Anatomi dan Fisiologi Universitas Setia Budi. .

C. Populasi dan Sampel

Populasi adalah keseluruhan objek penelitian atau objek yang diteliti (Notoatmodjo, 2002). Populasi dalam penelitian ini adalah daun kersen yang diperoleh dari desa Gebang kelurahan Kadipiro, kecamatan Banjarsari, kota Surakarta.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang dianggap mewakili seluruh populasi dalam penelitian (Notoatmodjo, 2002). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kersen berusia 5-6 bulan yang berwarna hijau, tidak busuk dan belum berubah warna. Sampel dari desa Gebang kelurahan Kadipiro kecamatan Banjarsari kota Surakarta provinsi Jawa Tengah pada bulan Mei 2016.

D. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel penelitian

Variabel dalam dalam penelitian ini adalah variabel yang akan diteliti dan hasilnya akan dianalisis lebih lanjut sesuai dengan rancangan penelitian. Variabel penelitian diklasifikasikan menjadi tiga yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel kendali.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel

bebas dalam penelitian ini adalah fraksi etil asetat dan ekstrak etanol daun kersen dengan dosis 250 dan 350 mg/ kg bb yang akan digunakan dalam tiap percobaan.

Variabel tergantung adalah fokus persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah penurunan kadar gula darah, penurunan kadar MDA, kenaikan aktivitas SOD dan Gpx, regenerasi islet langerhan pankreas dan gambaran histopatologi pankreas.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung selain variabel bebas, yaitu kondisi pengukur atau peneliti, laboratorium dan kondisi fisik dari hewan uji yang meliputi berat badan, usia, lingkungan tempat hidup, jenis kelamin dan galur, alat pembaca absorbansi, dan konsentrasi reagen pembacaan kadar MDA, SOD, GPx, suhu inkubasi dan lama perlakuan.

2. Definisi operasional

Daun kersen diperoleh dari daerah desa Gebang kelurahan Kadipiro kecamatan Banjarsari kota Surakarta, Jawa Tengah.

Serbuk daun kersen adalah daun kersen yang dikeringkan, kemudian dihaluskan dengan cara diblender sampai menjadi serbuk dan diayak dengan ayakan mesh 40.

Ekstrak etanol daun kersen adalah ekstrak yang dihasilkan dari penyarian dengan maserasi serbuk daun kersen menggunakan etanol 96% sebagai cairan penyari, lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai didapatkan ekstrak kental daun kersen.

Fraksi daun kersen adalah hasil dari penyarian lebih lanjut (fraksinasi) dari ekstrak etanol daun kersen menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan gradien pelarut dari non polar sampai ke polar (heksan, etil asetat, air).

Dosis uji adalah dosis dari ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kersen yaitu masing-masing 250 mg/kg bb dan 350 mg/kg bb.

Dosis ekstrak etanol daun kersen adalah variasi dosis ekstrak etanol yang diberikan kepada hewan uji dan dinyatakan dalam mg/kg bb.

Variasi dosis ekstrak etanol daun kersen yang dimaksud adalah 250 mg/kg bb dan 350 mg/kg bb.

Dosis fraksi etil asetat daun kersen adalah variasi dosis ekstrak daun kersen yang diberikan kepada hewan uji dan dinyatakan dalam mg/kg bb.

Variasi dosis fraksi daun kersen yang dimaksud adalah 250 mg/kg bb dan 350 mg/kg bb.

Aktivitas antihiperlikemia adalah aktivitas fraksi etil asetat dan ekstrak etanol daun kersen sebagai penurun kadar glukosa darah tikus putih jantan galur Wistar (*Ratus norvegicus*) yang ditentukan dengan menggunakan GOD-PAP dan dinyatakan dalam mg/dl menggunakan alat spektrofotometer UV-VIS dan dibandingkan dengan kontrol negatif.

Aktivitas peningkatan enzim antioksidan adalah aktivitas ekstrak etanol dan fraksi etil asetat dalam meningkatkan aktivitas SOD, GPx dan menurunkan kadar MDA dengan membandingkan kontrol negatif.

Aktivitas regenerasi sel β pankreas adalah aktivitas fraksi etil asetat dan ekstrak etanol daun kersen dalam memperbaiki sel β pankreas yang teramati pada

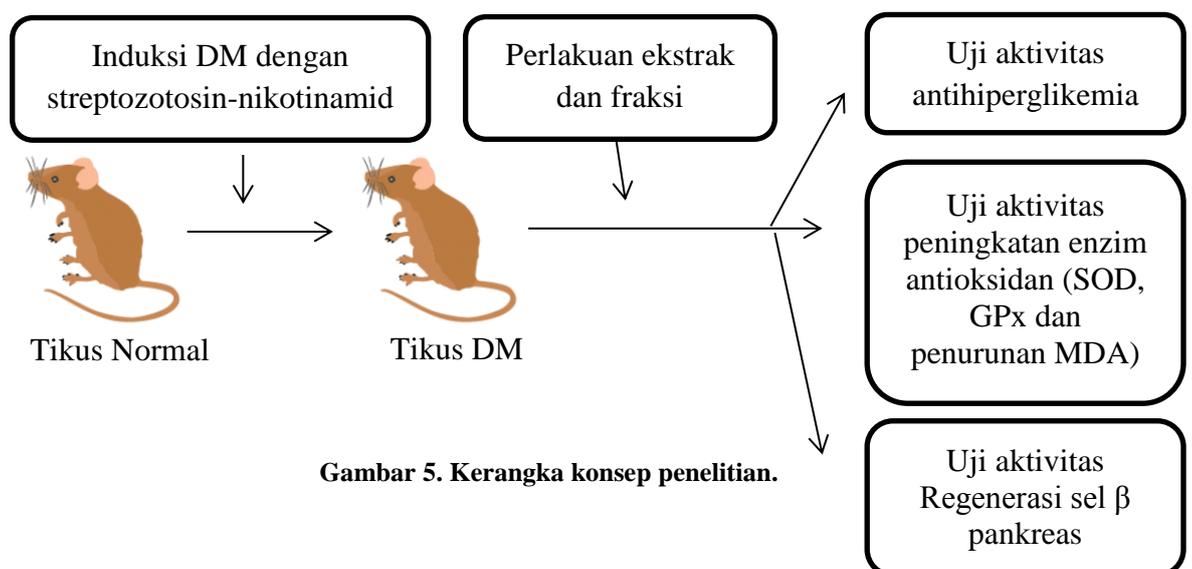
preparat histologi setelah perbandingan terhadap preparat histopatologi kontrol negatif.

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih galur Wistar jantan sehat dengan bobot 150-250 gram, umur 8 minggu, dengan makanan yang diberikan adalah makanan standar tikus.

Tikus diabetes adalah tikus yang dibuat diabetes dengan penginduksian streptozotosin dosis 65 mg/kg bb tikus dan nikotinamid 230 mg/kg bb tikus secara intraperitoneal dan ditandai dengan kadar glukosa darah tinggi (dibandingkan kontrol normal atau kadar gula darah puasa lebih dari 200 mg/dl) dan terjadi nekrosis islet pankreas pada preparat histologi.

E. Kerangka Konsep Penelitian

Berikut adalah konsep penelitian aktivitas antihiperqlikemia dan regenerasi sel β pankreas dari ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kersen (*Muntingia calabura*) terhadap tikus yang diinduksi streptozotosin-nikotinamid:



Gambar 5. Kerangka konsep penelitian.

F. Bahan dan alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kersen yang diperoleh di desa Gebang kelurahan Kadipiro kecamatan Banjarsari kota Surakarta, Jawa Tengah. Bahan untuk ekstraksi adalah cairan etanol 96%, heksan, aquadest dan etil asetat. Bahan induksi diabetes menggunakan streptozotosin 65 mg/Kg bb tikus dan nikotinamid 230 mg/kg bb tikus dalam larutan bafer sitrat, larutan CMC 0,5 % dan glibenklamid sebagai kontrol positif. Bahan untuk mengukur kadar gula darah adalah reagen GOD-PAP (glukosa oksidase, fenol, 4-aminoantipirin dan peroksidase). Bahan untuk mengukur aktivitas antioksidan adalah reagen pengujian aktivitas enzim SOD, GPx dan penurunan kadar MDA.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol maserasi, corong pemisah, gelas beker, kain flanel, corong gelas, oven, kertas saring, batang pengaduk, labu takar, alat bedah, sentrifuga, inkubator, mikropipet, *microplate reader*, *moisturize balance*, timbangan listrik AEG-120 Shimadzu[®], mikroskop kamera LEICA, spektrofotometer UV Vis dan alat gelas.

3. Hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih jantan galur Wistar (*Ratus norvegicus*) umur 8 minggu dengan berat badan berkisar 150-250 gram.

G. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kersen yang diperoleh dari desa Gebang kelurahan Kadipiro kecamatan Banjarsari kota Surakarta, Jawa Tengah.

2. Identifikasi daun kersen

Penelitian dimulai dengan menetapkan kebenaran sampel tanaman kersen sesuai dengan ciri-ciri makroskopis dan mikroskopis dari tanaman tersebut, dan mencocokkan ciri-ciri morfologis yang ada pada sampel daun kersen terhadap kepustakaan *Flora of Java* (Backer, 1968) dan dibuktikan di unit Laboratorium Biologi, Fakultas Farmasi, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

3. Pengeringan daun kersen

Daun kersen yang sudah terkumpul akan dicuci dengan air mengalir kemudian dikeringkan dan dikeringkan dengan oven pada suhu 40° C.

4. Pembuatan serbuk daun kersen

Daun kersen yang telah dikeringkan dijadikan serbuk. serbuk kemudian diayak dengan ayakan nomor 40 mesh. Serbuk yang tersaring disimpan dalam tempat kering dan tertutup rapat.

5. Penetapan susut pengeringan serbuk daun kersen

Penetapan kadar air serbuk daun kersen menggunakan alat *moisture balance* dengan cara menimbang serbuk daun kersen seberat 2 gram, dimasukkan dalam neraca timbang alat. Alat akan melakukan pemanasan dengan suhu naik secara perlahan sampai 105° C terhadap sampel sekaligus menentukan berat sampel dan kadar air sampel. Pemanasan sampel akan berhenti secara otomatis (apabila diatur

otomatis) apabila berat sampel tidak ada perubahan selama 2 menit pada suhu 105°
C. Alat akan langsung memberikan angka berat sampel setelah pemanasan dan kadar air sampel.

6. Pembuatan ekstrak etanol daun kersen

Serbuk daun kersen kering ditimbang seberat 500 gram, dimasukkan dalam wadah berwarna gelap dan ditambahkan etanol 96% sebanyak 3,75 L. Campuran tersebut diaduk kemudian segera disimpan dalam ruangan yang terhindar dari sinar matahari dan didiamkan selama 5 x 24 jam sambil sesekali diaduk. Maserat disaring dengan kain flanel dan diperas, filtrat yang didapat ditampung dan disaring menggunakan cawan buchner. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* (Depkes RI, 1986).

7. Fraksinasi ekstrak etanol daun kersen

Ekstrak etanol kental daun kersen dibasahi dengan 65 mL air suling dan 10 mL etanol 96% kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah, ditambahkan 75 mL pelarut heksane, digoyang dengan kuat dan didiamkan selama 10 menit hingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan bagian atas diambil sebagai fraksi heksane menggunakan pipet. Pemisahan dilakukan sampai 5 kali. Selanjutnya campuran ditambahkan dengan 75 mL pelarut etil asetat, digoyang dan didiamkan lagi selama 10 menit hingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan atas merupakan fraksi etil asetat dan lapisan bawah fraksi air. Pemisahan dilakukan 5-6 kali sampai terjadi lapisan yang bening. Fraksi yang diperoleh diuapkan hingga bobot tetap menggunakan oven dengan suhu 50°C.

8. Identifikasi flavonoid fraksi-fraksi ekstrak etanol daun kersen dengan KLT

Uji identifikasi flavonoid dari fraksi etil asetat, heksane dan air dilakukan secara kualitatif menggunakan KLT. Identifikasi dilakukan oleh tenaga laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Identifikasi flavonoid akan dilakukan berdasarkan metode dari Daniel (2012) yaitu, fraksi etil asetat dan ekstrak etanol ditotolkan pada plat KLT silika gel F254, dengan fase gerak heksan : etil asetat : asam formiat (6:4:0,2). Quersetin digunakan sebagai pembanding. Asam sitoborat digunakan sebagai penampak noda. Fraksi air diidentifikasi terpisah menggunakan pembanding rutin dengan menggunakan fase gerak campuran etil asetat : asam formiat : asam asetat glasial : air (100:11:11:27), fase diam silika gel 60 F254, deteksi dengan pereaksi warna Sitroborat. Hasil positif ditandai dengan fluoresensi warna kuning dengan paparan lampu UV λ 366 nm.

9. Pembuatan larutan Na CMC 0,5%

Larutan Na CMC 0,5% dibuat dengan melarutkan 0,5 g serbuk Na CMC ke dalam 100 mL aquadest menggunakan *Homogenizer* dengan putaran adukan 1000 rpm. Aquadest dipanaskan terlebih dahulu sampai mendidih lalu dibiarkan selama 5 menit. Tangan pengaduk *Homogenizer* dimasukkan ke dalam aquadest panas kemudian alat dihidupkan. Serbuk Na CMC lalu dimasukkan ke dalam aquadest panas. Pengadukan dihentikan sampai tidak ada gumpalan yang tidak tercampur dan terbentuk larutan jernih.

10. Pembuatan suspensi ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kersen

dalam larutan Na CMC 0,5%

Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat yang akan diberikan kepada tikus uji disuspensikan menggunakan larutan Na CMC 0,5%. Volume yang diberikan kepada tikus uji maksimal 2 mL. Ekstrak dan fraksi disuspensikan menggunakan alat *Homogenizer*. Suspensi ekstrak dan fraksi yang diberikan hewan uji selalu baru setiap harinya selama perlakuan.

11. Pembuatan larutan streptozotosin dan nikotinamid

Larutan streptozotosin digunakan untuk induksi diabetes terhadap tikus putih jantan galur Wistar yang telah dipuasakan semalam. streptozotosin dilarutkan dalam larutan bufer sitrat dan diberikan intraperitoneal pada dosis 65 mg/Kg bb untuk merusak sel β pankreas. Larutan nikotinamid digunakan sebagai agen antioksidan terhadap streptozotosin. Nikotinamid dilarutkan dalam bafer sitrat dengan dosis 230 mg/ kg bb diinjeksikan peritonal 15 menit sebelum injeksi streptozotosin. Larutan streptozotosin dan nikotinamid dibuat pada hari ke-1 saat penelitian akan dimulai (Asghar dan Sajad, 2014).

12. Persiapan dan perlakuan hewan percobaan

Persiapan dan perlakuan dilakukan di PAU (Pusat Antar Universitas) Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM. 42 ekor tikus putih jantan galur Wistar umur 8 minggu dengan berat badan antara 150-250 gram, dipelihara dalam kondisi kandang yang terjaga dan diberi pakan dan air secukupnya. Secara acak tikus dikelompokkan menjadi 7 kelompok (I-VII). Setiap kelompok terdiri dari 6 ekor tikus dan akan mendapat perlakuan yang berbeda selama 18 hari.

Hari ke-1 dihitung setelah adaptasi tikus-tikus uji. Hari ke-1 darah tikus akan diambil, dilanjutkan pengukuran kadar gula darah (T1). Hari ke-1 Semua tikus kelompok perlakuan akan diinduksikan streptozotosin 65 mg/kg bb tikus secara intraperitoneal dan nikotinamid 230 mg/kg bb tikus secara intraperitoneal 15 menit sebelum streptozotosin. Setelah induksi streptozotosin dan nikotinamid tikus akan dibiarkan tanpa perlakuan selama 2 hari. Hari ke-4 darah tikus akan diambil dan kadar gula darah (T2) akan diukur. Di hari yang sama perlakuan ekstrak akan dimulai. Hari ke-11 darah tikus akan diambil lagi dilanjutkan pengukuran kadar gula darah (T3). Hari ke 18 darah tikus akan diambil dan dilanjutkan pengukuran kadar gula darah (T4). Di hari yang sama organ pankreas dan hati akan diangkat dimana organ pankreas dijadikan preparat histologi untuk melihat regenerasi sel β pankreas dan organ hati akan diolah untuk menghitung tingkat aktivitas enzim SOD, GPx dan penurunan kadar MDA.

Kelompok I adalah kelompok kontrol normal tikus tanpa perlakuan. Kelompok II adalah kontrol negatif dimana tikus hanya diinduksi streptozotosin-nikotinamid. Kelompok III adalah kontrol positif dimana tikus diinduksi DM dan diberi glibenklamid dengan dosis 0,45 mg/kg bb tikus. Kelompok IV adalah kelompok tikus DM yang diberi suspensi ekstrak etanol daun kersen 250 mg/kg bb. Kelompok V adalah kelompok tikus DM yang diberi suspensi ekstrak etanol daun kersen 350 mg/kg bb. Kelompok VI adalah kelompok tikus DM diberi suspensi fraksi etil asetat daun kersen 250 mg/kg bb. Kelompok VII adalah kelompok tikus DM diberi suspensi fraksi etil asetat daun kersen 350 mg/kg bb.

13. Pengukuran kadar glukosa darah hewan percobaan

Pengukuran kadar glukosa darah hewan percobaan dilakukan tenaga laboratorium di PAU (Pusat Antar Universitas) Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM. Kadar glukosa darah akan diukur secara enzimatik dengan pereaksi GOD-PAP. Kadar glukosa darah ditetapkan secara enzimatik dengan pereaksi GOD PAP dan absorbansi dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 500 nm. Tikus dipuaskan terlebih dahulu selama 18 sampai 20 jam dengan tetap diberi minum secukupnya sebelum pengambilan darah. Volume darah diambil dari pembuluh sinus orbitalis $\pm 0,5$ mL menggunakan pipa kapiler kemudian ditampung dalam tabung plastik eppendorf dan dibiarkan membeku agar serum memisah dengan darah. Agar serum memisah dengan sempurna, darah yang ditampung dalam tabung plastik eppendorf disentrifugasi selama 15 sampai 20 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Serum yang telah memisah disimpan dalam almari pendingin pada suhu 2-8°C agar tidak rusak. Setelah itu kadar gula diukur dengan cara 10 μ L serum ditambah campuran reagen GOD PAP sebanyak 1000 μ l kemudian divortek 1 menit agar campur sempurna, setelah dibiarkan selama 20 menit pada suhu kamar 20-25°C absorbansi dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 500 nm dan dihitung kadar glukosa darah (mg/dl).

14. Preparasi jaringan dan pembuatan homogenat jaringan

Preparasi jaringan dan supernatan dilakukan tenaga laboratorium di PAU (Pusat Antar Universitas) Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM. Pada hari ke-18 organ hati tikus diangkat, dibersihkan menggunakan dapar fosfat dan dikeringkan. Pembuatan homogenat dari jaringan dilakukan dengan menimbang 1

gram sampel jaringan yang dipotong dari organ hati. sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 5 mL dapar fosfat dingin. sampel dihomogenkan dalam dapar fosfat 50 mM (pH 7,4) yang mengandung inhibitor protease, 0,2 mM PMSF dan 1 mM EDTA, pada suhu 4° C selama 30 detik (2-15 detik dengan 15 detik interval pendinginan). Homogenat disaring dan filtrat disentrifugasi pada 1088 x gravitasi (pada r_{max} 108 mm) selama 5 menit dalam kondisi dingin. Supernatan yang dihasilkan digunakan untuk pengukuran aktivitas enzim antioksidan.

15. Pengujian aktivitas SOD

Pengujian aktivitas SOD dilakukan tenaga laboratorium di PAU (Pusat Antar Universitas) Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM. Metode pengukuran SOD digunakan untuk mengukur kapasitas menangkap radikal anion superoksida. Metode analisis aktivitas SOD ini dilakukan mengikuti prosedur *BIOVISION SOD Assay Kit*.

Penentuan aktivitas SOD dilakukan dengan membuat 4 macam campuran yaitu sampel, blank1, blank 2 dan blank 3. Campuran sampel berisi 20 μ L homogenat hati dan 200 μ L larutan WST; blank 1 berisi 20 μ L air suling dan larutan enzim; blank 2 berisi 20 μ L homogenat 20 μ L homogenat hati, 200 μ L larutan WST dan 20 μ L buffer fosfat; blank 3 berisi 20 μ L air suling, 200 μ L larutan WST dan 20 μ L buffer fosfat. Semua campuran ditambahkan buffer fosfat hingga 3 mL. campuran sampel dan blank 1 secara bersamaan ditambahkan dengan 20 μ L reagen enzim. Semua campuran diinkubasi pada suhu 37° celcius selama 20 menit.

pembacaan absorbansi tiap campuran dilakukan pada panjang gelombang 450 nm.

Aktivitas SOD (%) dihitung dengan menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Aktivitas SOD (\%)} = \frac{(A \text{ blank 1} - A \text{ blank 3}) - (A \text{ Sampel} - A \text{ blank 2})}{(A \text{ blank 1} - A \text{ blank 3})} \times 100 \%$$

16. Pengujian aktivitas GPx

Pengujian aktivitas GPx dilakukan tenaga laboratorium di PAU (Pusat Antar Universitas) Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM. Prosedur pengujian GPx dilakukan dengan metode Wood (1970) yang dipaparkan oleh Alam *et al.* (2012): sebanyak 200 µl supernatan jernih hati ditambahkan 200 µl buffer fosfat 0,1 M pH 7,0 yang mengandung 0,1 mM EDTA, 200 µl glutation tereduksi (GSH), 10 mM dan 200 µl enzim glutation reduktase (2,4 unit), kemudian campuran diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C, ditambahkan 200 µl NADPH 1,5 mM dan diinkubasi lagi selama tiga menit pada suhu yang sama, dan dilanjutkan dengan penambahan 200 µl H₂O₂ 1,5 mM. Absorbansi diukur diantara waktu satu sampai dua menit dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm. Penentuan aktivitas GPx dilakukan dengan rumus berikut:

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

Abs	= perubahan absorbansi
Vt	= volume total (ml)
6,22	= koefisien ekstrinsik dari NADPH
2	= 2 mol GSH yang setara dengan 1 mol NADPH .
1000	= perubahan menjadi mili unit
Vs	= volume sampel

17. Pengukuran kadar MDA

Pengujian penurunan kadar MDA dilakukan tenaga Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM. Kadar MDA dianalisis menggunakan metode menurut Hermann dan Kevin (1990). Organ hati segar dicacah dalam kondisi dingin dalam 2,5 mL larutan PBS yang mengandung 11,5 g/L KCl. Homogenat disentrifugasi pada 4.000 rpm selama 10 menit. Sampel sebanyak 0,5 mL ditambah dengan 2 mL campuran HCl 0,25 N dingin yang mengandung 15% *trichloro acetic acid* (TCA), 0,38% *thio barbituric acid* (TBA) dan 0,5% *butylated hydroxytoluene* (BHT). Campuran larutan ini dipanaskan 80° C selama 1 jam kemudian didinginkan. campuran larutan dan standar disentrifugasi 3.500 rpm selama 10 menit. Absorbansi supernatan diukur pada λ 532 nm. TEP (1,1,3,3-tetraetoksipropana) digunakan sebagai larutan standar. Kadar MDA ditentukan menggunakan persamaan regresi linier kurva larutan standar TEP dengan pembuatan larutan standar sama seperti sampel.

18. Pembuatan dan pengamatan preparat histopatologi pankreas tikus

Pembuatan preparat histologi pankreas dilakukan oleh tenaga laboratorium histologi di laboratorium histologi fakultas kedokteran Universitas Sebelas Maret. Pembuatan preparat histopatologi terdiri dari tahap-tahap pengerjaan yang memiliki fungsi tersendiri. Tahap pembuatan preparat ditunjukkan pada gambar 6.

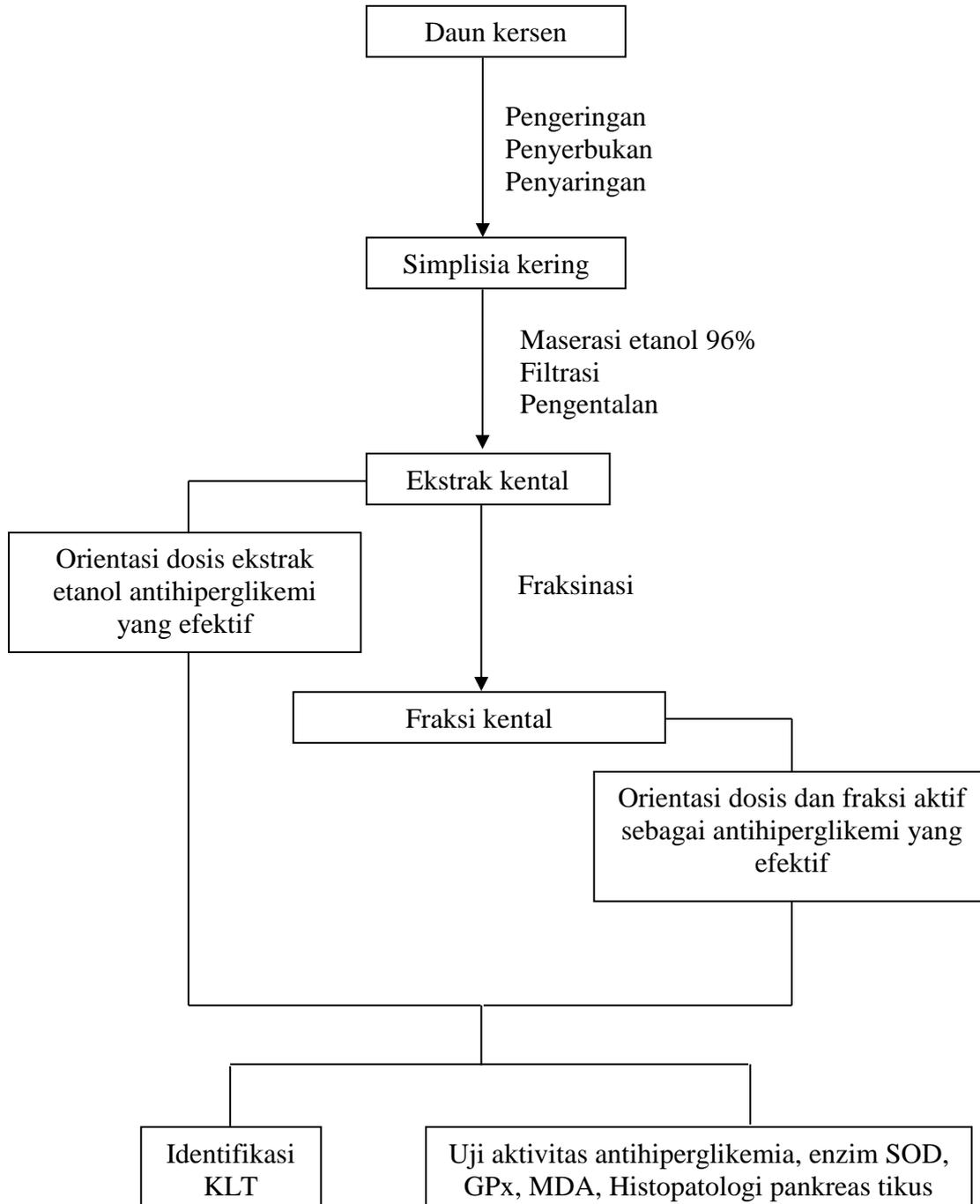
Pengamatan preparat histologi pankreas dilakukan peneliti di laboratorium anatomi dan fisiologi manusia Universitas Setia Budi. Alat yang digunakan adalah mikroskop LEICA yang memiliki kamera untuk menangkap gambar islet langerhans pankreas. Pengamatan gambar dilakukan dengan menyambungkan

mikroskop LEICA dengan media komputer yang sudah memiliki perangkat lunak mikroskop LEICA. Perangkat lunak memiliki fungsi sebagai penampil gambar sesuai dengan perbesaran lensa, menangkap gambar, pengaturan hasil gambar dan pengukuran objek gambar. Perbesaran lensa yang digunakan pertama kali adalah 4x untuk mencari irisan yang memiliki islet-islet langerhan pada preparat. Posisi preparat pada mikroskop yang ditemukan kemudian difoto lalu diatur ulang menggunakan perangkat lunak agar gambar terlihat seperti penglihatan langsung. Gambar yang sudah tersimpan diatur terutama tingkat pencahayaan gambar, kontras, ketajaman dan warnanya karena ada beberapa perbedaan tampilan antara hasil perangkat lunak dan tampilan langsung. Islet yang ditemukan diperbesar 1000x untuk melihat keadaan jaringan islet langerhans. Gambar perbesaran islet diambil dan diatur ulang agar gambar sama seperti penglihatan langsung. Gambar islet yang sudah jadi diberikan keterangan tentang keadaan islet seperti inti sel, kepadatan susunan sel, jumlah sel β dan bentuk islet. Preparat diamati dan dibandingkan keadaan histopatologisnya terhadap kelompok I dan kelompok II.

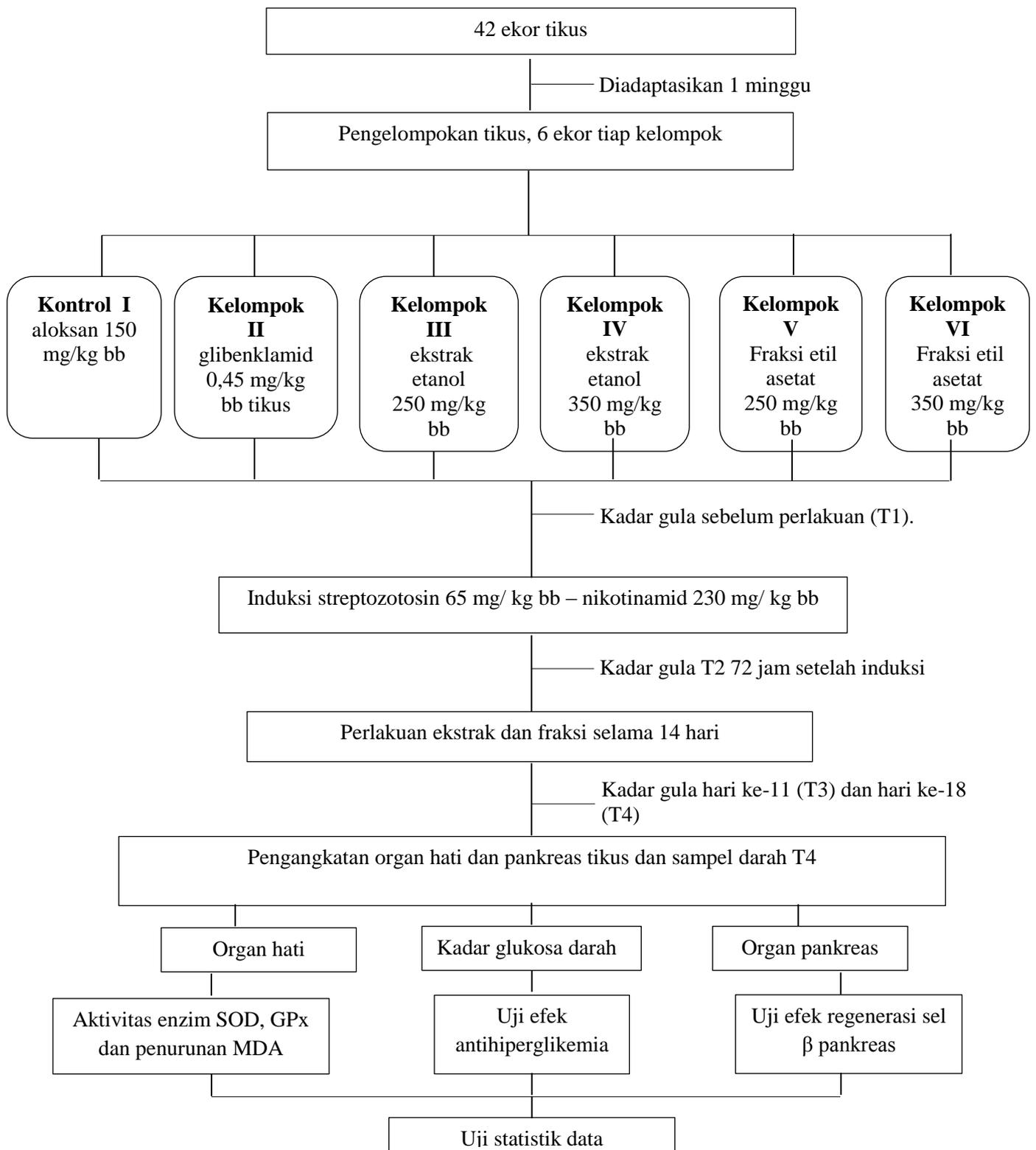
H. Analisis hasil

Data kuantitatif hasil penelitian dinyatakan sebagai rata-rata (mean) (\pm) standar deviasi (SD). Signifikansi statistik dihitung dengan menggunakan analisis *Anova one way* dilanjutkan dengan uji lanjut. Data kualitatif diperoleh dari hasil gambar histopatologi jaringan pankreas dengan pewarnaan hematoxaline dan eosine dapat dilihat masa sel islet langerhans pankreas. Nilai-nilai yang dianggap signifikan secara statistik ketika signifikansi nilainya kurang dari 0,05 ($p < 0,05$).

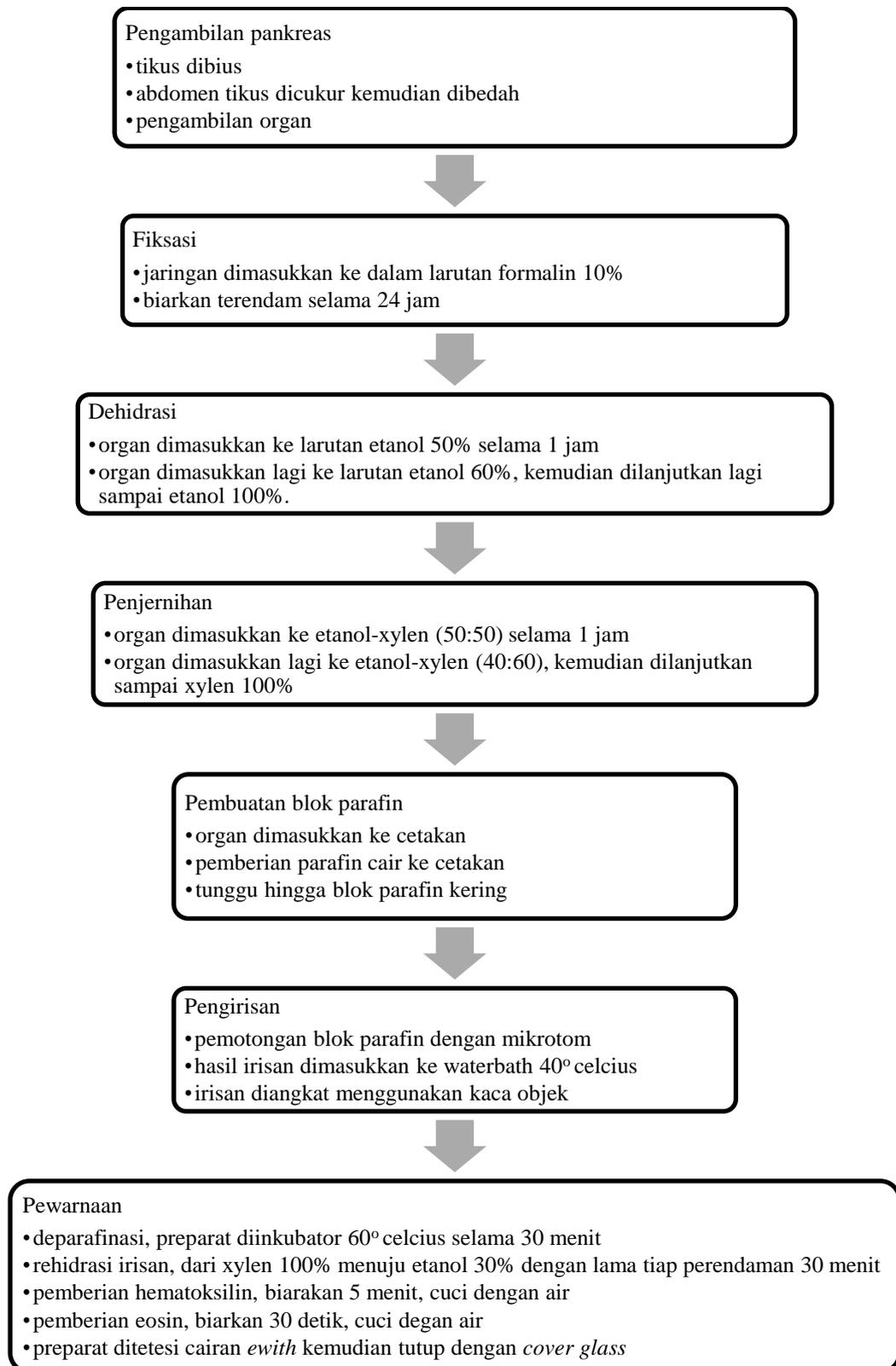
Alur Jalannya Penelitian



Gambar 6. Alur pembuatan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kersen



Gambar 7. Alur penelitian terhadap tikus uji



Gambar 8. Pembuatan preparat histologi pankreas

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Identifikasi tanaman kersen

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tanaman kersen yang telah diidentifikasi di unit Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Identifikasi bertujuan untuk mencocokkan ciri morfologis antara simplisia tanaman yang diteliti dan mengetahui kebenaran tanaman yang digunakan. Berdasarkan hasil identifikasi dapat dipastikan bahwa simplisia tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kersen (*Muntingia calabura*). Hasil identifikasi dapat dilihat pada Lampiran 1.

2. Pengumpulan bahan dan pembuatan serbuk simplisia daun kersen

Daun kersen yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari desa Gebang kelurahan Kadipiro kecamatan Banjarsari kota Surakarta, Jawa Tengah. Daun kersen yang terkumpul dari tempat pengambilan bahan diperoleh sebanyak 7,5 kg. Daun kersen yang sudah dikeringkan dengan oven kemudian diserbuk diperoleh sebanyak 2 kg.

3. Hasil penentuan susut pengeringan serbuk daun kersen

Hasil rata-rata bobot susut pengeringan sampel serbuk daun kersen pada penelitian ini adalah 8,5% (Tabel.2), dan memenuhi persyaratan kadar air simplisia menurut Depkes RI (1985) kurang dari 10%. Kandungan air yang tinggi dapat

menjadi media pertumbuhan jamur, kapang dan mikroorganisme lain yang dapat merusak simplisia.

Tabel 1. Hasil penentuan susut pengeringan serbuk daun kersen

Berat awal (gram)	Berat akhir (gram)	Susut pengeringan (%)
2,0	1,834	8,3
2,0	1,824	8,8
2,0	1,83	8,5
Rata-rata		8,5 ± 0,25

4. Hasil pembuatan ekstrak etanol daun kersen

Pembuatan ekstrak etanol serbuk daun kersen dilakukan dengan maserasi 500 gram simplisia kering menggunakan 3,25 L etanol 96% selama 5 hari. Hasil ekstraksi kemudian dipekatkan dengan *vacum evaporator* pada suhu 40 °C dan dihitung randemen sampel terhadap ekstrak etanol daun kersen. Persen rata-rata rendemen ekstrak etanol daun kersen adalah 18 % seperti ditunjukkan pada tabel 2. Hasil perhitungan randemen ekstrak etanol daun kersen dapat dilihat pada lampiran 3.

Tabel 2. Randemen ekstrak etanol daun kersen

Berat Serbuk (gram)	Berat Ekstrak (gram)	Randemen (%)
500	92	18,4
500	89,5	17,9
500	91	18,2
Rata-rata		18 ± 0,25

5. Hasil fraksinasi ekstrak etanol daun kersen

Fraksinasi ekstrak etanol daun kersen menggunakan pelarut heksane, etil asetat dan air. Fraksinasi dilakukan menggunakan corong pisah dan pergantian pelarut dilakukan apabila warna pelarut sudah tidak keruh. Dari tabel berat hasil fraksinasi dapat dilihat bahwa fraksi heksan memiliki berat yang paling besar (37%) diikuti fraksi air (33%) dan etil asetat (30,4%).

Tabel 3. Randemen fraksi daun kersen

Berat ekstrak etanol (mg)	Berat fraksi etil asetat (mg)	Berat fraksi heksane (mg)	Berat fraksi air (mg)
10	3	3,7	3,3
10	3,1	3,7	3,2
10	3	3,6	3,4
Rata-rata	3,04	3,7	3,3

6. Hasil identifikasi senyawa flavonoid fraksi-fraksi etanol daun kersen dengan KLT

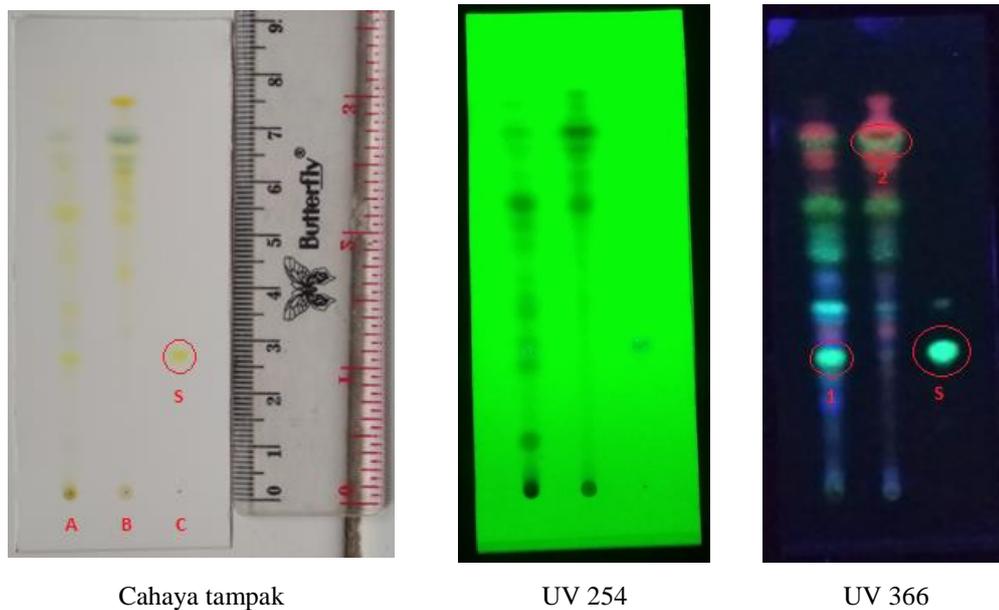
Identifikasi kandungan kimia fraksi air, etil asetat dan heksan daun kersen dilakukan secara kualitatif dengan kromatografi lapis tipis. Identifikasi flavonoid menggunakan quersetin sebagai pembanding pada fraksi etil asetat dan rutin digunakan sebagai pembanding pada fraksi air. Hasil kromatogram bisa dilihat pada gambar 9.

Pemaparan pelat setelah penyemprotan sitroborat memperlihatkan perubahan berkas alur dan bercak-bercak tiap totolan. Bercak pembanding (S) dengan $R_f = 0,3$ terlihat jelas dan berwarna kuning kecoklatan pada pemaparan cahaya tampak, demikian juga pada berkas alur etil asetat dan heksan dengan warna alur berkas kuning kecoklatan. Pemaparan cahaya UV 254 nm terhadap pelat memberikan perubahan jelas pada ketiga berkas alur bahwa pembanding quersetin memudar bercaknya demikian pula pada berkas alur etil asetat dimana bercak noda yang sejajar dengan pembanding memudar walaupun pada berkas alur heksan tampak seperti tidak ada perubahan. Pemaparan cahaya UV 366 nm memperlihatkan ada bercak muncul pada alur etil asetat (1, $R_f = 0,28$) dan pada alur heksan (2, $R_f = 0,73$) yang berfloresensi berwarna hijau sama seperti pembanding

quersetin. Kemunculan bercak setelah penyemprotan sitroborat bersinar hijau kekuningan menandakan bahwa fraksi-fraksi tersebut mengandung flavonoid.

Daun kersen diketahui mengandung senyawa-senyawa flavonoid seperti quersetin, kirsin, quersitrin dan kaempferol (Zakaria, 2016). Reagen sitroborat membuat standar quersetin menjadi kompleks yang memberikan bercak berfloresensi kuning-hijau pada cahaya UV 366 nm karena quersetin termasuk golongan flavonol. Warna floresensi yang diberikan flavonoid tergantung dari golongannya (LeRoy & Amber, 1943). Informasi tersebut mendukung hasil kromatografi fraksi etil asetat dan heksan daun kersen dimana setelah penyemprotan reagen sitroborat keduanya memberikan bercak yang berfloresensi pada cahaya UV 366 nm.

Gambar 10 menunjukkan berkas alur fraksi air (A dengan bercak noda $R_f=0,8$) dan berkas alur pembanding rutin (B dengan bercak noda $R_f=0,4$) menunjukkan bercak noda (dilingkari) pada pemaparan sinar tampak (gambar kiri), sinar UV 254 nm (gambar tengah) dan UV 366 nm (gambar kanan). Pemaparan cahaya UV 366 nm dan setelah penyemprotan sitroborat terhadap pelat memperlihatkan bercak berwarna kuning pada berkas alur pembanding yaitu rutin dan pada berkas alur fraksi air. Hasil pemisahan ini menunjukkan bahwa fraksi air mengandung flavonoid.



Cahaya tampak

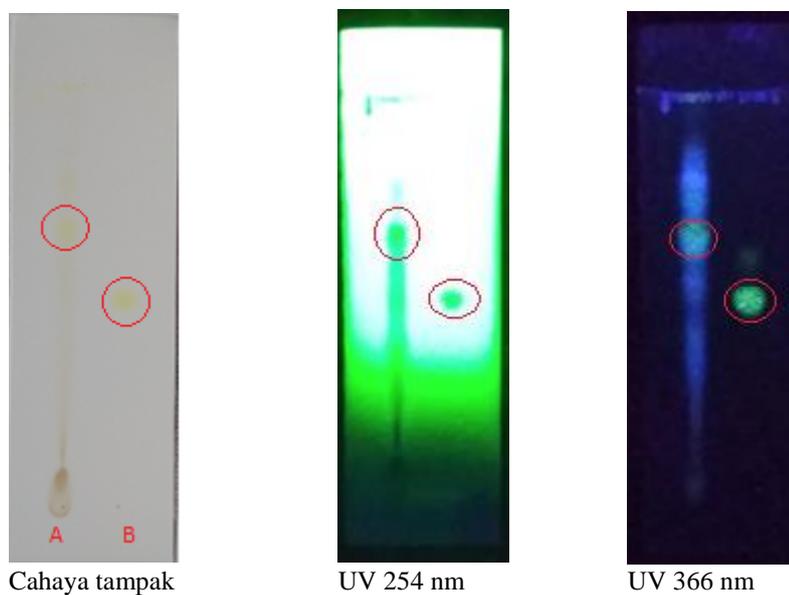
UV 254

UV 366

Setelah penyemprotan sitroborat

A: Fraksi etil asetat; B: fraksi heksan; C: standar quersetin; S: bercak quersetin ($R_f = 0,3$);
 1: bercak flavonoid frak. Etil asetat ($R_f = 0,28$) 2: bercak flavonoid frak. Heksan ($R_f = 0,73$)

Gambar 9. Kromatogram identifikasi flavonoid fraksi etil asetat dan fraksi heksan.



Cahaya tampak

UV 254 nm

UV 366 nm

Kromatogram fraksi air setelah penyemprotan sitroborat

A: fraksi air ($R_f = 0,8$); B: standar rutin ($R_f = 0,4$)

Gambar 10. Kromatogram identifikasi flavonoid fraksi air.

7. Hasil Pengukuran Berat Badan Tikus

Pengukuran berat badan tikus dilakukan untuk mengetahui adanya perubahan yang dipengaruhi karena perlakuan ekstrak uji dan ketepatan

penggunaan dosis ekstrak sebagai sediaan uji (lampiran 4 dan 5). Hasil data rata-rata berat badan tikus dan perhitungan persen kenaikan berat badan ada pada lampiran 6. Gambar 11 merupakan plot kurva dari data rata-rata berat badan \pm SD dari data tabel pada lampiran 6.

Gambar 11 menunjukkan pada hari ke-0 sampai hari ke-1 terjadi kenaikan berat badan karena semua tikus diadaptasikan sebelum penelitian dimulai dan belum diberi perlakuan apapun serta makanan dan minuman tercukupi. Berat badan hewan uji mengalami kenaikan karena kondisi hewan uji yang sehat dengan asupan makanan tercukupi dan penyerapan glukosa dan nutrisi lainnya masih baik.

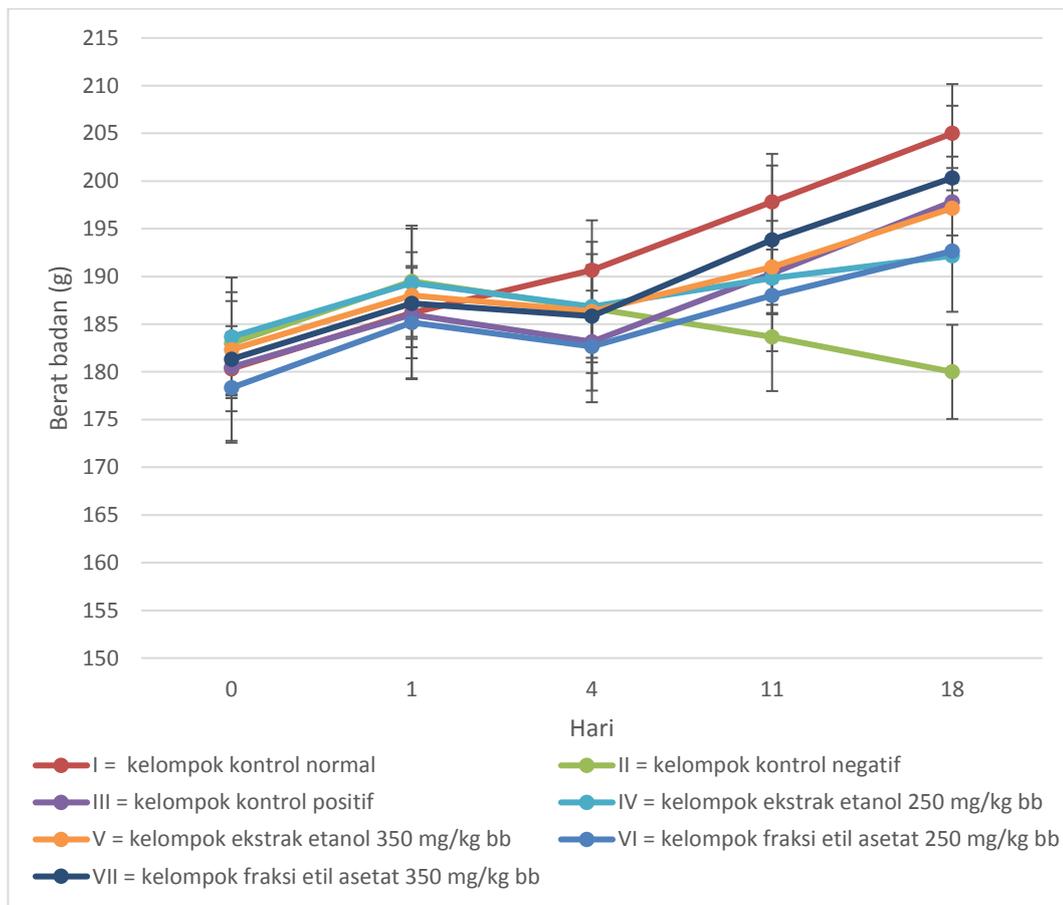
Gambar 11 menunjukkan terjadinya penurunan berat badan terjadi pada hari ke-4 karena semua tikus uji (kecuali kelompok I) diinduksi DM dengan streptozotosin-nikotinamid. Hasil signifikansi uji statistik data berat badan tikus pada hari ke-4 atau T2 adalah $p = 0,5$ ($p > 0,05$) menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan berat badan tikus antara semua kelompok.

Hari ke-11 (T3) terjadi kenaikan berat badan pada semua kelompok uji (kecuali kelompok II) ditunjukkan pada gambar 11. Hasil uji statistik *Anova one way* data berat badan pada T3 adalah $0,035$ ($p < 0,05$) menunjukkan ada perbedaan signifikan antar semua kelompok. Hasil uji lanjut data berat badan pada T3 menunjukkan perbedaan signifikan hanya pada kelompok kontrol normal dan kontrol negatif.

Hari ke-18 atau T3 yaitu 2 minggu setelah perlakuan menunjukkan kenaikan berat badan pada semua kelompok uji (kecuali kelompok II). Hasil statistik *Anova one way* memberikan nilai probabilitas $0,000$ menandakan bahwa ada beda

signifikan antara kelompok uji ($p < 0,05$). Hasil analisis uji lanjut menunjukkan kelompok II berbeda signifikan terhadap semua kelompok, kecuali terhadap kelompok IV. Data pada tabel di lampiran 6 menunjukkan kelompok II terjadi penurunan berat badan sebesar 3,5 % selama periode penelitian. Hasil perhitungan data kelompok II ini menandakan induksi DM oleh streptozosotin-nikotinamid menyebabkan penurunan terhadap berat badan hewan uji. Defisiensi insulin menyebabkan transport glukosa ke dalam sel jaringan periferal berkurang. Glukosa yang berkurang dalam sel menyebabkan sel memetabolisme cadangan glikogen melalui glikolisis dan peningkatan katabolisme protein dimana asam amino yang dihasilkan digunakan untuk glukoneogenesis dalam hati sehingga terjadi penurunan berat badan (Peter & Morris, 2008).

Data pada tabel lampiran 6 dan gambar 11 juga menunjukkan kenaikan berat badan pada tikus kelompok III sebesar 8 % selama 2 minggu perlakuan. Kenaikan berat badan ini secara statistik berbeda signifikan terhadap kelompok II. Kenaikan berat badan ini terjadi sebagai akibat pemberian glibenklamid pada hewan uji. Glibenklamid meningkatkan jumlah insulin yang dilepaskan oleh sel β pankreas. Insulin yang dilepaskan akan meningkatkan transport glukosa ke dalam sel sampai ke jaringan periferal dan mengarah pada pemanfaatan nutrisi penting lainnya, penyerapan asam amino dan komponen makromolekul lainnya (Vicky dan Sangeeta, 2010).



Gambar 11. Rata-rata berat badan sebelum perlakuan sampai hari ke-18 perlakuan.

Gambar 11 menunjukkan berat badan tikus pada kelompok ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kersen dengan 2 variasi dosis juga mengalami peningkatan. Hasil analisa statistik menunjukkan kelompok V-VII berbeda signifikan pada kelompok II, kecuali kelompok IV. Peningkatan berat badan tikus kelompok IV memiliki kekuatan paling rendah karena dosisnya yang rendah. Kelompok VI memberikan kenaikan terkuat ke-2 karena dosis fraksi yang rendah. Kenaikan berat badan pada kelompok V adalah terkuat ke-3 karena dosis ekstrak yang lebih besar. Kelompok VII memberikan kenaikan berat badan paling tinggi karena dosis fraksi yang tinggi. Kenaikan berat badan terjadi akibat pemberian ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kersen yang mengandung flavonoid.

flavonoid yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi daun kersen adalah quersetin, kaempferol, kirsin dan quersitrin. Senyawa flavonoid memiliki aktivitas meningkatkan kadar insulin dalam plasma dan memperbaiki sel β pankreas sehingga dengan meningkatnya kadar insulin. Kadar insulin yang meningkat membuat glukosa dalam darah bisa dimasukkan ke dalam jaringan melalui jalur serapan gula. Glukosa yang masuk ke dalam sel akan dimetabolisme dengan optimal menjadi energi sehingga berat badan stabil dan glukosa berlebih yang masuk ke jaringan akan disimpan menjadi cadangan makanan dalam bentuk glikogen dan sel akan berhenti mengurai protein atau lemak sebagai sumber energi (Monserrat *et al.*, 2008; Peter & Morris, 2008).

8. Hasil penentuan rata-rata kadar glukosa darah tikus

Kemampuan ekstrak dan fraksi daun kersen dalam menurunkan kadar glukosa darah dapat dilihat pada penurunan kadar glukosa darah tikus terinduksi DM. Senyawa kimia yang digunakan untuk terjadinya DM adalah streptozotosin. Gambar 9 merupakan plot data rata-rata \pm SD kadar glukosa darah dan perhitungan penurunan kadar glukosa darah dipaparkan dalam lampiran 9.

Data pada T1 (tabel pada lampiran 9) adalah kadar glukosa awal digunakan sebagai pembanding untuk melihat berhasil tidaknya induksi DM pada tikus dimana darah diambil pada hari pertama penelitian. Data T1 menunjukkan kadar glukosa darah puasa semua tikus uji normal berkisar 50-109 mg/dL karena perlakuan belum dimulai.

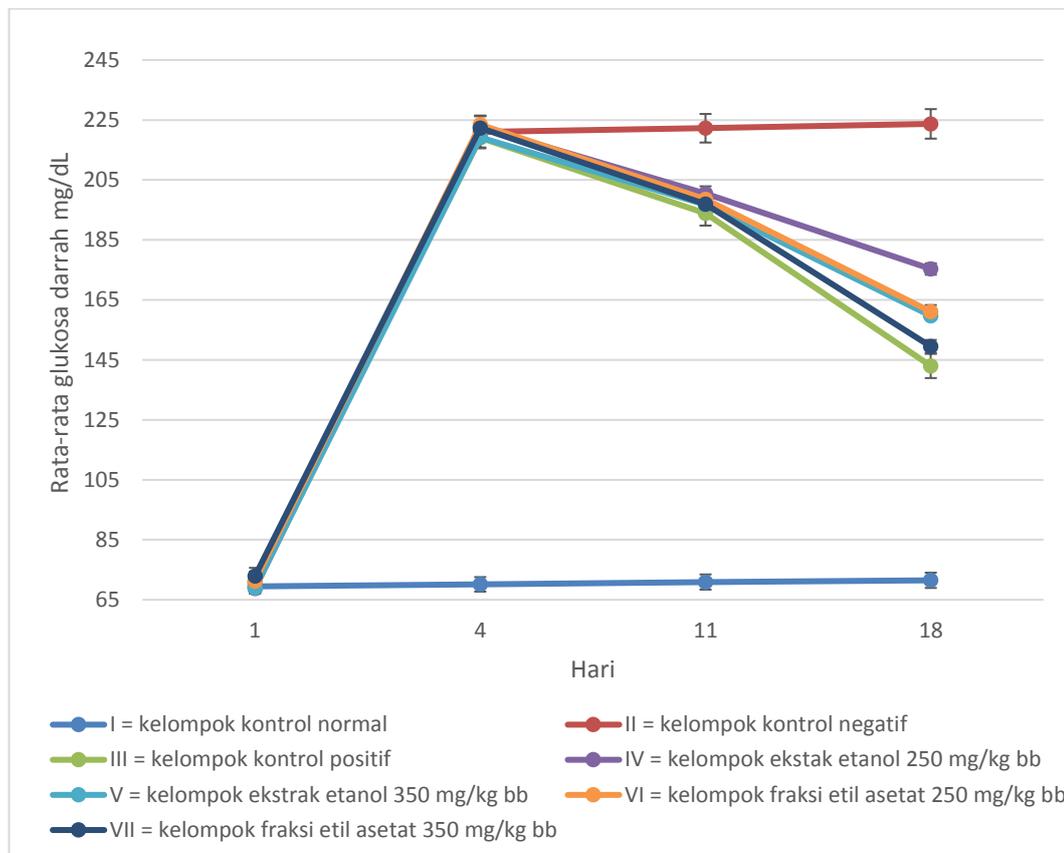
Gambar 12 menunjukkan terjadinya kenaikan kadar glukosa darah pada T2 pada kelompok II-VII. Kadar glukosa darah puasa tikus pada T2 yang lebih dari

200 mg/dL diindikasikan sebagai keadaan hiperglikemi. Menurut Asghar dan Sajad (2014), induksi DM menggunakan streptozotosin dan nikotinamid pada tikus Wistar jantan, dapat terjadi 2 hari setelah Injeksi secara intraperitoneal dengan dosis streptozotosin 65 mg/kg bb dan injeksi intraperitoneal nikotinamid 230 mg/kg bb 15 menit sebelum streptozotosin. Hasil rata-rata kadar glukosa darah tikus kelompok I masih normal sesuai dengan kadar normal glukosa darah tikus puasa wistar berkisar antara 50-109 mg/dL (Wulandari, 2010).

Gambar 12 menunjukkan keadaan kadar glukosa darah hari ke-11 (T3) sampai hari ke-18 (T4) kelompok kontrol negatif memiliki kadar glukosa darah yang tetap tinggi. Hal tersebut menandakan bahwa induksi streptozotosin sebagai agen diabetogenik stabil membuat kondisi tikus DM.

Gambar 12 menunjukkan adanya penurunan kadar glukosa darah kelompok III pada hari ke-11 (T3). Hasil analisa statistik data kadar glukosa darah tikus kelompok III (lampiran 9) memberikan berbeda signifikan terhadap kelompok II. Beda signifikan terhadap kelompok II menandakan bahwa kelompok III mengalami penurunan kadar glukosa darah yang signifikan selama 1 minggu pemberian glibenklamid 0,45 mg/kg bb.

Kelompok IV pada hari ke-11 (T3) menurunkan glukosa darah sebesar 14,4 % dan hasil uji statistik menunjukkan bahwa kadar glukosa darah kelompok IV ($200,42 \pm 2,4$ mg/dL) belum memberikan beda signifikan terhadap kelompok II sehingga mengindikasikan bahwa perlakuan ekstrak etanol 250 mg/kg bb belum bisa menurunkan kadar glukosa darah dalam 1 minggu perlakuan.



Gambar 12. Pengaruh pemberian perlakuan terhadap kadar glukosa darah hewan uji terhadap lama pemberian.

Kelompok V, VI dan VII pada hari ke-11 menurunkan glukosa darah berturut-turut sebesar 14,96 %, 16,33 % dan 16,98 % dan hasil uji statistik menunjukkan bahwa nilai-nilai kadar glukosa memberikan perbedaan yang signifikan terhadap II. Hal tersebut mengindikasikan pemberian perlakuan pada tiap kelompok dapat menurunkan glukosa darah secara signifikan dalam 1 minggu pemberian perlakuan.

Hari ke-18 (T4) pada gambar 12, kelompok I memiliki kadar glukosa darah yang tetap normal ($71,49 \pm 2,3$ mg/dL). Kelompok III pada menurunkan kadar glukosa darah sebesar 51,45 % dengan kadar glukosa darah $142,97 \pm 4$ mg/dL. Nilai kadar glukosa darah tersebut memberikan hasil berbeda signifikan terhadap

kelompok II secara statistik sehingga mengindikasikan pemberian glibenklamid selama 2 minggu dapat menurunkan kadar glukosa darah secara signifikan.

Kelompok IV-VII menunjukkan aktivitas penurunan kadar glukosa darah pada hari ke-18 (T4) yang ditunjukkan pada gambar 12. Kelompok IV-VII menurunkan glukosa berturut-turut sebesar 30,73 %, 39,64 %, 40,94 %, 48,75 %. Hasil uji statistik memberikan informasi bahwa nilai kadar glukosa darah T4 kelompok IV-VII berbeda signifikan terhadap kelompok II. Hal tersebut mengindikasikan bahwa perlakuan kelompok Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kersen selama 2 minggu dapat menurunkan kadar glukosa darah pada tikus DM secara signifikan. Hasil statistik menunjukkan tidak ada beda nyata antara kelompok V dan VI menandakan kedua perlakuan tersebut memiliki aktivitas yang sama. Hasil statistik kadar glukosa darah T4 juga menunjukkan Kelompok VII memberikan beda yang tidak signifikan terhadap kelompok III. Hal tersebut memberi arti bahwa aktivitas penurunan kadar glukosa darah kelompok fraksi etil asetat dosis 350 mg/kg bb sebanding dengan kelompok III yang menggunakan glibenklamid 0,45 mg/kg bb tikus.

Aktivitas penurunan glukosa darah dari ekstrak etanol dan fraksi etil asetat tersebut dipengaruhi senyawa yang terkandung dan besar dosis yang diberikan terhadap tikus uji. Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat diketahui mengandung senyawa-senyawa flavonoid seperti quercetin, rutin, kirsin, quersitrin dan kaempferol. Senyawa flavonoid tersebut memiliki aktivitas antihiperqlikemia (Shasank & Abhay, 2013). Fraksi etil asetat mengandung senyawa-senyawa flavonoid tersebut lebih banyak dan terkonsentrat dalam dosis uji dibandingkan

dosis uji ekstrak etanol yang masih mengandung banyak senyawa (Zakaria *et al.*, 2016). Senyawa-senyawa flavonoid tersebut memberikan aktivitas penurun glukosa darah melalui meningkatkan penyerapan glukosa ke jaringan dengan meningkatkan ekspresi GLUT-4 di otot rangka, menurunkan penyerapan glukosa darah di usus dengan menghambat GLUT-2 di usus, menghambat jalur-jalur apoptosis sel β pankreas, menurunkan stres oksidatif, meningkatkan produksi insulin, meningkatkan aktivitas enzim antioksidan dan merangsang proliferasi sel β (Ramachandran & Baojun, 2015).

9. Hasil penentuan nilai AUC dari rata-rata kadar glukosa darah

Nilai *Area under curve* (AUC) gambar 12 ditunjukkan pada tabel 4 dengan penentuan nilai menggunakan metode trapezoidal (lampiran 10). Nilai AUC total yang diperoleh dianalisis dengan *Anova one way* dan dilanjutkan dengan uji lanjut. Tabel 4 menunjukkan bahwa nilai AUC kelompok I adalah nilai normal dan memiliki nilai yang rendah. Nilai AUC total kadar glukosa darah memperlihatkan hubungan yang berbanding terbalik, artinya semakin kecil nilai AUC total maka efektifitas antihiperglikemi semakin besar.

Tabel 4 menunjukkan nilai AUC total pada kelompok II-VII yang lebih tinggi dibandingkan kelompok normal. Nilai AUC total kelompok II menunjukkan nilai yang paling besar ($3549,57 \pm 76,14$ mg hari/dL) karena berdasarkan gambar 12 kurva kelompok II berbentuk trapesium siku-siku dimana pada hari ke-11 dan hari ke-18 tidak ada penurunan kadar glukosa darah.

Tabel 4. Luas AUC rata-rata kadar glukosa darah tikus

Kel	AUC _(T1-T2) (mg h/dL)	AUC _(T2-T3) (mg h/dL)	AUC _(T3-T4) (mg h/dL)	AUC _{(Total) ±SD} (mg h/dL)
I	209,41	493,72	498,43	1201,57± 38,41*
II	437,30	1551,49	1560,78	3549,57 ± 76,14
III	435,33	1445,05	1178,78	3059 ± 54,61*
IV	436,93	1480,52	1315,02	3232,5 ± 39,96*
V	432,24	1455,57	1247,19	3135,01 ± 37,27*
VI	441,99	1476,94	1258,85	3177,79 ± 32,21*
VII	442,81	1467,45	1212,42	3122,69 ± 26,94*

Keterangan :

I = kelompok normal

II = kelompok kontrol negatif

III = kelompok kontrol positif glibenklamid 0,45 mg/kg bb tikus

IV = kelompok ekstrak etanol daun kersen dosis 250 mg/kg bb

V = kelompok ekstrak etanol daun kersen dosis 350 mg/kg bb

VI = kelompok fraksi etil asetat daun kersen dosis 250 mg/kg bb

VII = kelompok fraksi etil asetat daun kersen dosis 350 mg/kg bb

AUC_(T1-T2) = luas AUC pada T1-T2

AUC_(T2-T3) = luas AUC pada T2-T3

AUC_(T3-T4) = luas AUC pada T3-T4

AUC_(Total) = total penjumlahan AUC_(T1-T2), AUC_(T2-T3) dan AUC_(T3-T4)

* menunjukkan berbeda signifikan ($p < 0,05$) pada kelompok II.

Nilai AUC total kelompok III secara statistik memberikan beda nyata pada II sehingga hal tersebut menunjukkan terjadi penurunan kadar glukosa darah yang signifikan. Hal ini didukung dengan kurva pada gambar 12 yang menurun setelah T2 karena glibenklamid sendiri adalah obat DM.

Hasil uji statistik nilai AUC kelompok IV-VII memberikan beda nyata terhadap kelompok II. Hasil statistik tersebut terjadi karena kelompok-kelompok ini memiliki aktivitas antihiperglikemia. Urutan nilai AUC total dari tinggi ke rendah adalah kelompok IV, kelompok VI, kelompok V dan kelompok VII. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok IV, V, VI dan VII dapat menurunkan kadar glukosa darah secara signifikan selama 2 minggu pelakuan. Ekstrak dan fraksi etil asetat daun kersen mengandung flavonoid yang dapat menurunkan kadar gula darah pada

tikus terinduksi DM oleh streptozotosin. Flavonoid tersebut salah satunya diketahui yaitu quersetin (Wen-Lung *et al.*, 2014). Menurut Monserrat *et al.* (2008), quersetin adalah salah satu flavonoid yang dapat menurunkan kadar glukosa darah tikus DM melalui menambah jumlah islet langerhans pankreas, meningkatkan kadar insulin plasma, proteksi sel β dari kerusakan, menurunkan tingkat oksidatif stress marker dengan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan.

10. Hasil pengukuran aktivitas enzim SOD dan GPx dan kadar MDA

Kemampuan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kersen meningkatkan aktivitas enzim antioksidan SOD dievaluasi dengan mengukur peningkatan aktivitas enzim SOD sebagai enzim antioksidan alami dalam tubuh pada homogenat hati tikus yang telah diberi perlakuan ekstrak selama 18 hari. Perhitungan aktivitas SOD dan GPx dan kadar MDA ditunjukkan pada lampiran 11.

Tabel 5. Rata-rata hasil pengukuran aktivitas enzim SOD, GPx dan penurunan kadar MDA pada hati tikus

Kelompok	N	Hasil rata-rata aktivitas SOD, GPx dan MDA \pm SD		
		SOD (%)	GPx (U/mg)	MDA (nmol/g)
I	6	77,12 \pm 3,87*	73,18 \pm 1,18*	1,93 \pm 0,21*
II	6	18,63 \pm 5,16	11,85 \pm 0,36	9,28 \pm 0,30
III	6	59,48 \pm 5,95*	67,61 \pm 0,85*	3,01 \pm 0,18*
IV	6	30,72 \pm 3,87*	17,17 \pm 0,51*	6,73 \pm 0,29*
V	6	35,29 \pm 4,67*	34,80 \pm 1,03*	4,78 \pm 0,25*
VI	6	38,89 \pm 5,48*	34,97 \pm 0,67*	4,44 \pm 0,13*
VII	6	45,75 \pm 3,87*	65,39 \pm 0,38*	3,66 \pm 0,11*

Keterangan :

I = kelompok normal

II = kelompok kontrol negatif

III = kelompok kontrol positif glibenklamid 0,45 mg/kg bb tikus

IV = kelompok ekstrak etanol daun kersen dosis 250 mg/kg bb

V = kelompok ekstrak etanol daun kersen dosis 350 mg/kg bb

VI = kelompok fraksi etil asetat daun kersen dosis 250 mg/kg bb

VII = kelompok fraksi etil asetat daun kersen dosis 350 mg/kg bb

* menunjukkan berbeda signifikan ($p < 0,05$) pada kelompok II

Tabel 5 menunjukkan kelompok normal (I) memberikan hasil rata-rata kadar normal dari aktivitas enzim antioksidan SOD, GPx dan kadar MDA pada kondisi tikus sehat. Nilai SOD dan GPx yang tinggi serta kadar MDA yang rendah menunjukkan bahwa tikus dalam kondisi yang normal. Nilai pada kelompok I ini dijadikan acuan keadaan aktivitas enzim dan kadar lipid peroksida yang normal. Pada kondisi normal jaringan pankreas memiliki mekanisme sistem pertahanan alami berupa enzim antioksidan endogen yaitu SOD, *catalase* (Cat), dan glutathion peroksidase (GPx) yang berfungsi menetralkan dan mempercepat degradasi senyawa radikal bebas sehingga kerusakan komponen makromolekul sel dapat dicegah (Valko *et al.*, 2007). Dalam keadaan normal tidak terjadi peroksidasi lipid yang merupakan proses perusakan oksidasi asam lipid tidak jenuh berantai panjang (*polyunsaturated fatty acids*) pada membran sel yang menghasilkan senyawa MDA (Yustika, 2013).

Hasil pengukuran rata-rata aktivitas SOD dan GPx dan kadar MDA pada kelompok II menunjukkan penurunan aktivitas enzim antioksidan yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok I. Kondisi hiperglikemi yang terus-menerus membuat glukosa mengalami proses metabolisme melalui jalur autooksidasi, glikasi dan pembentukan dikarbonil yang menghasilkan radikal bebas hidroksil (OH^\cdot) dan radikal superoksida (O_2^\cdot). Radikal bebas yang dihasilkan sangat tinggi dan jumlah antioksidan tidak mampu menetralkan atau dimusnahkan oleh enzim antioksidan endogen yaitu SOD dan GPx kemudian keadaan hiperglikemia juga membuat enzim-enzim antioksidan terglikasi karena tingginya kadar glukosa. Tingginya kadar MDA pada kontrol negatif menunjukkan status enzim antioksidan yang

rendah, sehingga tidak dapat mencegah reaktivitas senyawa radikal bebas (Suarsana *et al.*, 2011; Justin & Sushil, 2011).

Hasil pengukuran pada tabel 5 menunjukkan kelompok III-VII terjadi peningkatan rata-rata aktivitas SOD dan GPx dan penurunan kadar MDA dibandingkan dengan nilai pada kelompok kontrol negatif. Berdasarkan hasil analisis statistik aktivitas SOD dan GPx dan kadar MDA dari kelompok IV-VII menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol negatif (II). Peningkatan aktivitas enzim antioksidan SOD dan GPx dan penurunan kadar MDA dari terendah ke tertinggi pada kelompok uji adalah kelompok IV, kelompok V, kelompok VI dan kelompok VII. Informasi tersebut menunjukkan bahwa aktivitas tersebut berbanding lurus dengan dosis uji dan senyawa-senyawa yang terkandung. Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat diketahui mengandung senyawa-senyawa flavonoid seperti quercetin, rutin, kirsin, quersitrin dan kaempferol. Fraksi etil asetat mengandung senyawa-senyawa flavonoid tersebut lebih banyak dan terkonsentrat dalam dosis uji dibandingkan dosis uji ekstrak etanol yang masih mengandung banyak senyawa (Zakaria *et al.*, 2016). Quercetin, kaempferol dan quersitrin adalah metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antioksidan, menetralkan radikal bebas secara langsung dan mengurangi oksidasi LDL, menurunkan stres oksidatif, meningkatkan aktivitas enzim antioksidan dan merangsang proliferasi sel β . (Ramachandran & Baojun, 2015; Parul & Deepak, 2007).

Peningkatan kadar SOD dan GPx serta penurunan kadar MDA pada kelompok positif dan kelompok ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kersen

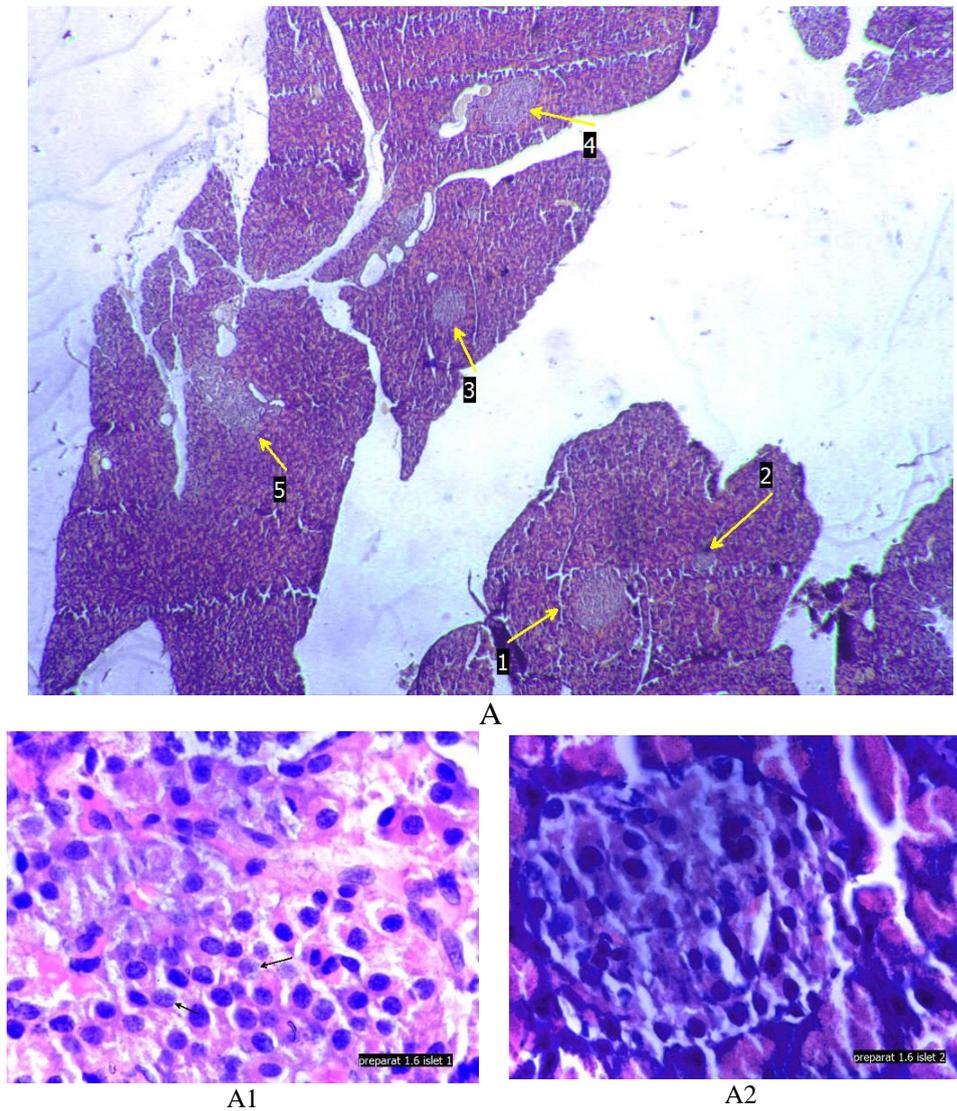
sebagai indikator yang menunjukkan adanya pengaruh pemberian terhadap peningkatan mekanisme pertahanan adaptif terhadap radikal bebas dan melindungi sel β pankreas dari stres oksidatif (Erejuwa *et al.*, 2010). Aktivitas glibenklamid dan senyawa metabolit yang terkandung dalam ekstrak etanol dan fraksi etil asetat terbukti memiliki aktivitas meningkatkan aktivitas antioksidan SOD dan GPx dan menurunkan kadar MDA, walaupun aktivitasnya belum mendekati nilai normal pada kelompok normal.

11. Hasil Pengamatan Preparat Histologi Organ Pankreas Tikus dengan

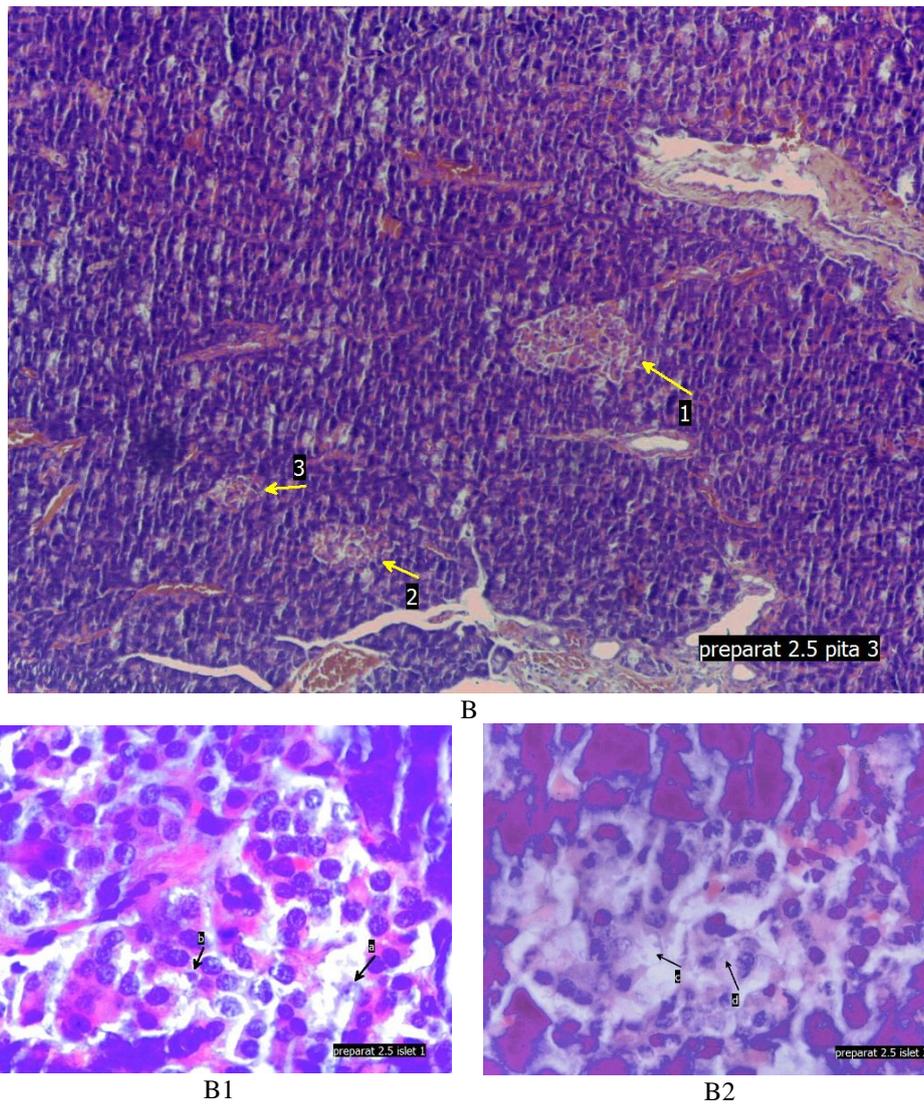
Pewarnaan Hematoksin Eosin

Hasil preparat histopatologi jaringan pankreas semua kelompok dievaluasi dengan mengamati keadaan islet pada perbesaran 4x dan perbesaran 100x pada tiap satu irisan preparat histopatologi pankreas. Parameter yang digunakan dalam pengamatan regenerasi sel β adalah perbandingan keadaan islet pankreas tiap-tiap kelompok dari hasil foto potongan jaringan pankreas yang telah diwarnai dengan HE. Hasil foto pewarnaan preparat dengan HE terhadap potongan jaringan pankreas tikus ditunjukkan Gambar 12-18.

Gambar 13 menunjukkan keadaan islet langerhans yang normal (tanda panah kuning) dengan bentuk islet oval pada dan pada perbesaran islet 1 (A1) dan 2 (A2) 1000x sel-sel penyusun islet tampak padat dan kompak tidak ada sel kosong. Gambar islet 1 dan 2 menunjukkan sel β masih normal, memiliki inti sel yang besar dan ukuran sel normal (tanda panah hitam).



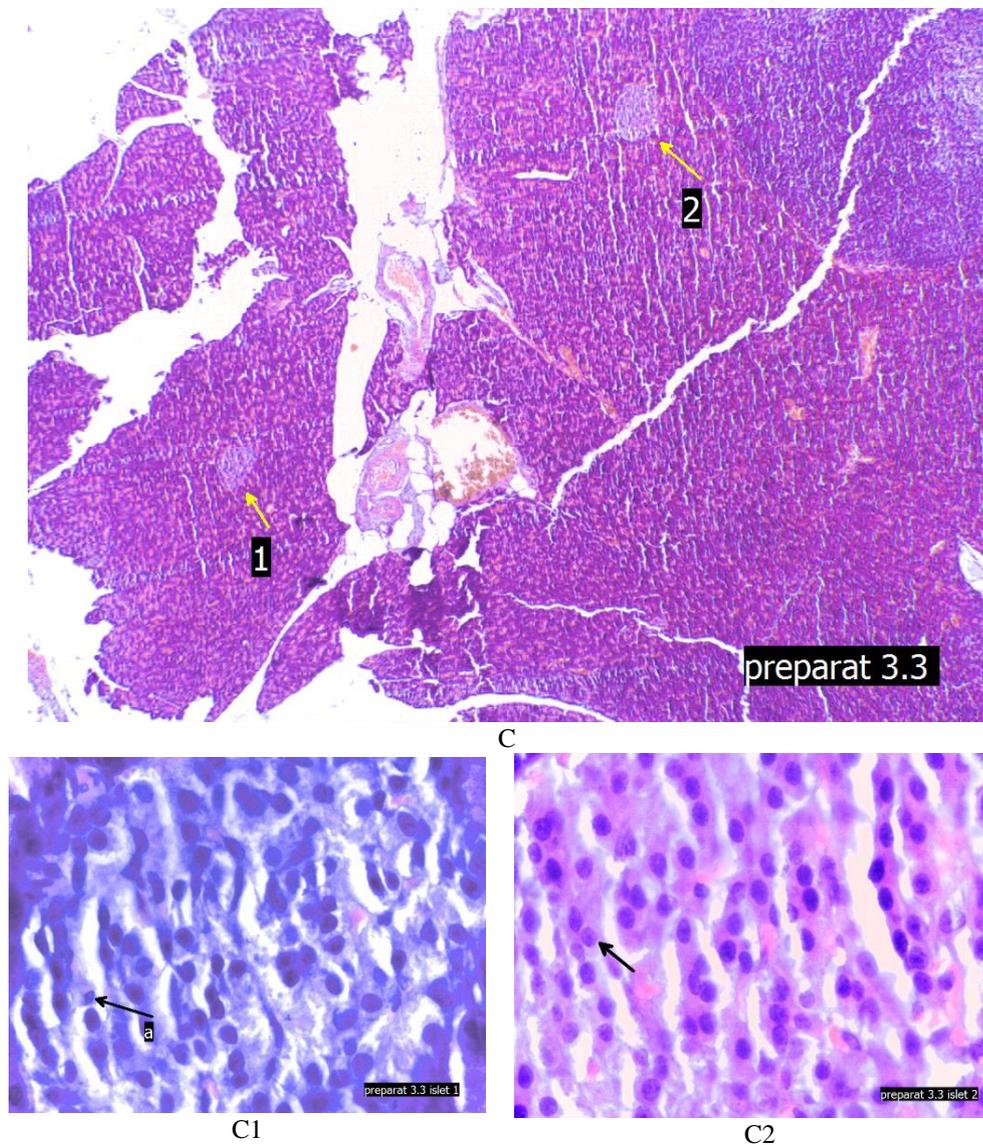
Gambar 13. Hasil foto preparat pankreas kelompok I dengan pewarnaan HE.
 Foto irisan jaringan pankreas perbesaran 4x (A) dengan kumpulan islet-islet langerhans (tanda panah dengan nomor). Gambar islet 1 dengan perbesaran 1000x (A1) dan gambar islet 2 dengan perbesaran 1000x (A2).



Gambar 14. Hasil foto preparat pankreas kelompok II dengan pewarnaan HE.
Foto irisan jaringan pankreas perbesaran 4x (B) dengan kumpulan islet-islet langerhans (tanda panah dengan nomor). Gambar islet 1 dengan perbesaran 1000x (B1) dan gambar islet 2 dengan perbesaran 1000x (B2).

Gambar 14 menunjukkan bahwa keadaan jaringan islet langerhans pada kelompok II terjadi kerusakan pada sel β . islet 2 dan 3 (tanda panah kuning) menunjukkan terjadinya penyusutan islet karena ukurannya lebih kecil dibandingkan kelompok normal dan bentuk islet tidak beraturan bukan lagi oval. gambar perbesaran 1000x pada islet 1 (B1) menunjukkan sel-sel β penyusun islet ada yang mengalami nekrosis ditunjukkan dengan hiposelularitas (tanda panah

hitam sebelah kanan) dan inti sel yang mengecil (tanda panah hitam sebelah kiri) walaupun pada perbesaran 4x ukuran islet masih besar. islet 2 (B2) perbesaran 1000x memperlihatkan sel-sel β banyak yang nekrosis karena banyak ruang di dalam jaringan islet menandakan bekas sel β (tanda panah sebelah kiri) dan sel-sel β dengan inti yang kecil. keadaan histopatologi tersebut akibat induksi streptozotosin-nikotinamid. Streptozotosin merusak sel β sedangkan nikotinamid sebagai agen pelindung sel agar kerusakan oleh streptozotosin tidak parah sehingga pada irisan preparat masih ada islet yang berukuran normal. Streptozotosin adalah senyawa yang toksik dan selektif terhadap sel β di pankreas atau sel yang mengekspresikan protein GLUT-2 seperti sel hepatosit dan sel tubular renal karena streptozotosin memiliki gugus molekul glukosa sehingga dapat masuk ke dalam sel melalui protein tersebut. Gugus molekul metilnitrosurea streptozotosin saat masuk ke dalam sel akan memproduksi radikal bebas ion karbonium (CH_3^+) yang toksik terhadap DNA pada inti sel dengan memetilasi molekul DNA sehingga inti sel β akan mengecil karena rusak kemudian sel mengalami inflamasi dan nekrosis. Streptozotosin saat masuk ke dalam sel akan termetabolisme dengan dan tanpa enzim menghasilkan radikal-radikal bebas mengakibatkan stres oksidatif dalam sel mengingat sistem pertahanan antioksidan dalam sel β sangat rendah. Nikotinamid adalah senyawa derivat vitamin B3 yang memiliki aktivitas antioksidan terhadap streptozotosin dengan mengikat radikal-radikal bebas hasil metabolisme dan mencegah metilasi DNA. Nikotinamid diberikan untuk mencegah kerusakan sel β oleh streptozotosin tidak terlalu parah karena apabila kadar glukosa darah terlalu tinggi, tikus uji harus diberikan insulin agar tetap hidup (Asghar & Sajad, 2014).



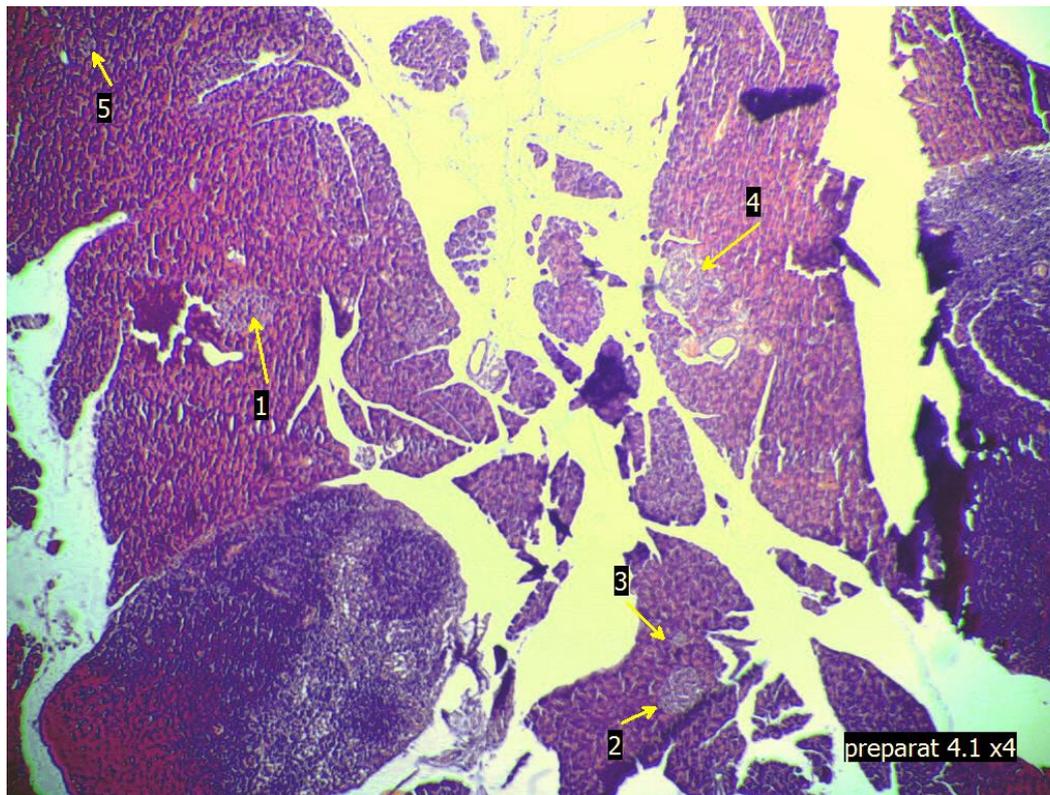
Gambar 15. Hasil foto preparat pankreas kelompok III dengan pewarnaan HE.

Foto irisan jaringan pankreas perbesaran 4x (C) dengan kumpulan islet-islet langerhans (tanda panah dengan nomor). Gambar islet 1 dengan perbesaran 1000x (C1) dan gambar islet 2 dengan perbesaran 1000x (C2).

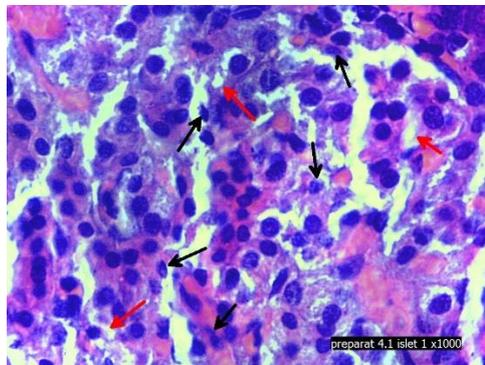
Gambar 15 menunjukkan keadaan histopatologi islet pada kelompok III yang memperlihatkan keadaan islet (tanda panah kuning gambar C) yang berbentuk oval dan berukuran seperti keadaan islet normal. Perbesaran islet 1000x memperlihatkan struktur islet yang mengalami perbaikan dimana di dalam islet

masih ada sel β dengan inti kecil (piknotik) pada tanda panah hitam islet 1 (C1) sedangkan ukuran islet besar dan islet 2 perbesaran 1000x (C2) juga menunjukkan jumlah sel β (tanda panah hitam) yang meningkat. Dalam gambar C memperlihatkan satu islet pankreas yang ukurannya berkurang karena bentuk islet oval tetapi terlihat menyusut dengan sisi yang agak tajam di bagian bawah kemudian perbesaran 1000x (C1) memperlihatkan keadaan sel β ada yang rusak dan ada terjadi regenerasi sel β ditunjukkan dengan ruang kosong islet sedikit dan susunan sel-sel yang teratur dan lebih padat jika dibandingkan dengan islet preparat kelompok II. Gambar C2 memperlihatkan bahwa terjadinya penambahan sel β di islet langerhans ditunjukkan banyaknya sel-sel di dalam islet dan ukuran islet yang besar.

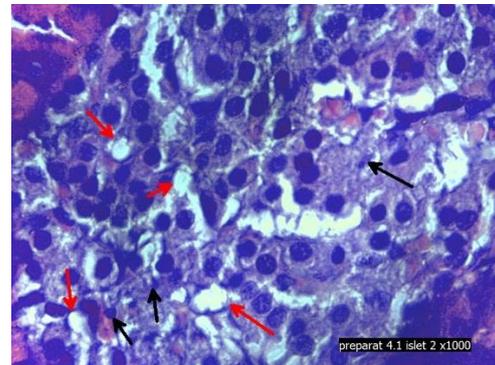
Gambar 16 menunjukkan islet-islet dengan berbagai macam ukuran diameter seperti pada tanda panah 1 islet berdiameter besar dan islet 3 yang berdiameter kecil. D1 dan D2 yang menunjukkan keadaan islet 1 dan 2 perbesaran 1000x menunjukkan bahwa terdapat kerusakan sel yaitu inti sel mengecil (tanda panah hitam) dan ada ruang kosong berbentuk sel (tanda panah merah) sementara ukuran islet besar, jumlah sel β yang banyak dan susunan sel terlihat rapat. Keadaan tersebut mengindikasikan telah terjadi perbaikan dan regenerasi sel β pada pankreas tikus kelompok IV.



D



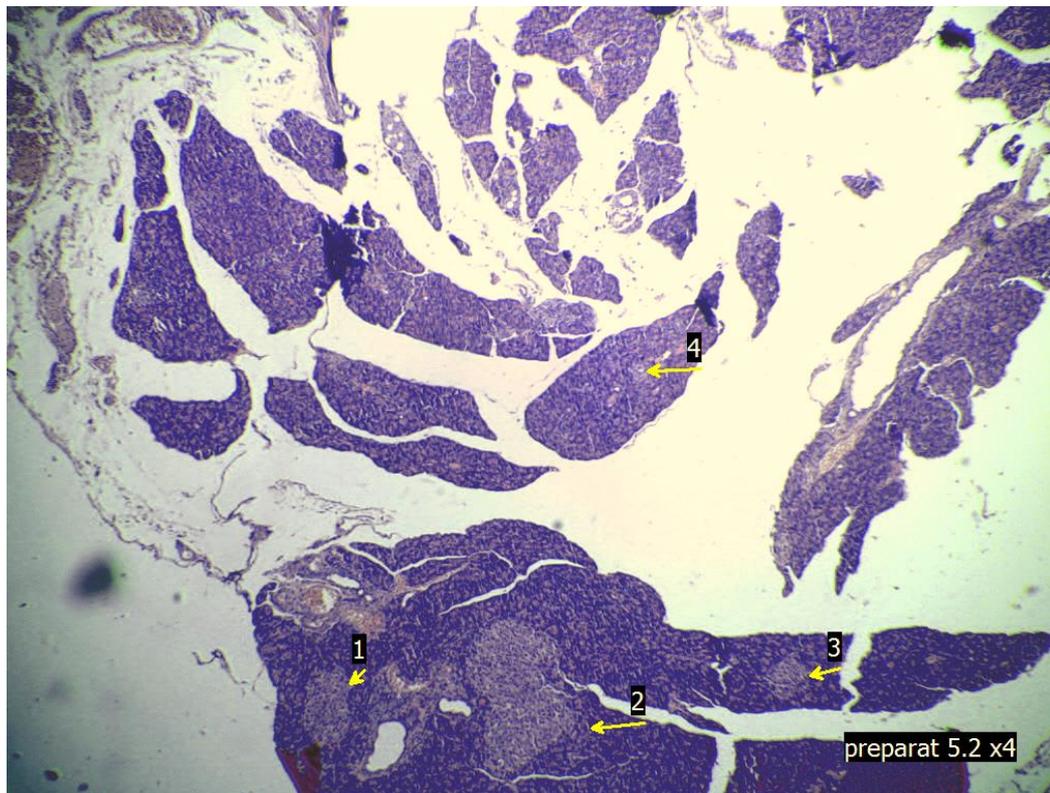
D1



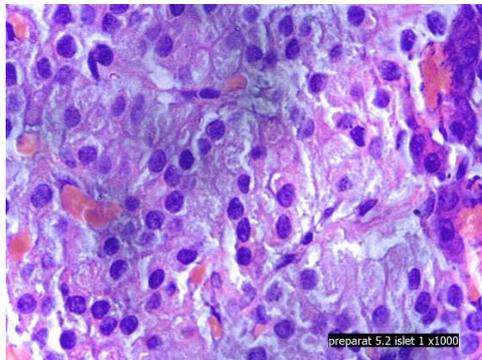
D2

Gambar 16. Hasil foto preparat pankreas kelompok IV dengan pewarnaan HE.

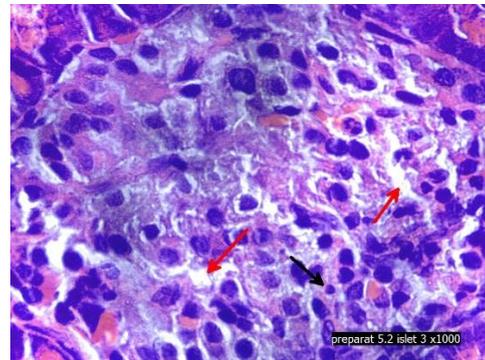
Foto irisan jaringan pankreas perbesaran 4x (D) dengan kumpulan islet-islet langerhans (tanda panah dengan nomor). Gambar islet 1 dengan perbesaran 1000x (D1) dan gambar islet 2 dengan perbesaran 1000x (D2). Inti sel β kecil (tanda panah hitam) dan sel kosong (tanda panah merah).



E



E1



E3

Gambar 17. Hasil foto preparat pankreas kelompok V dengan pewarnaan HE.

Foto irisan jaringan pankreas perbesaran 4x (E) dengan kumpulan islet-islet langerhans (tanda panah dengan nomor). Gambar islet 1 dengan perbesaran 1000x (E1) dan gambar islet 3 dengan perbesaran 1000x (E3). Inti sel β kecil (tanda panah hitam) dan sel kosong (tanda panah merah).

Gambar 17 bagian E memperlihatkan islet-islet dengan diameter yang beragam seperti tanda panah 1 islet berukuran besar dan tanda panah 3 dan 4 islet berukuran kecil. Gambar E1 menunjukkan keadaan islet 1 dimana jumlah sel β meningkat, ruang kosong berkurang dan susunan sel tampak padat. Gambar E3

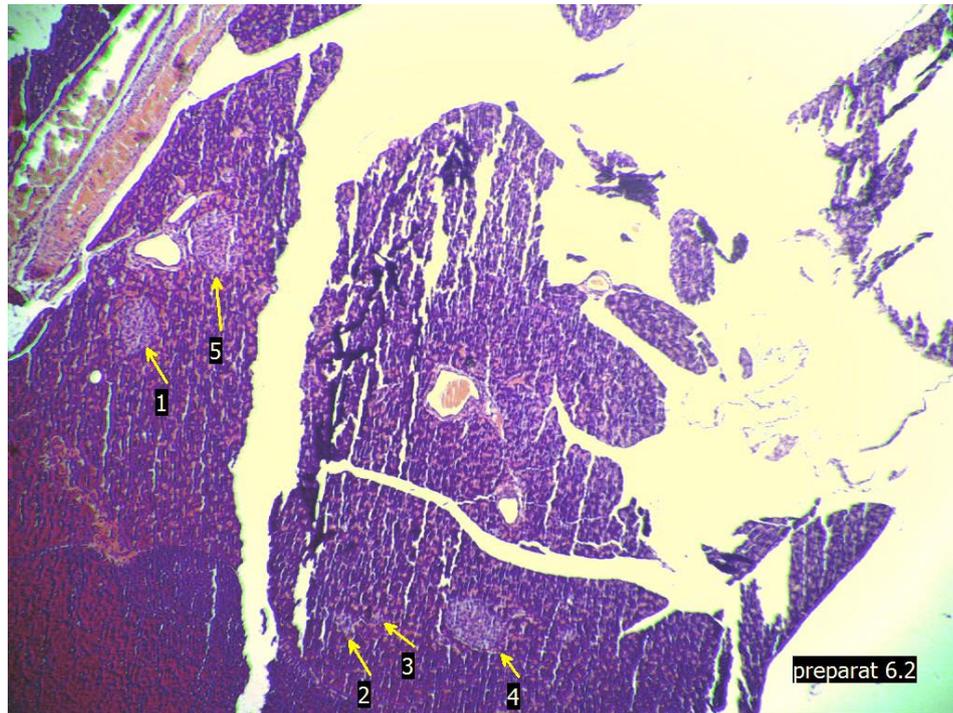
menunjukkan terjadinya perbaikan sel β . Sel β dengan inti kecil dan ruang kosong berbentuk sel masih ditemukan walaupun ukuran islet tidak terlalu kecil dan jumlah sel β yang banyak ditambah susunan antar sel tampak padat jika dibandingkan dengan islet kelompok II. Hal ini mengindikasikan terjadinya regenerasi sel β pada preparat histologi pankreas kelompok V.

Gambar 18 bagian F menunjukkan keadaan preparat histologi kelompok VI dimana terdapat islet langerhans dengan diameter besar (tanda panah 1,4,5) dan diameter kecil (tanda panah 2 dan 3). F1 menunjukkan perbaikan sel β dimana jumlah sel meningkat, susunan sel rapat dan ruang kosong tidak ditemukan. F2 menunjukkan keadaan islet 2 dengan bentuk islet tidak oval dengan perbesaran 1000x memperlihatkan keadaan perbaikan jaringan islet dimana ditemukan ruang-ruang kosong berbentuk sel pada sisi bawah walaupun sisi atas sudah terdapat sel-sel β yang memenuhi bagian tersebut. Hal ini menunjukkan pada preparat histologi jaringan pankreas kelompok VI terjadi regenerasi sel β .

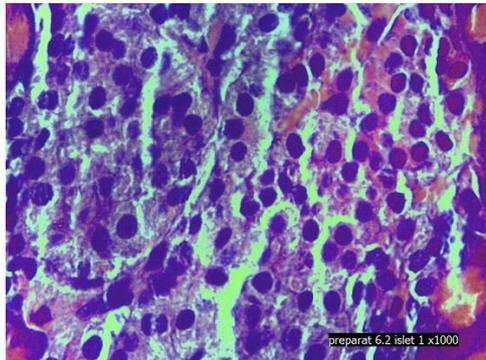
Gambar 19 bagian G menunjukkan keadaan preparat histologi kelompok VII dimana terdapat islet pankreas dengan diameter besar (tanda panah 1 dan 2) dan diameter kecil (3,4,5). G1 menunjukkan keadaan islet 1 terjadi perbaikan sel β dimana jumlah sel meningkat, susunan sel-sel padat dan ruang kosong tidak ditemukan. G2 menunjukkan keadaan islet 2 sama seperti G1. Hal ini menunjukkan pada preparat histologi jaringan pankreas kelompok VII terjadi regenerasi sel β .

Keadaan hiperglikemia yang terus menerus dapat merusak sel β melalui pengaktifan jalur apoptosis dan nekrosis. Jalur apoptosis sel β terjadi karena tingginya kadar glukosa menyebabkan aktifnya jalur reaksi glikasi protein,

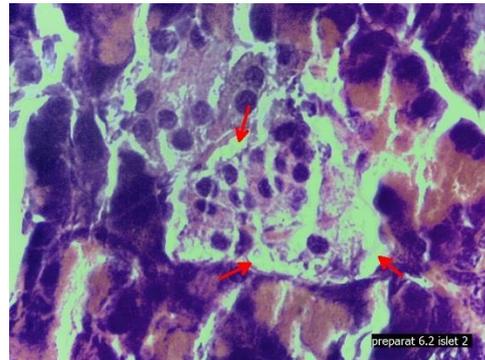
autooksidasi glukosa, pembentukan *Advanced Glycation End Products* (AGEs) dan aktifnya jalur poliol, jalur heksosamin dan protein kinase-C (PKC) yang memicu pengaktifan jalur apoptosis dan nekrosis. Mekanisme metabolisme tersebut menghasilkan radikal-radikal bebas *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS). ROS seperti superoksida (O_2^-), hidroksil (OH), peroksil (RO_2), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan RNS seperti nitrat oksida (NO). Peningkatan jumlah radikal bebas dapat menyebabkan stres oksidatif pada sel β yang memiliki pertahanan oksidatif rendah dan mengakibatkan kerusakan sel (Justin & Sushil, 2011). Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kersen mengandung senyawa flavonoid seperti quersetin, quersitrin, rutin dan kaempferol yang memiliki aktivitas melindungi pankreas dari stres oksidatif, menghambat jalur apoptosis dan merangsang proliferasi sel β pankreas (Shasank & Abhay, 2013). Aktivitas antioksidan senyawa-senyawa tersebut berkontribusi dalam menurunkan tingkat stres oksidatif pada sel β sehingga kerusakan lebih lanjut oleh radikal bebas dapat dicegah dan jalur-jalur apoptosis dan nekrosis sel akibat stres oksidatif dapat pula dicegah. Quersetin, rutin dan kaempferol dapat menghambat mediator-mediator apoptosis dan inflamasi akibat stres oksidatif (seperti interleukin- 1β dan TNF- α dan protein caspase yang merupakan protein mediator kematian sel). Quercetin, quersitrin dan kirsin memiliki aktivitas meningkatkan proliferasi sel β pankreas melalui perbaikan keadaan stres oksidatif sel (Montserrart *et al.*, 2008).



F



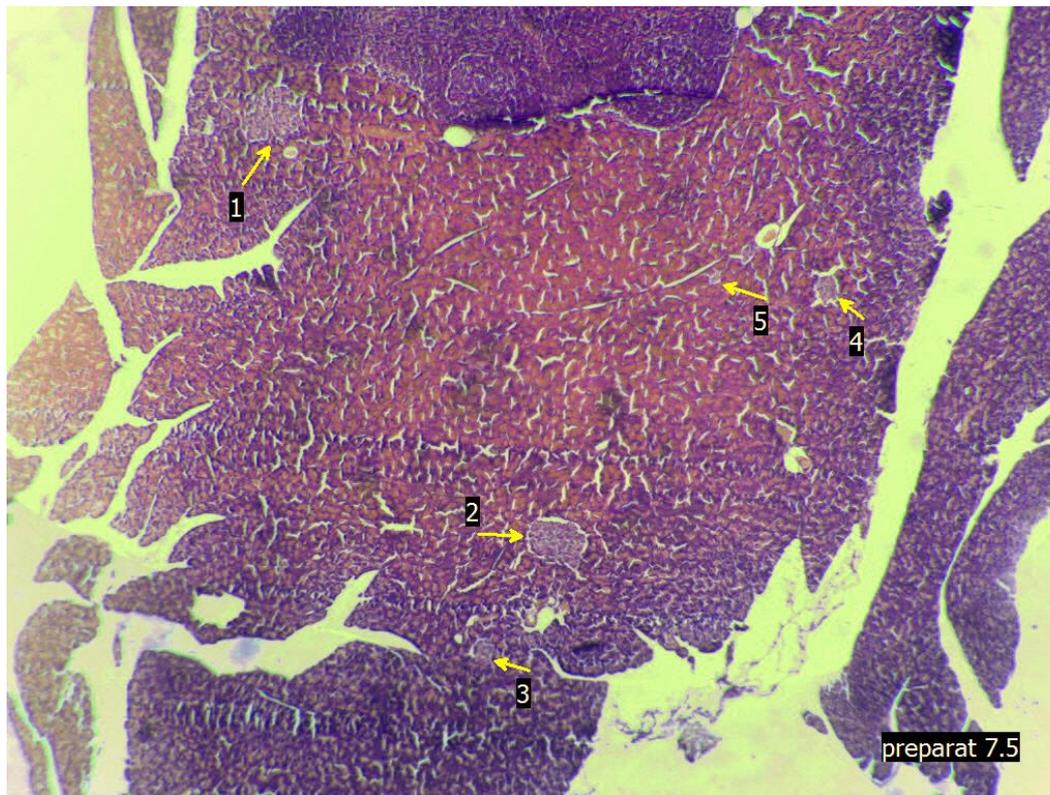
F1



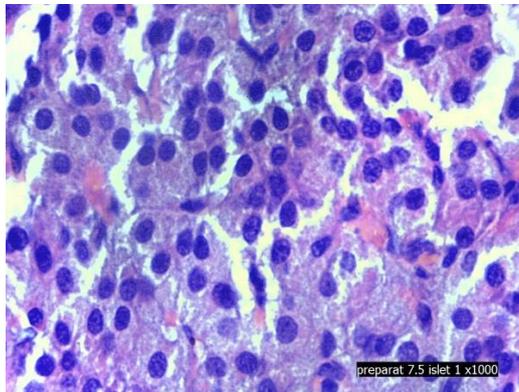
F2

Gambar 18. Hasil foto preparat pankreas kelompok VI dengan pewarnaan HE.

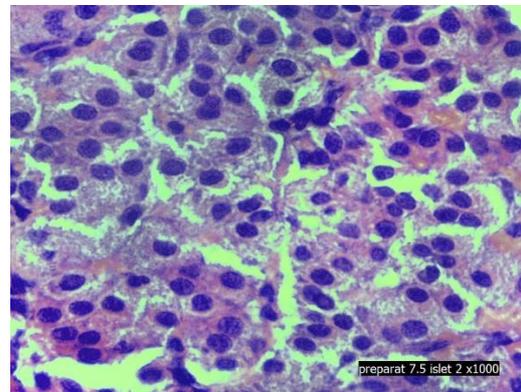
Foto irisan jaringan pankreas perbesaran 4x (F) dengan kumpulan islet-islet langerhans (tanda panah dengan nomor). Gambar islet 1 dengan perbesaran 1000x (F1) dan gambar islet 2 dengan perbesaran 1000x (F2).



G



G1



G2

Gambar 19. Hasil foto preparat pankreas kelompok VII dengan pewarnaan HE.

Foto irisan jaringan pankreas perbesaran 4x (G) dengan kumpulan islet-islet langerhans (tanda panah dengan nomor). Gambar islet 1 dengan perbesaran 1000x (G1) dan gambar islet 2 dengan perbesaran 1000x (G2).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kersen (*Muntingia calabura*) mempunyai aktivitas menurunkan kadar glukosa darah pada tikus DM yang diinduksi streptozotosin-nikotinamid.
2. Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kersen (*Muntingia calabura*) mempunyai aktivitas meningkatkan aktivitas enzim antioksidan SOD dan GPx serta menurunkan kadar MDA pada tikus DM yang diinduksi streptozotosin.
3. Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kersen (*Muntingia calabura*) mempunyai aktivitas regenerasi sel β pankreas pada tikus DM yang diinduksi streptozotosin.

B. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menambahkan dosis dan menambah waktu lama perlakuan fraksi senyawa aktif yang mempunyai aktivitas antihiperqlikemia.
2. Perlu dilakukan uji histologi pada organ lain seperti ginjal dan hati untuk mengetahui kerusakan organ lain karena induksi streptozotosin.
3. Perlu dilakukan uji imunohistokimia untuk melihat jelas jumlah sel-sel β islet langerhans.
4. Perlu dilakukannya identifikasi lebih lanjut metabolit flavonoid pada KLT fraksi etil asetat.

RINGKASAN

Diabetes mellitus (DM) merupakan sindrom metabolik yang umumnya ditandai dengan hiperglikemia, resistensi insulin dan kekurangan insulin. Terjangkitnya penyakit tersebut merupakan reaksi dari beberapa faktor seperti genetik, lingkungan, faktor resiko pola hidup dan umur. Penyakit ini semakin meningkat prevalensinya di dunia dari tahun ke tahun karena perubahan gaya hidup, pola makan yang kaya karbohidrat dan lemak tapi kurang serat. Pasien terdiagnosa DM tipe 2 biasanya setelah terjadi komplikasi terutama pada daerah-daerah minim sumber daya (Abdulfatai *et al.*, 2012). Kondisi hiperglikemi mengakibatkan terjadinya autooksidasi glukosa, glikasi protein dan aktivasi jalur metabolisme poliol yang selanjutnya mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif (ROS) (Uneo, 2002). ROS di dalam sel β dapat merusak sel dan merubah protein reseptor insulin pada sel mengakibatkan kurang sensitifnya reseptor apabila berikatan dengan insulin (Erik *et al.*, 2011). Hal ini merupakan awal dari kerusakan oksidatif yang dikenal dengan istilah stres oksidatif (Setiawan & Suhartono, 2005).

Penurunan stres oksidatif dalam sel β pankreas dapat mencegah atau menunda perkembangan DM tipe 2 serta komplikasi yang berhubungan. Aktivitas antioksidan alami mampu melindungi tubuh terhadap kerusakan yang disebabkan spesies oksigen reaktif (Raza, 2011). Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa senyawa fenolik seperti flavonoid mempunyai aktivitas antioksidan penangkap radikal (Sunarni *et al.*, 2007). Senyawa golongan flavonol dan flavon menunjukkan sifat antidiabetes pada uji *in vivo* pada tikus (Lukacinova *et al.*, 2008).

Kersen atau talok (*Muntingia calabura*) adalah salah satu tanaman yang memiliki efek antioksidan dan menurunkan kadar gula darah. Buah kersen dipercaya dapat menyembuhkan penyakit seperti hipertensi, asam urat dan DM. Rakhmi (2008) telah melakukan penelitian tentang buah kersen sebagai antidiabetes dan antioksidan. Hasil penelitiannya menunjukkan terjadinya penurunan kadar gula darah dan menghambat kerusakan sel-sel β pankreas pada hewan uji yang diinduksi streptozotosin karena, ekstrak tersebut mengandung flavonoid yang berperan sebagai antioksidan. Penelitian yang telah dilakukan oleh Mahmoud (2014) terhadap beberapa tanaman telah menunjukan bahwa beberapa metabolit sekunder yang dapat mengontrol kadar glukosa darah adalah Flavonoid, quercetin, quinolizidine, antosianin, katekin dan flavon dan kumarin. Daun kersen (*Muntingia calabura*) diketahui mengandung senyawa flavonoid yaitu quercetin, quersitrin, kirsin, kaempferol dan rutin (Zainal *et al.*, 2014). Menurut Sashank dan Abbay (2013) Senyawa-senyawa flavonoid tersebut memiliki aktivitas antihiperqlikemia, dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan dan memperbaiki sel β pankreas. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah ekstrak etanol dan fraksi daun kersen memiliki aktivitas antihiperqlikemia dan apakah dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan SOD, GPx dan menurunkan kadar MDA serta mengetahui kemampuan regenerasi islet langerhans pankreas yang diinduksi dengan streptozotosin-nikotinamid berdasarkan informasi-informasi sebelumnya.

Penelitian ini menggunakan 42 ekor tikus Wistar jantan umur 8 minggu dengan berat antara 150-250 gram, dipelihara dengan kondisi kandang yang terjaga temperatur suhu 21°C kelembapan 55% dan diberi pakan dan air *ad libitum*. Secara

acak tikus dikelompokkan menjadi 7 kelompok. Setiap kelompok terdiri atas 6 ekor tikus dan mendapat perlakuan berbeda yaitu: kelompok I sebagai kontrol normal tikus, kelompok II sebagai kontrol negatif tikus diinduksi DM dengan streptozotosin-nikotinamid tanpa perlakuan, kelompok III sebagai kontrol positif diberikan glibenklamid 0,45 mg/kg bb. Kelompok IV dan V sebagai kelompok uji pada tikus DM diberikan ekstrak etanol daun kersen dengan dosis 250 mg/Kg bb dan 350 mg/Kg bb. Kelompok uji VI dan VII sebagai kelompok uji pada tikus DM diberikan fraksi etil asetat daun kersen dengan dosis 250 mg/Kg bb dan 350 mg/Kg bb. Tikus pada kelompok III-VII diberi perlakuan selama 18 hari sesuai dengan perlakuan untuk setiap kelompok uji.

Pengukuran kadar glukosa tikus dilakukan seminggu setelah tikus diadaptasikan. Tikus dipuasakan selama 10 jam sebelum pengambilan darah. Pengambilan darah awal untuk pengukuran kadar glukosa darah T1 di hari ke-1 dimana tikus belum terinduksi DM. Induksi DM dilakukan dengan pemberian nikotinamid 230 mg/kg bb yang diinjeksikan secara intraperitoneal lalu 15 menit kemudian diinjeksikan streptozotosin 65 mg/kg bb secara intraperitoneal pada hari yang sama setelah pengambilan darah T1. Tikus dibiarkan 72 jam tanpa perlakuan setelah injeksi streptozotosin-nikotinamid. Pengukuran kadar glukosa darah T2 dilakukan pada hari ke-4 dimana tikus positif DM memiliki kadar glukosa puasa lebih dari 200 mg/dl. Tikus mulai diberikan perlakuan sesuai kelompok setelah pengambilan darah T2. Pengukuran kadar glukosa berikutnya dilakukan pada hari ke-11 (T3) dan hari ke-18 (T4). Organ pankreas dan hati tikus diambil Pada hari ke-18. Hati tikus diolah menjadi homogenat jaringan untuk penentuan aktivitas

SOD, GPx dan penentuan kadar MDA sedangkan pankreas untuk pembuatan preparat dan pengamatan histopatologi pankreas (dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin).

Hasil pengukuran berat badan tikus uji kelompok III menunjukkan kenaikan berat badan sampai pada hari ke-18. Kenaikan berat badan ini dapat dimaknai sebagai akibat pemberian glibenklamid pada hewan uji. Prosentase kenaikan berat badan tikus uji pada kelompok IV-VII berturut-turut yaitu 4,6 %, 8,1 %, 8 % dan 10,4 %. Berat kelompok V-VII saja yang memberikan beda nyata terhadap berat kelompok II, kecuali kelompok IV.

Kelompok III-VII menunjukkan adanya penurunan kadar glukosa darah pada hari ke-18 (T4). Kadar glukosa darah Kelompok III-VII memberikan beda nyata terhadap kadar glukosa darah kelompok II ($211,66 \pm 7,3$ mg/dL). Kelompok VII tidak menunjukkan adanya beda nyata terhadap kelompok III yang menandakan aktivitas fraksi etil asetat 350 mg/ kg bb sama terhadap glibenklamid 0,45 mg/kg bb tikus. Dosis fraksi etil asetat daun kersen yang besar (350 mg/kg bb) memberikan penurunan kadar glukosa darah tikus yang paling baik dibandingkan ekstrak etanol daun kersen walaupun dua perlakuan uji tersebut belum mendekati kondisi normal.

Pada pengukuran rata-rata kadar SOD dan GPx kontrol III-VII terjadi peningkatan dibandingkan dengan rata-rata kadar kelompok II. Berdasarkan hasil analisis statistik peningkatan aktivitas SOD dan GPx dan kadar MDA dari kelompok III-VII menunjukkan perbaikan aktivitas yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok II walaupun aktivitas kelompok III-VII belum mendekati nilai

normal pada kelompok normal dimana hasil analisis statistik memberikan beda nyata ($p > 0,05$).

Hasil pengamatan preparat histopatologi pankreas dengan pewarnaan HE kelompok III-VII menunjukkan adanya regenerasi sel β pada islet langerhans pankreas dan mendekati keadaan kelompok I dibandingkan kelompok II dengan keadaan islet pada preparat histologinya yang mengalami penurunan. Keadaan islet langerhans pada preparat kelompok III-VII dengan perbesaran 4x memperlihatkan bentuk islet yang masih oval dengan sisi beraturan dan diameter islet ada yang sama dan mendekati diameter islet kelompok I (normal). Foto tiap islet dengan perbesaran 1000x menunjukkan adanya perbaikan pada islet ditandai dengan meningkatnya jumlah sel-sel β , berkurangnya ruang kosong dan susunan sel yang semakin padat walaupun masih ditemukannya sel yang mengalami pengecilan inti dan hiposelularitas. Keadaan islet langerhans yang mendekati kelompok normal mengakibatkan meningkatnya produksi insulin pada sel-sel β pankreas sehingga dapat menurunkan kadar glukosa darah. Pengaruh pemberian ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kersen terhadap islet langerhans mampu memperbaiki kerusakan sel-sel β pankreas akibat induksi streptozotosin-nikotinamid. Ekstrak dan fraksi etil asetat daun kersen mengandung flavonoid yang dapat menurunkan kadar gula darah pada tikus terinduksi DM oleh streptozotosin. Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kersen diketahui mengandung senyawa-senyawa flavonoid seperti quercetin, rutin, kirsin, quersitrin dan kaempferol dimana flavonoid-flavonoid tersebut memiliki aktivitas antihiperlikemia (Shasank & Abhay, 2013). Fraksi etil asetat mengandung senyawa-senyawa flavonoid tersebut lebih banyak

dan terkonsentrat dalam dosis uji dibandingkan dosis uji ekstrak etanol yang masih mengandung banyak senyawa lainnya (Zakaria *et al.*, 2016). Senyawa-senyawa flavonoid tersebut berkontribusi memberikan aktivitas menghambat jalur-jalur apoptosis sel β pankreas, menurunkan stres oksidatif, meningkatkan produksi insulin, meningkatkan aktivitas enzim antioksidan dan merangsang proliferasi sel β (Ramachandran & Baojun, 2015).

DAFTAR PUSTAKA

- Abunasef SK, Amin HA, Abdel-Hamid GA. 2014. A histological and immunohistochemical study of beta cells in streptozotocin diabetic rats treated with caffeine. *Folia Histochemica Et Cytobiologica* 52(1):42-50.
- [ADA]. 2012. Standar of medical care in diabetes-2012. *American Diabetes Association Journal*. Vol. 35.
- Alam Md N, Bristi NJ, Rafiquzzaman Md. 2012. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Study pharmaceutical Journal* 21:143-152.
- Arisman. 2011. *Obesitas, Diabetes Millitus dan Dislipidemia Konsep, Teori dan Penanganan Aplikatif*. Jakarta: EGC.
- Bahmani M, Golshahi H, Saki K, Rafieian-Kopaei M, Delfan B, Mohammadi T. 2014. Medicinal plants and secondary metabolites for diabetes mellitus control. *Asian Pac J Trop Dis*; 4(Suppl 2): S687-S692.
- Bennet PN, Brown MJ. 2008. *Clinic pharmacology*. Churchill livingstone: elsevier.
- Birhen E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal* 5:9-19.
- Brereton MF, Iberl M, Shimomura K, Zhang Q, Spiliotis II, Dace W, Mattis KK, Ramracheya R, Gribble FM, Reimann F, Clark A, Rorsman P, Ashcroft FM. Reversible changes in pancreatic islet structure and function produced by elevated blood glucose. *Nature Communication* 5 (4639):1-11.
- Cheng V, Kashyap SR. 2010. Weight consideration in pharmacotherapy for type 2 diabetes. *Journal of Obesity* 2011:1-9.
- Chrissman JW. 2004. Best practices guideline: toxicologic histopathology. *Society of toxicologic pathology guideline*. 32(1): 126-131.
- Das S dan Barma G. 2012. Antidiabetic and antihyperlipidemic effect of ethanolic extracts of *Punica granatum* in Alloxan-induced non-insulin-dependent diabetes mellitus albino rats. *Indian Journal of Pharmacology*. 44(2): 219-224.
- [DepKes]. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hlm 5-10.
- [Depkes]. 1994. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia (III)*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Depkes RI.
- DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM. 2008. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. Seventh Edition. New York: McGraw-Hill.

Eleazu CO, Eleazu KC, Chukmuwa S, Essien UN. 2013. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to human. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders* 12.

Erejuwa O et al. 2010. Antioxidant protective effect of glibenclamide and metformin in combination with honey in pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. J. Mol. Sci.* 11:2056-2066.

Esterbauer H, Cheeseman KH. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods In Enzymology* 186:407-421.

Evans WC. 2009. *Pharmacognosy*. Ed ke-16. United States: Saunders.

Fasce CF, Rej R, Pinnataro AJ. 1972. A study of the direct o-toluidine blood glucose determination. *Clinical Chimica Acta*.

Fuchs-Tarlovsky V. 2013. Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutrition* 29 (2013) 15–21.

Ghasemi A, Khalifi S, Jedi S. 2014. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (Review). *Acta Physiologica Hungaria* 101 (4):408-420.

Giacco F, Brownlee M. 2010. Oxidative stress and diabetic complication. *Circulation Research* 107:1058-1070.

Graff KM van de. 1984. *Human Anatomy*. Dubuque, Iowa: Wm. C. Brown Publisher. Hlm 546-547.

Guardado-Mendoza R, Prioletta A, Jiménez-Ceja Lilia, Sosale A, Folli F. 2014 The role of nateglinide and repaglinide, derivatives of meglitide, in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Sci* 5:936—943.

Gunawan D, Mulyani S. 2004. *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi)*. Jilid ke-1. Yogyakarta: Penebar Swadaya. hlm 9.

Gunawan SG, Setiabudy R, Nafrialdi, Elysabeth. 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi ke-5. Jakarta: Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

Guyton AC. 1990. *Fisiologi Manusia dan Mekanisme Penyakit*. Edisi ke-3. Adrianto P, penerjemah; Jakarta: EGC. Hlm 699-702.

Guzik TJ dan Harrison DG. 2006. Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. *Drug Discovery Today* 11.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free Radical in Biology and Medicine*, 3th ed. New York : Oxford University Press. P : 639-45.

Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia*. Edisi II. Bandung: Institut Teknologi Bandung.

- Hussein MA. 2011. Anti-obesity, antiatherogenic, anti-diabetic and antioxidant activities of *J. montana* ethanolic formulation in obese diabetic rats fed high-fat diet. *Free Radicals and Antioxidants*. Vol 1, Issue 1.
- Ikawati Z., 2008, Pengantar farmakologi molekuler, Gadjah mada University Press, 25-26.
- Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. 2005. *Oxidative Stress and The Use of Antioxidant in Diabetes*. Lingking Basic Science to Clinical practice. Biomed Central.
- Joseph LE, Ira DG, Betty AM, Gerold MG. 2003. Are oxidatif stress-activated signaling pathway mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction?. *Diabetes* 52:1-8.
- Kaneda N *et al.* 1991. New cytotoxic flavonoids from *Muntingia calabura* roots. *Journal of Natiral Products* 54:196-206.
- Kaneto H.1999. Beneficial effects of antioxidants in diabetes. *Diabetes*: 2398-2405.
- Karunakaran U, Park KG. 2013. A systematic review of oxidative stress and safety of antioxidant in diabetes: focus on islets and their defense. *Diabetes & Metabolism Journal* 37:106-112.
- Katzung BG. 2012. *Farmakologi Dasar & klinik Edisi ke-10*. Aryandhito WN, Leo R, Linda D, penerjemah; Windriya KN *et al.*, editor. EGC: 704-717.
- [KEMENKES RI]. 2014. Situasi Dan Analisis Diabetes. *INFODATIN*. Hal: 1-4
- Krishnaveni K, Dhanalaksmi R. 2014. Qualitative and quantitative study of phytochemicals in *Muntingia calabura* L. Leaf and fruit. *World Journal of Pharmaceutical Research* 3:1687-1696.
- Kumar S, Jyotirmayee, Sarangi M. 2012. Thin layer chromatography: a tool of biotechnology for isolation of bioactive compounds from medicinal plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 18:126-132.
- Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. 2007. *Robbins Buku Ajar Patologi*. Ed-7, Vol 2. Prasetyo A, Penerjemah; Asroruddin M, Hartanto H, Darmaniah Nurwany, editor. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. Terjemahan dari: *Robbins Phatologic Basic of Diasease*.
- Kuo WL, Liao HR, Chen JJ. 2014. Biflavans, flavonoids and a dihydrochalcone from the stem wood of *Muntingia calabura* and their inhibitory activities on neutrophil pro-inflammatory responses. *Molecules* 19:20521-20535.
- Lakhanpal P, Rai DK. 2007. Quercetin: a versatile flavonoid. *Internet Journal Of Medical Update* 2(2):22-37.
- Lawrence GHM. 1951. *Taxonomy of Vascular Plant*. New York: Macmillan.

- Lukacinova A, Mojzis J, Benacka R, Racz O, Ništár F. 2008. Structure-activity relationships of preventive effects of flavonoids in alloxan-induced diabetes mellitus in rats. *Journal of Animal and Feed Sciences* 17 : 411–421.
- Marella S. 2017. Flavonoids-the most potent poly-phenols as antidiabetic agents: an overview. *Crimson Publisher*.
- Merck. 1987. *Buku Pedoman Kerja Kimia Klinik*. Jakarta: EGC.
- Muntiha M. 2001. Teknik pembuatan preparat histopatologi dari jaringan hewan dengan pewarnaan hematoxilin dan eosin (H&E). *Temu Tekhnis Fungsional Non Peneliti*.
- Modi P. 2007. Diabetes beyond insulin: Review of the drugs for treatment of diabetes mellitus. *Current Drug Discoveries Technologies* 4:39-47
- Mohammed MT, Kadhim SM, Jassimand AMN, Abbas SI. 2015. Free radicals and human health. *International Journal of Innovation Sciences and Research* 4(6):218-223.
- Morton JF. 2013. *Fruits of Warm Climates*. United States: Echo Point Books & Media.
- Notoatmodjo S. 2002. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Nugroho AE. 2006. Hewan percobaan diabetes mellitus: patologi dan mekanisme aksi diabetogenik. *Biodiversitas* 7 : 378-382.
- Nurdiana NP, Setyawati, Ali M. 1998. Efek streptozotocin sebagai bahan diabetogenik pada tikus wistar dengan cara pemberian intraperitoneal dan intravena. *Majalah Kedokteran Unibraw* 14: 66-77.
- Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. 2012. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Medical journal*.27(4):269-273.
- Papanas N, Maltezos E. 2009. Metformin: a review of its use in the treatment of type 2 diabetes. *Libertas Academica* 2009:1367-1381.
- Pinent M, Castell A, Baiges I, Montagut G, Arola L, Ardévol A. 2008. Bioactivity of flavonoids on insulin-secreting cells. *Comprehensive Review In Food Science and Food Safety* 7:299-308.
- Purwanti S. 2012. *antihyperlipidemic effect of 70% Ethanol extract of Ridged Gourd Fruit (Luffaacutangula (L) Roxb) in induces high cholesterol and lipid diet male rate*. FMIPA. UI.
- Pramono VJ, Santoso R. 2014. Pengaruh ekstrak buah kersen (*Muntingia calabura*) terhadap kadar gula darah tikus putih (*Rattus novergicus*) yang diinduksi streptozotocin (STZ). *Jurnal Sain Veteriner* 32(2):218-223.

- Price SA, Wilson L Mc C. 2006. *Patologis Konsep Klinik Proses-Proses penyakit*. Ed-6. Dharma A, penerjemah; Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. Terjemahan dari: *Pathophysiology Clinical Concepts and Disease Processes*.
- Qader SW, Abdulla MA, Chua LS, Najim N, Zain MM dan Hamdan S. 2011. Antioxidant, total phenolic content and cytotoxicity evaluation. *Molecules*, 16, 3433-3443; doi:10.3390/molecules16043433.
- Rahayu L, Damayanti R, Thamrin. 2006. Gambaran histopatologi pankreas tikus hiperglikemia setelah mengkonsumsi k-Karagenan dan i-Karagenan. *Ilmu Kefarmasian Indonesia* 4: 96-101.
- Rahbani-Nobar ME, Rahimi-Pour A, Rahbani-Nobar M, Adi-Beig F, Mirhashemi SM. 1999. Total antioxidant capacity, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in diabetic patients. *Medical Journal of Islamic Academy of Sciences*. Vol. 12(4):109-14.
- Rains JL, Jain SK. 2011. Oxidative stress, insulin signaling and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 50(5):567-575.
- Rakhmi RS. 2008. Pengaruh ekstrak etanol daun *Muntingia calabura* L. terhadap kadar glukosa darah mencit (*Mus musculus* L.) *Swiss Webster* jantan dewasa yang dikondisikan [Skripsi]. Bandung: Institut Teknologi Bandung
- Runiana EDIP. 2009. distribusi sel insulin pankreas pada tikus hierglikemia yang diberi diet tempe [Skripsi]. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian.
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Salem KA, Kosanovic M, Qureshia A, Ljubisavljevic M, Howartha F.C. 2009. The direct effects of streptozotocin and alloxan on contractile function in rat heart. *Pharmacological Research* 59 (2009) 235–241.
- Sanberg AA, Philip Dh. 2008. Interaction of exocrine and endocrine pancreatic disease. *J. Pancreas* 9: 541- 575.
- Sarma AD, Mallick AR, Ghosh AK. 2010. Free radical and their role in different clinical condition: An overview. *IJPSR* 1(3):185-192.
- Setiawan B, Suhartono E. 2005. Stres oksidatif dan peran antioksidan pada diabetes melitus. *Majalah Kedokteran Indonesia*. Vol. 55(2):86-91.
- Sherwood L. 2011. *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem*. Pendit BU, penerjemah; Yesdelita N, editor. Jakarta: EGC. Hlm 780-791.
- Smith JB, Mangkoewidjojo S. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Jakarta: UI Press. hlm 37-38.

- Sridhar M, Thirupathi K, Chaitanya G, Kumar BR, Mohan BK. 2011. Antidiabetic effect of leaves of *Muntingia calabura* L., in normal and alloxan-induced rats. *Pharmacology online* 2: 626-632.
- Sugiyanto. 1995. *Penuntun Praktikum Farmakologi*. Edisi IV. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Suharmiati. 2003. Pengujian bioaktifitas anti diabetes melitus tumbuhan obat. *Cermin Dunia Kedokteran*. No.140.
- Sunarni T, Suwidjiyo P, Ratna A. 2007. Flavonoid antioksidan penangkap radikal dari daun kepel (*Stelechocarpus Burahol* (Bl.) Hook F. & Th). *Majalah Farmasi Indonesia* 18(3): 111-116.
- Studiawan H, Santosa MH. 2005. Uji aktivitas penurunan kadar glukosa darah ekstrak daun *Eugenia polyantha* pada mencit yang diinduksi aloksan. *Media Kedokteran Hewan* 21: 62-65.
- Suarsana IN, Priosoeryanto BP, Bintang M, Wresdiyati T. 2010. Profil glukosa darah dan ultrastruktur sel beta pankreas tikus yang diinduksi senyawa aloksan. *JITV* 15: 118-123.
- Szkudelski T. 2001. The mechanisms of alloxan and streptozotosin action in β cells of rat pancreas. *J Physiol Res* 50: 537-546.
- Tandri TH, Lestariana W, Nisa FZ. 2009. Ekstrak air daun ceplukan (*Ruellia tuberosa* L.) serta pengaruhnya terhadap kadar glukosa darah dan gambaran histologis pankreas tikus (*Rattus novergicus*) diabetes melitus. *Jurnal Gizi Klinik Indonesia* 6(2):64-70.
- Tiwari BK, Pandey KB, Abidi AB, Rizvi SB. 2013. Markers of oxidative stress during diabetes mellitus. *Journal Of Biomarkers*.
- Tjitrosoepomo G. 1985. *Morfologi Tumbuhan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Tjitrosoepomo G. 1991. *Taxonomi Tumbuhan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Tripathi V, Verma J. 2014. Different model used to induce diabetes: a comprehensive review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6(6):29-32.
- Tyler VE, Brady LR, Robbers JE. 1988. *Pharmacognosy*. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Ueno Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa T. 2002. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *J Nutr*. 132:897-900.

- Utama RP. 2011. Uji aktivitas anti diabetes fraksi etil asetat daun kersen (*Muntingia calabura* L.) pada mencit diabetes akibat induksi aloksan [skripsi]. Jember: Fakultas Farmasi, Universitas Jember.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. 2007. Review: free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Inter J Biochem Cell Biol.*39:44–84.
- Verdayanti TE. 2009. Uji efektifitas jus buah kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap penurunan kadar gula darah pada tikus putih (*Rattus novergicus*) [skripsi]. Malang: Universitas Muhammadiyah Malang.
- Voigt R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. diterjemahkan oleh Soendani Noerono. Edisi ke-5. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Wang CY, Liao JK. 2012. A Mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Method Mol. Biol.* 821:421-433.
- Weidinger A, Kozlov AV. 2015. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules* 5:472-282.
- Widowati W. 2008. Potensi antioksidan sebagai antidiabetes. *Jurnal Kedokteran Maranatha* 7(2).
- Winarsi H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas: Potensi dan Aplikasi dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Wresdiyati T, Astawan M, Hastanti LY. 2006. Profil imunohistokimia superoksida dismutase (SOD) pada jaringan hati tikus dengan kondisi hiperkolesterolemia. *Hayati*, hlm. 85-89.
- Yadav DB, Aruna SM, Chandrashekar A. 2013. Antioxidant and *in vivo* anti-hyperglycemic activity off *Muntingia calabura* leaves extract. *Der Pharmacia Lettre* 5(3):427-435.
- Yasunaka K *et al.* 2005. Antibacterial activity of crude extracts from mexican medicinal plants and purified coumarins and xantones. *Journal Ethnopharmacol* 97:293-299.
- Yoo EH, Lee SY. 2010. Glucose biosensor: an overview of use in clinical practice. *Sensors* 10:4558-4576.
- Yuriska AF. 2009. Efek Aloksan Terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Wistar [KTI]. Semarang: Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro.
- Zakaria ZA *et al.* 2014. *Muntingia calabura*: A review of its traditional uses, chemical properties and pharmacological observations. *Pharmaceutical Biology*.

Zakaria ZA *et al.* 2016. Mechanism(s) of action underlying the gastroprotective effect of ethyl acetate fraction obtained from crude methanolic leaves extract of *Muntingia calabura*. *BMC Complementary and alternative medicine* 2016 16:78.

Lampiran 1. Determinasi tanaman kersen



UNIVERSITAS GADJAH MADA
FAKULTAS FARMASI
 Sekip Utara, Yogyakarta 55281 Telp./Fax. +62 274 543120
 http://farmasi.ugm.ac.id, E-mail: farmasi@ugm.ac.id

SURAT KETERANGAN

No.: UGM/FA/812 /M/03/02

Kepada Yth. :
Sdri/Sdr. Septian Maulid W
NIM. SBF 051310060
Fakultas Farmasi USB
Di Surakarta

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi sampel daun yang Saudara kirimkan ke Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM, adalah :

No.Pendaftaran	Jenis	Suku
06	<i>Muntingia calabura</i> L.	Elaeocarpaceae

Demikian, semoga dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Mengetahui,
 Dekan



Prof. Dr. Agung Endro Nugroho, M.Si., Apt

Yogyakarta, 12 Februari 2018
 Ketua Departemen Biologi Farmasi

Dr. Indah Purwantini, M.Si., Apt

Lampiran 2. Surat keterangan pembuatan preparat pankreas

KEMENTERIAN RISTEK DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS SEBELAS MARET SURAKARTA
FAKULTAS KEDOKTERAN
BAGIAN PATOLOGI ANATOMI
Jl. Ir. Sutami 36A. Surakarta. Telp. (0271) 632494, Fax. (0271) 632494

SURAT KETERANGANNo. ...65.../UN27.6.6.2.2/PP/2017

Bersama ini kami menerangkan bahwa :

Nama : Septian Maulid Wicahyo
NIM : SBF051310060

Telah selesai melakukan pembuatan preparat di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas 11 Maret Surakarta dengan judul "Aktivitas Antihiperqlikemia, Antioksidasi, dan Regenerasi Sel β Pankreas dari Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Kersen (*Mimtingia calabura*) pada Tikus Diabetes yang Diinduksi Streptozotosin"

Demikian surat keterangan ini dibuat agar dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Surakarta,
Kepala



Prof. Dr. dr. Ambar Mudigdo, SpPA(K)

Lampiran 3. Hasil pembuatan ekstrak maserasi daun kersen

Rendemen ekstrak etanol Daun Kersen

Berat Serbuk (gram)	Berat Ekstrak (gram)	Randemen (%)
500	92	18,4 %
500	89,5	17,9 %
500	91	18,2 %
Rata-rata		18 %

$$\begin{aligned} \text{Rendemen ekstrak} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat serbuk}} \times 100 \% \\ \text{Maserasi I} &= \frac{92 \text{ gram}}{500 \text{ gram}} \times 100 \% \\ &= 18,4 \% \\ \text{Maserasi II} &= \frac{89,5 \text{ gram}}{500 \text{ gram}} \times 100 \% \\ &= 17,9 \% \\ \text{Maserasi II} &= \frac{91 \text{ gram}}{500 \text{ gram}} \times 100 \% \\ &= 18,2 \% \\ \text{Rata-rata rendemen} &= 18 \% \end{aligned}$$

Lampiran 4. Perhitungan dosis glibenklamid

Berat badan hewan uji	Dosis
178	0,080
181	0,081
186	0,084
184	0,083
182	0,082
186	0,084

Contoh perhitungan :

$$\begin{aligned} \text{Dosis glibenklamid} &= 5 \text{ mg} / 70 \text{ kg bb manusia} \times 0,018 \\ &= 0,09 \text{ mg} / 200 \text{ g bb tikus} \\ &= 0,45 \text{ mg} / \text{kg bb tikus} \\ \text{Rumus perhitungan dosis} &= \frac{\text{bb}}{1000} \times \text{dosis glibenklamid} \\ &= \frac{186}{1000} \times 0,45 \\ &= 0,084 \text{ mg} \end{aligned}$$

Lampiran 5. Perhitungan dosis terhadap hewan uji

Kelompok	Berat badan hewan uji (g)	Dosis (mg)
Ekstrak etanol dosis 250 mg/Kg bb	184	46
	203	50,75
	189	47,25
	175	43,75
	179	44,75
	191	47,75
Ekstrak etanol dosis 350 mg/Kg bb	190	66,50
	188	65,80
	180	63
	193	67,55
	180	63
	187	65,45
Fraksi etil asetat dosis 250 mg/kg bb	175	43,75
	183	45,75
	188	47
	175	43,75
	190	47,50
	185	46,25
Fraksi etil asetat dosis 350 mg/kg bb	180	63
	195	68,25
	184	64,40
	178	62,30
	180	63
	198	69,30

Rumus perhitungan dosis = $\frac{\text{berat badan}}{1000} \times \text{dosis 250 mg}$

Rumus perhitungan dosis = $\frac{\text{berat badan}}{1000} \times \text{dosis 350 mg}$

Dari perhitungan rumus tersebut diperoleh dosis untuk masing-masing hewan uji seperti terlihat pada tabel diatas.

Lampiran 6. Pengolahan data perubahan berat badan tikus

Kel	Rata-rata bb tikus (g) hari ke 0-18 perlakuan ekstrak					Kenaikan Δ
	0	Hari ke-1 (T1)	Hari ke-4 (T2)	Hari ke-11 (T3)	Hari ke-18 (T4)	T4-T1 %
I	180,3 ± 4,4	186,2 ± 4,7	190,6 ± 5,2	197,8 ± 7,1*	205 ± 5,2*	13,6
II	183 ± 5,3	189,5 ± 5,8	186,6 ± 5,7	183,7 ± 5,7	180 ± 5	-1,6
III	180,5 ± 3	186 ± 3,4	183,1 ± 3,3	190,3 ± 3,3	197,8 ± 3,5	9,6
IV	183,7 ± 8,7	189,3 ± 8,1	186,8 ± 9	189,8 ± 9	192,1 ± 8,8*	4,6
V	182,3 ± 5	188 ± 4,5	186,3 ± 4,8	191 ± 4,8	197,1 ± 5,4*	8,1
VI	178,3 ± 5,7	185,1 ± 5,9	182,6 ± 5,8	188 ± 5,8	192,6 ± 6,3*	8
VII	181,3 ± 8,5	187,1 ± 7,8	185,8 ± 7,8	193,8 ± 7,8	200,3 ± 7*	10,4

Keterangan :

I = kelompok normal

II = kelompok kontrol negatif

III = kelompok kontrol positif

IV = kelompok ekstrak etanol daun kersen dosis 250 mg/Kg bb

V = kelompok ekstrak etanol daun kersen dosis 350 mg/Kg bb

VI = kelompok fraksi etil asetat daun kersen dosis 250 mg/kg bb

VII = kelompok fraksi etil asetat daun kersen dosis 350 mg/kg bb

nilai minus menandakan terjadinya penurunan berat badan (%)

*nilai menunjukkan berbeda signifikan ($p < 0,05$) pada kelompok II

$$\text{Kelompok X} = \frac{\text{Perubahan BB}}{\text{BB T}_2} \times 100 \%$$

$$\begin{aligned} \text{Kelompok I} &= \frac{24,7}{180,3} \times 100 \% \\ &= 13,6 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kelompok V} &= \frac{14,8}{182,3} \times 100 \% \\ &= 8,1 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kelompok II} &= \frac{-3}{183} \times 100 \% \\ &= -1,6 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kelompok VI} &= \frac{14,3}{178,3} \times 100 \% \\ &= 8 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kelompok III} &= \frac{17,3}{180,5} \times 100 \% \\ &= 9,6 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kelompok VII} &= \frac{19}{181,3} \times 100 \% \\ &= 10,4 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kelompok IV} &= \frac{8,4}{183,7} \times 100 \% \\ &= 4,6 \% \end{aligned}$$

Lampiran 7. Pembuatan larutan stok ekstrak etanol dan fraksi etil asetat untuk satu hari perlakuan

Diketahui:

Volume pemberian tikus 1 mL/ 200 g bb tikus

Total bobot ekstrak etanol uji dosis 250 mg/ kg bb adalah 280,25 mg/ hari

Total bobot ekstrak etanol uji dosis 350 mg/ kg bb adalah 391,30 mg/ hari

Total bobot fraksi etil asetat dosis 250 mg/ kg bb adalah 274 mg/ hari

Total bobot fraksi etil asetat dosis 350 mg/ kg bb adalah 390,25 mg/ hari

maka

Kelompok	Berat badan hewan uji (g)	Volume pemberian (mL)
Ekstrak etanol dosis 250 mg/Kg bb	184	1,84
	203	2,03
	189	1,89
	175	1,75
	179	1,79
	191	1,91
Ekstrak etanol dosis 350 mg/Kg bb	190	1,90
	188	1,88
	180	1,80
	193	1,93
	180	1,80
	187	1,87
Fraksi etil asetat dosis 250 mg/kg bb	175	1,75
	183	1,83
	188	1,88
	175	1,75
	190	1,90
	185	1,85
Fraksi etil asetat dosis 350 mg/kg bb	180	1,80
	195	1,95
	184	1,84
	178	1,78
	180	1,80
	198	1,98

Dari data perhitungan volume didapatkan:

Volume total kelompok ekstrak etanol 250 mg/ kg bb adalah 11,21 mL/ hari

Volume total kelompok ekstrak etanol 350 mg/kg bb adalah 11,18 mL/ hari

Volume total kelompok fraksi etil asetat 250 mg/kg bb adalah 10,96 mL/ hari

Volume total kelompok fraksi etil asetat 350 mg/ kg bb adalah 11,15 mL/ hari

Konsentrasi larutan stok = *total bobot ekstrak/volume total pemberian*

Kelompok ekstrak 250 mg/ kg bb = $280,25/11,21 = 25 \text{ mg/ mL}$

Kelompok ekstrak 350 mg/ kg bb = $391,30/11,18 = 35 \text{ mg/ mL}$

Kelompok fraksi 250 mg/ kg bb = $274/10,96 = 25 \text{ mg/ mL}$

Kelompok fraksi 350 mg/ kg bb = $390,25/11,15 = 35 \text{ mg/ MI}$

Maka:

Pembuatan larutan stok satu hari untuk kelompok ekstrak 250 mg/ kg bb dengan mensuspensikan 287,5 mg ekstrak etanol ke dalam 11,5 mL Na CMC 0,5 %

Pembuatan larutan stok satu hari untuk kelompok ekstrak 350 mg/ kg bb dengan mensuspensikan 402,5 mg ekstrak etanol ke dalam 11,5 mL Na CMC 0,5 %

Pembuatan larutan stok satu hari untuk kelompok fraksi 250 mg/ kg bb dengan mensuspensikan 287,5 mg fraksi etil asetat ke dalam 11,5 mL Na CMC 0,5 %

Pembuatan larutan stok satu hari untuk kelompok fraksi 350 mg/ kg bb dengan mensuspensikan 402,5 mg fraksi etil asetat ke dalam 11,5 mL Na CMC 0,5 %

Lampiran 8. Perhitungan kadar glukosa darah dengan GOD-PAP

dik

Kelompok	Kode hewan	Standar	Absorbansi	kadar	Kadar rata-rata \pm SD
I	I.1	0,244	0.162	66,39	69,47 \pm 2,25
	I.2		0.165	67,62	
	I.3		0.179	73,36	
	I.4		0.17	69,67	
	I.5		0.173	70,90	
	I.6		0,168	68,85	

Konsentrasi standar 100 mg/ dL (5.55 mmol/ L)

Rumus perhitungan kadar gula darah:

$$\text{Kadar gula darah} = \left(\frac{\text{abs. sampel}}{\text{abs. standar}} \right) \times \text{konsentrasi standar}$$

Contoh:

$$\text{Kadar gula darah I.1} = (0,162 / 0,244) \times 100 = 66,39 \text{ mg/ dL}$$

Lampiran 9. Hasil perhitungan rata-rata kadar glukosa darah

Tabel Rata-rata kadar glukosa darah tikus T1 – T4 beserta persen nilai (%) penurunan kadar glukosa darah.

Kel	Kadar glukosa (mg/dl)± SD				% Penurunan
	T1	T2	T3	T4	
I	69,47 ± 2,25	70,14 ± 2,2	70,92 ± 2,1*	71,49 ± 2,3*	-
II	70,49 ± 2,22	221,04 ± 5,2	222,24 ± 4,7	223,69 ± 4,9	-1,46
III	71,17 ± 3,02	219,05 ± 3,5	193,82 ± 4*	142,97 ± 4*	51,45
IV	68,72 ± 1,3	222,59 ± 3,9	200,42 ± 2,4	175,30 ± 1,9*	30,73
V	68,99 ± 2,8	219,18 ± 2	196,7 ± 2,4*	159,64 ± 2,8*	39,64
VI	71,24 ± 3,1	223,42 ± 2,9	198,56 ± 2,4*	161,11 ± 2,2*	40,94
VII	72,88 ± 2,76	222,33 ± 1,8	196,94 ± 2*	149,46 ± 2,2*	48,75

Keterangan :

I = kelompok normal

II = kelompok kontrol negatif

III = kelompok kontrol positif glibenklamid 0,45 mg/kg bb tikus

IV = kelompok ekstrak etanol daun kersen dosis 250 mg/kg bb

V = kelompok ekstrak etanol daun kersen dosis 350 mg/kg bb

VI = kelompok fraksi etil asetat daun kersen dosis 250 mg/kg bb

VII = kelompok fraksi etil asetat daun kersen dosis 350 mg/kg bb

T1 = hari ke-1

T2 = hari ke-4, 3 hari setelah induksi streptozotosin

T3 = hari ke-11, 1 minggu setelah perlakuan

T4 = hari ke 18, 2 minggu setelah perlakuan

Nilai minus menunjukkan peningkatan kadar gula darah

* menunjukkan berbeda signifikan ($p < 0,05$) pada kelompok II.

Dari tabel data kadar glukosa darah diatas, dapat dihitung presentase penurunan kadar glukosa dengan rumus :

$$\text{Rumus perhitungan} = \frac{(\text{kadar glukosa T2} - \text{kadar hari ke-n})}{(\text{kadar glukosa T2} - \text{kadar glukosa T1})} \times 100 \%$$

Dari rumus diatas, diperoleh hasil perhitungan persen penurunan sebagai berikut :

Kelompok	Persen kadar glukosa darah (%)	
	Minggu I	Minggu II
Normal	0	0
Kontrol negatif	-0,79	-1,46
Kontrol positif	17,06	51,45
Ekstrak dosis 250 mg	14,4	30,73
Ekstrak dosis 350 mg	14,96	39,64
Fraksi etil asetat 250 mg	16,33	40,94
Fraksi etil asetat 350 mg	16,98	48,75

Lampiran 10. Perhitungan AUC data darah tikus T1-T4

Kelompok	Hewan	Perhitungan AUC				Rata-rata AUC total ± SD
		Hari ke 1-4	Hari ke 4-11	Hari ke 11-18	AUC total	
I	I.1	199,78	470,47	477,05	1147,31	1201,57 ± 38,41
	I.2	205,68	488,74	491,48	1185,92	
	I.3	221,24	521,32	526,12	1268,70	
	I.4	209,91	493,96	496,81	1200,70	
	I.5	212,92	502,96	511,54	1227,43	
	I.6	206,95	484,87	487,56	1179,39	
II	II.1	442,01	1590,18	1598,14	3630,34	3549,57 ± 76,14
	II.2	442,98	1561,56	1568,98	3573,52	
	II.3	435,59	1519,70	1530,41	3485,72	
	II.4	432,85	1539,33	1547,66	3519,84	
	II.5	447,43	1596,75	1606,28	3650,48	
	II.6	422,93	1501,43	1513,17	3437,54	
III	III.1	429,19	1446,07	1186	3061	3059 ± 54,61
	III.2	436,32	1463,08	1200	3100	
	III.3	440,55	1460,75	1187	3088	
	III.4	437,59	1473,06	1215	3125	
	III.5	433,52	1396,56	1133	2963	
	III.6	434,80	1430,77	1152	3018	
IV	IV.1	438,06	1472,17	1299,67	3209,91	3232,5 ± 39,9
	IV.2	445,37	1521,77	1334,84	3301,99	
	IV.3	431,55	1463,97	1305,15	3200,67	
	IV.4	441,64	1492,59	1332,90	3267,15	
	IV.5	428,69	1458,38	1300,64	3187,71	
	IV.6	436,39	1474,23	1316,92	3227,55	
V	V.1	430,09	1432,74	1222,71	3085,5	3135,09 ± 37,27
	V.2	429,16	1457,49	1249,36	3136,02	
	V.3	425,58	1442,11	1228,19	3095,88	
	V.4	430,86	1466,67	1257,35	3154,90	
	V.5	440,55	1479,63	1277,56	3197,7	
	V.6	437,22	1454,79	1247,96	3139,97	
VI	VI.1	432,12	1464,06	1257,50	3153,70	3177,79 ± 32,21
	VI.2	445,40	1469,75	1249,51	3164,66	
	VI.3	437,80	1452,36	1241,37	3131,54	
	VI.4	437,23	1492,87	1282,74	3212,85	
	VI.5	449,35	1484,52	1246,55	3180,42	
	VI.6	450,07	1498,09	1275,42	3223,59	

kelompok	hewan	Perhitungan AUC				Rata-rata AUC total ± SD
		Hari ke-1 - 4	Hari ke-4 - 11	Hari ke-11 - 18	AUC total	
VII	VII.1	444,96	1459,21	1210,59	3114,77	3122,69 ± 26,94
	VII.2	438,31	1451,38	1198,38	3088,08	
	VII.3	442,87	1473,71	1219,84	3136,43	
	VII.5	448,51	1473,43	1213,78	3135,73	
	VII.6	439,69	1490,35	1236,65	3166,70	

Perhitungan nilai AUC menggunakan metode trapezoidal dengan rumus

$$AUC_{T_{n+1}-T_n} = (\text{Kadar gula } T_{n+1} + \text{kadar gula } T_n) / 2 \times (T_{n+1} - T_n)$$

Contoh perhitungan

$$AUC_{T_2-T_1} = (66,80 + 66,39) / 2 \times (4-1)$$

$$AUC_{T_2-T_1} = 199,78 \text{ mg h/dL}$$

AUC dihitung dari data pada lampiran 10 – lampiran 30 per satu tikus.

Lampiran 11. Penentuan aktivitas enzim antioksidan SOD dan GPx dan kadar MDA

Perhitungan aktivitas SOD

Standar = 1. 0,149
2. 0,033
3. 0,098

$$\text{Rumus Perhitungan \% SOD} = \frac{(A \text{ blank 1} - A \text{ blank 3}) - (A \text{ sampel} - A \text{ blank 2})}{(A \text{ blank 1} - A \text{ blank 3})} \times 100 \%$$

$$\text{Contoh (sampel 1.1)} = \frac{((0,051) - (0,044 - 0,033))}{(0,051)} \times 100 \% = 78,43 \%$$

Perhitungan aktivitas GPx

$$\text{Rumus perhitungan GPx} = \frac{(\text{Absorbansi} \times 1,2 \times 2 \times 1000 \times 1)}{(6,22 \times 0,22)} \times 100 \%$$

$$\begin{aligned} \text{Contoh (sampel I.1)} &= \frac{(0,931 \times 1,2 \times 2 \times 1000 \times 1)}{(6,22 \times 0,22)} \times 100 \% \\ &= 71,85 \text{ U/mg} \end{aligned}$$

Penentuan kadar MDA

Hasil pembacaan absorbansi larutan standar TEP

Bobot	Abs.
0,768	0,021
1,797	0,049
3,5	0,096
5,94	0,162
9,5	0,260

Maka persamaan regresi linier dari data tersebut adalah

$$\text{abs} = 0,0272 \text{ kons.} + 8,03 \times 10^{-5}$$

abs: absorbansi sampel

kons: kadar sampel (nmol/g)

Contoh perhitungan

$$\text{VII.4} \rightarrow \text{kons.} = (0,102 - 8,03 \times 10^{-5}) / 0,0272 = 3,74 \text{ nmol/g}$$

Lampiran 12. Hasil uji statistik kadar glukosa darah tikus T4

Oneway

independence var		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
gula_darah	kontrol normal	,230	6	,200*	,929	6	,576
	kontrol negatif	,167	6	,200*	,952	6	,756
	kontrol positif	,274	6	,178	,880	6	,270
	ekstrak etanol 250	,140	6	,200*	,978	6	,941
	ekstrak etanol 350	,160	6	,200*	,963	6	,844
	fraksi etil asetat 250	,149	6	,200*	,937	6	,638
	fraksi etil asetat 350	,143	6	,200*	,980	6	,953

a. Lilliefors Significance Correction

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

Uji diatas menunjukkan bahwa data kadar glukosa darah tiap kelompok terdistribusi normal (sig. > 0,05)

Test of Homogeneity of Variances

gula_darah

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,488	6	35	,041

Tabel ini menunjukkan bahwa varian pada data glukosa darah T4 memiliki varian yang berbeda. Hal tersebut mengakibatkan perlunya dikoreksi menggunakan uji berikut:

Robust Tests of Equality of Means

gula_darah

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	1086.403	6	15.448	.000
Brown-Forsythe	1073.279	6	22.403	.000

a. Asymptotically F distributed.

Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa analisis *Anova one way* bisa dilanjutkan.

ANOVA

gula_darah

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	74041,582	6	12340,264	1073,279	,000
Within Groups	402,420	35	11,498		
Total	74444,002	41			

Hasil dari uji *Anova one way* menunjukkan ada beda yang nyata antar kelompok. Uji lanjut menggunakan uji Games-Howell, karena menggunakan asumsi varian data kelompok tidak sama.

Post Hoc Tests: Multiple Comparisons (Games-Howell)

(I) independence var	(J) independence var	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol normal	kontrol negatif	-152,21333*	2,43367	,000	-161,8136	-142,6131
	kontrol positif	-71,49000*	2,07931	,000	-79,4327	-63,5473
	ekstrak etanol 250	-103,81667*	1,34304	,000	-108,7206	-98,9128
	ekstrak etanol 350	-88,15500*	1,64217	,000	-94,1562	-82,1538
	fraksi etil asetat 250	-89,62833*	1,41970	,000	-94,7772	-84,4795
	fraksi etil asetat 350	-77,98000*	1,42400	,000	-83,1436	-72,8164
kontrol negatif	kontrol normal	152,21333*	2,43367	,000	142,6131	161,8136
	kontrol positif	80,72333*	2,84532	,000	70,3296	91,1171
	ekstrak etanol 250	48,39667*	2,36137	,000	38,8022	57,9911
	ekstrak etanol 350	64,05833*	2,54343	,000	54,3508	73,7659
	fraksi etil asetat 250	62,58500*	2,40580	,000	52,9940	72,1760
	fraksi etil asetat 350	74,23333*	2,40834	,000	64,6419	83,8248
kontrol positif	kontrol normal	71,49000*	2,07931	,000	63,5473	79,4327
	kontrol negatif	-80,72333*	2,84532	,000	-91,1171	-70,3296
	ekstrak etanol 250	-32,32667*	1,99421	,000	-40,1864	-24,4670
	ekstrak etanol 350	-16,66500*	2,20677	,000	-24,8493	-8,4807
	fraksi etil asetat 250	-18,13833*	2,04662	,000	-26,0403	-10,2364
	fraksi etil asetat 350	-6,49000	2,04961	,120	-14,3952	1,4152
ekstrak etanol 250	kontrol normal	103,81667*	1,34304	,000	98,9128	108,7206
	kontrol negatif	-48,39667*	2,36137	,000	-57,9911	-38,8022
	kontrol positif	32,32667*	1,99421	,000	24,4670	40,1864
	ekstrak etanol 350	15,66167*	1,53298	,000	9,9372	21,3862
	fraksi etil asetat 250	14,18833*	1,29185	,000	9,4918	18,8849
	fraksi etil asetat 350	25,83667*	1,29657	,000	21,1213	30,5520
ekstrak etanol 350	kontrol normal	88,15500*	1,64217	,000	82,1538	94,1562
	kontrol negatif	-64,05833*	2,54343	,000	-73,7659	-54,3508
	kontrol positif	16,66500*	2,20677	,000	8,4807	24,8493
	ekstrak etanol 250	-15,66167*	1,53298	,000	-21,3862	-9,9372
	fraksi etil asetat 250	-1,47333	1,60057	,960	-7,3589	4,4122
	fraksi etil asetat 350	10,17500*	1,60439	,001	4,2793	16,0707
fraksi etil asetat 250	kontrol normal	89,62833*	1,41970	,000	84,4795	94,7772
	kontrol negatif	-62,58500*	2,40580	,000	-72,1760	-52,9940
	kontrol positif	18,13833*	2,04662	,000	10,2364	26,0403
	ekstrak etanol 250	-14,18833*	1,29185	,000	-18,8849	-9,4918
	ekstrak etanol 350	1,47333	1,60057	,960	-4,4122	7,3589
	fraksi etil asetat 350	11,64833*	1,37582	,000	6,6632	16,6334
fraksi etil asetat 350	kontrol normal	77,98000*	1,42400	,000	72,8164	83,1436
	kontrol negatif	-74,23333*	2,40834	,000	-83,8248	-64,6419
	kontrol positif	6,49000	2,04961	,120	-1,4152	14,3952
	ekstrak etanol 250	-25,83667*	1,29657	,000	-30,5520	-21,1213
	ekstrak etanol 350	-10,17500*	1,60439	,001	-16,0707	-4,2793
	fraksi etil asetat 250	-11,64833*	1,37582	,000	-16,6334	-6,6632

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

Lampiran 13. Hasil uji statistik aktivitas SOD hati tikus

Oneway

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol normal	6	77,1233	4,23408	1,72856	72,6799	81,5667	70,59	82,35
kontrol negatif	6	18,6283	5,64914	2,30625	12,6999	24,5567	11,76	25,49
kontrol positif	6	59,5100	6,58105	2,68670	52,6036	66,4164	50,98	68,83
ekstrak etanol 250	6	30,7167	4,23408	1,72856	26,2733	35,1601	25,49	37,25
ekstrak etanol 350	6	35,2933	5,11566	2,08846	29,9248	40,6619	29,41	43,14
fraksi etil asetat 250	6	38,7217	5,73932	2,34307	32,6986	44,7447	31,37	46,06
fraksi etil asetat 350	6	45,7533	4,23408	1,72856	41,3099	50,1967	39,22	50,98
Total	42	43,6781	18,82135	2,90420	37,8129	49,5432	11,76	82,35

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,749	6	35	,614

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13583,396	6	2263,899	84,243	,000
Within Groups	940,575	35	26,874		
Total	14523,972	41			

Homogeneous Subsets

SOD

independence var	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
kontrol negatif	6	18,6283				
ekstrak etanol 250	6		30,7167			
ekstrak etanol 350	6		35,2933			
fraksi etil asetat 250	6		38,7217	38,7217		
fraksi etil asetat 350	6			45,7533		
kontrol positif	6				59,5100	
kontrol normal	6					77,1233
Sig.		1,000	,135	,250	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

Lampiran 14. Kumpulan foto saat praktek

1



2



3



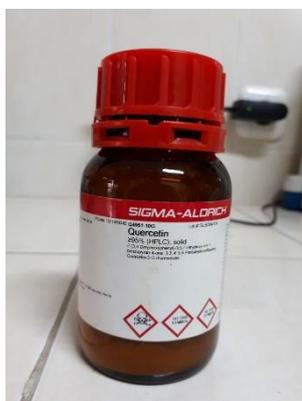
4



5



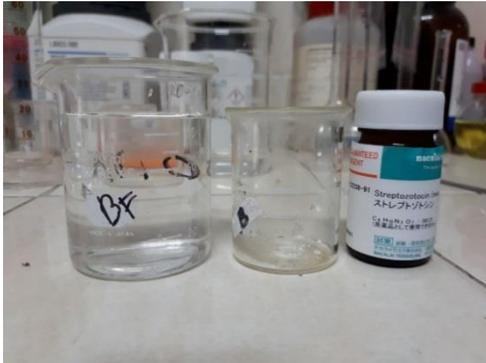
6



7



8



9



10



11



12



13



Keterangan foto:

1. Penimbangan berat badan tikus
2. Pemberian suspensi ekstrak kepada tikus secara oral
3. Pengambilan darah tikus melalui sinus orbital
4. Tikus yang teranestesi
5. Pembedahan tikus untuk pengambilan organ hati dan pankreas
6. Quercetin *Sigma Aldrich* untuk pembanding KLT
7. Pembuatan larutan nikotinamid
8. Pembuatan larutan streptozotocin
9. Biofuge *Heraeus*
10. Pipa kapiler
11. Timbangan analitik
12. *Hand Homogenizer* dan vortex
13. Darah yang akan disentrifuge

