

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi Bunga Pinang

Bunga pinang (*Areca catechu* L.) yang digunakan sebagai bahan penelitian ini dideterminasi terlebih dahulu dengan tujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang diambil serta menghindari terjadinya kesalahan dalam pengambilan bahan serta menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain. Determinasi tanaman pinang ini dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Data mengenai kebenaran hasil determinasi tanaman tersebut dapat dilihat pada hasil determinasi yang tertera di bawah ini dan pada Lampiran 1 :

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisio	: <i>Tracheophyta</i>
Classis	: <i>Liliopsida</i>
Ordo	: <i>Arecales</i>
Familia	: <i>Arecaceae</i>
Genus	: <i>Areca</i>
Species	: <i>Areca catechu</i> L.
Sinonim	: <i>Areca faufel</i> Gaertn., <i>Areca hortensis</i> Lour., <i>Areca catechu</i> Burm. f. <i>Sublimia areca</i> Comm. Ex Mart., <i>Areca himalayana</i> Griff. exH. Wendl. <i>Areca macrocarpa</i> Becc.
Nama lokal	: Pinang

B. Persiapan dan Pengeringan Simplisia Bunga Pinang

1. Persiapan dan pengeringan simplisia bunga pinang

Bunga pinang yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Sorong, Papua pada bulan April 2019. Bunga pinang yang diambil untuk penelitian ini adalah bunga yang masih berwarna hijau, tidak terlalu muda dan tua, segar, dan tidak terkontaminasi penyakit. Bunga pinang yang telah diambil kemudian dibersihkan dengan menggunakan air bersih dan mengalir untuk menghilangkan kotoran yang ikut bersama bunga pinang tersebut kemudian bunga pinang yang

sudah dicuci bersih tadi, selanjutnya ditiriskan dan dikeringkan di bawah sinar matahari yang dilapisi dengan kain berwarna hitam dengan tujuan untuk menghindari tumbuhnya mikroorganisme dan menjaga agar senyawa aktif di dalam bunga pinang tersebut tidak mengalami kerusakan. Hasil rendemen bunga kering terhadap bobot bunga basah bunga pinang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rendemen pengeringan bunga pinang.

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Rendemen (%)
10.000	2,313	23,13

Bunga pinang sebanyak 10 kg terlebih dahulu dikeringkan, sehingga mendapat persentase rendemen bobot kering terhadap bobot basah sebesar 20%. Pengeringan yang dilakukan memiliki tujuan untuk mengurangi kandungan air yang berlebih dalam sebuah simplisia yang dapat menimbulkan kerusakan pada suatu simplisia seperti tumbuhnya jamur pada simplisia yang disebabkan oleh kadar air yang melebihi batas maksimal kandungan air dalam suatu simplisia ($>10\%$). Pengeringan juga bertujuan untuk menjaga agar suatu simplisia dapat dipakai dalam jangka waktu yang panjang dan juga bisa mencegah terjadinya reaksi-reaksi kimia yang bisa terjadi di suatu simplisia, misalnya reaksi hidrolisis, oksidasi, dan polimerisasi yang dikarenakan jumlah kandungan air yang terkandung dalam simplisia tersebut terlalu tinggi (BPPTO 2015).

2. Pembuatan serbuk bunga pinang

Bunga pinang yang sudah dikeringkan selanjutnya dilakukan proses penyerbukan yang bertujuan untuk memperkecil ukuran partikel sehingga luas permukaan partikel-partikelnnya semakin bertambah dan proses ekstraksi dapat berlangsung lebih efektif dan optimal. Serbuk bunga pinang diayak menggunakan pengayak mesh no. 40, sehingga didapatkan ukuran partikel serbuk bunga pinang yang seragam.

Tabel 3. Hasil rendemen serbuk etanol bunga pinang.

No.	Bobot serbuk (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
1	540	50,2893	9,31

Pada perbandingan berat serbuk terhadap berat bunga kering didapatkan rendemen sebesar 9,31%. Hasil perhitungan berat serbuk terhadap berat ekstrak etanol bunga pinang dapat dilihat pada Lampiran 7 .

3. Penetapan kadar air serbuk bunga pinang

Serbuk bunga pinang ditimbang sebanyak 20 gram, kemudian diukur kadar airnya dengan alat *Sterling Bidwell* menggunakan pelarut toluen jenuh air. Persyaratan kadar air di dalam suatu ekstrak yaitu kurang dari 10%. Cairan pembawa yang digunakan adalah toluen jenuh air karena toluen adalah senyawa anhidrat yang bisa menyerap air yang dikandung dalam simplisia atau ekstrak sehingga dapat mengurangi kadar air palsu. Pada umumnya simplisia yang sudah kering memiliki kadar air <10% (BPPTO 2015), dimana dengan jumlah kadar air tersebut kerusakan simplisia dapat ditekan baik dalam pengolahan maupun waktu penyimpanan. Hasil penetapan kadar air di dalam serbuk bunga pinang dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Penetapan kadar air serbuk bunga pinang.

No.	Berat serbuk (g)	Volume air (ml)	Kadar air (%)
1	20	1,1	5,5

Hasil perhitungan kadar air ekstrak bunga pinang menggunakan alat *Sterling-Bidwell* didapat kadar air rata-rata 5,5 %. Jadi, serbuk bunga pinang pada penelitian ini sudah sesuai dengan kadar air yang dipersyaratkan yaitu <10%. Hasil perhitungan kadar air serbuk bunga pinang dapat dilihat pada Lampiran 8 .

4. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol bunga pinang secara kualitatif

Ekstrak etanol bunga pinang dilakukan uji kualitatif menggunakan reaksi warna/uji tabung yang dilakukan untuk mengetahui kandungan flavonoid dan steroid/terpenoid. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol bunga pinang dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia aktif ekstrak etanol bunga pinang secara kualitatif.

Kandungan Kimia	Hasil Penelitian	Interpretasi Hasil	Pustaka
Flavonoid	Warna jingga pada lapisan amil alkohol	+	Warna jingga pada lapisan amil alkohol (Prameswari <i>et al.</i> 2014).
Terpenoid	Terbentuk cincin kecoklatan/violet	+	Terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan (Putu <i>et al.</i> 2017).
Steroid	Tidak terbentuk cincin biru kehijauan	-	Terbentuk cincin biru kehijauan (Hidayah <i>et al.</i> 2016)
Saponin	Tidak terbentuk busa	-	Terbentuk busa yang stabil (Putu <i>et al.</i> 2017)
Tanin	Tidak terbentuk warna hijau gelap/biru	-	Terbentuk warna hijau gelap/biru (Putu <i>et al.</i> 2017)

Berdasarkan hasil identifikasi kualitatif yang dilakukan terhadap ekstrak etanol bunga pinang pada Tabel 5, dapat diketahui bahwa ekstrak etanol bunga pinang positif mengandung senyawa flavonoid dan terpenoid. Berdasarkan hasil identifikasi oleh Asa *et al.* (2014), pada ekstrak etanol biji pinang positif mengandung senyawa flavonoid, tanin, saponin, dan alkaloid, sedangkan dari hasil identifikasi ekstrak etanol bunga pinang dihasilkan memiliki kandungan senyawa flavonoid, tanin, saponin, dan sterol/steroid, tetapi dari 4 senyawa yang telah diidentifikasi kandungan kimianya bunga pinang hanya positif mengandung senyawa flavonoid dan terpenoid saja (Ghate *et al.* 2014), sedangkan untuk

senyawa steroid, tanin, dan saponin tidak ditemukan pada ekstrak yang diteliti. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh pelarut yang digunakan saat proses ekstraksi dan pengaruh lingkungan tempat tumbuh tanaman yaitu iklim, kualitas tanah, dan mutu air yang dapat mempengaruhi kualitas dan kuantitas dari senyawa-senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan (Putu *et al.* 2017). Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol bunga pinang secara kualitatif dapat dilihat pada Lampiran 9 .

5. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol bunga pinang secara kuantitatif

Ekstrak etanol bunga pinang juga dilakukan uji kuantitatif menggunakan kromatografi lempeng tipis (KLT) yang dilakukan untuk mengetahui adanya kandungan flavonoid dan steroid/terpenoid yang dianalisis secara spektrofotometri dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol bunga pinang secara kuantitatif dapat dilihat pada Tabel 6.

5.1 Hasil identifikasi flavonoid. Pengujian dilakukan menggunakan fase diamsilika gel GF 254 dan fase gerak *n*-butanol : asam asetat glasial : air (4:1:5). Preaksi semprot yang digunakan adalah sitroborat dan uap ammonia. Baku yang digunakan adalah baku rutin. Hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil identifikasi senyawa flavonoid dengan KLT.

Kode	Rf	Warna Noda			
		Visual	Visual (Sitroborat)	UV 254 nm	UV 366 nm
Baku	A	0,875	Kekuningan	Tidak berwarna	Peredaman
Ekstrak	F	0,875	Kecoklatan	Tidak berwarna	Peredaman

Hasil pengujian dengan KLT menunjukkan bahwa ekstrak etanol bunga pinang mempunyai Rf 0,875, bercak yang dihasilkan menunjukkan warna kecoklatan secara visual, tetapi tidak mengalami perubahan warna setelah disemprot preaksi sitroborat,mengalami peredaman pada UV 254 nm dan berwarna ungu gelap pada UV 366 nm. Hasil menunjukkan didalam ekstrak dari

bunga *Areca catechu* L. mengandung senyawa flavonoid yang dapat dilihat dari harga Rf yang sama dengan baku serta warna noda pada UV 254 nm dan 366 nm.

5.2 Hasil identifikasi steroid/terpenoid. Pengujian dilakukan menggunakan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak kloroform : metanol (9:1). Pereaksi semprot yang digunakan adalah *Liebermann-Bouchard*. Baku yang digunakan adalah baku stigmasterol. Hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil identifikasi senyawa steroid/terpenoid dengan KLT.

Kode	Rf	Warna Noda			
		Visual	Visual (Sitroborat)	UV 254 nm	UV 366 nm
Baku	A	0,3	Tidak berwarna	Tidak berwarna	Peredaman
Ekstrak	S	0,3	Kecoklatan	Tidak berwarna	Peredaman

Hasil pengujian dengan KLT menunjukkan bahwa ekstrak etanol bunga pinang mempunyai Rf 0,3, bercak yang dihasilkan menunjukkan warna kecoklatan secara visual, tetapi tidak mengalami perubahan warna setelah disemprot pereaksi *Liebermann-Bouchard*, mengalami peredaman pada UV 254 nm dan berwarna ungu gelap pada UV 366 nm, namun pada pengujian steroid dengan menggunakan KLT hasil yang didapatkan adalah dalam ekstrak etanol bunga pinang positif mengandung senyawa terpenoid, sedangkan senyawa steroidnya tidak teridentifikasi/negatif setelah diidentifikasi secara KLT maupun uji kandungan kimia/uji tabung. Hasil menunjukkan didalam ekstrak dari bunga *Areca catechu* L. mengandung senyawa steroid/terpenoid yang dapat dilihat dari harga Rf yang sama dengan baku serta warna noda pada UV 254 nm dan 366 nm. Hasil pengujian dapat dilihat pada Lampiran 9.

Pada hasil kromatografi lapis tipis (KLT) dari 2 senyawa yang dianalisis secara spektrofotometri di atas dapat dilihat bahwa di dalam ekstrak etanol bunga pinang positif mengandung senyawa flavonoid dan steroid/terpenoid. Analisis secara spektrofotometri ini menggunakan beberapa kombinasi fase gerak antara lain, fase gerak BAW (butanol, asam asetat glasial, dan air) dengan perbandingan (4:1:5) dengan menggunakan baku pembanding rutin, sedangkan untuk mengidentifikasi adanya kandungan senyawa steroid menggunakan kombinasi

fase gerak metanol : kloroform dengan perbandingan (9:1) dengan menggunakan baku pembanding stigmasterol (Putu, *et al.* 2017). Fase diam yang digunakan pada analisis secara spektrofotomeri- UV Vis adalah menggunakan plat silika gel GF 254. Ekstrak yang akan diuji terlebih dahulu dilarutkan dalam pelarut etanol 96% sebanyak \pm 1 ml, kemudian ekstrak yang sudah dilarutkan dalam etanol 96% tadi kemudian ditotolkan pada garis batas awal elusi kemudian dikeringkan. Setelah lempeng lempeng KLT sudah mengering, lempeng ditempatkan dalam sebuah *chamber* bertutup yang berisi campuran kombinasi fase gerak yang sebelumnya sudah dijenuhkan dengan menggunakan kertas saring. Lempeng KLT kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* tersebut dan diamati elusi yang terjadi pada lempeng KLT tersebut. Perlu diperhatikan bahwa batas pelarut berada di bawah garis dimana posisi bercak tersebut berada, setelah eluen telah mencapai garis batas akhir elusi, maka lempeng KLT dikeluarkan dari dalam *chamber* dan dikeringkan. Bercak yang timbul pada lempeng KLT setelah dikeringkan, kemudian dilakukan pengamatan di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm dan diamati apakah senyawa kimia yang diamati apakah sudah sejajar dengan bercak dari baku pembanding atau belum jika posisi bercak senyawanya sejajar dengan posisi bercak dari baku pembanding maka bisa dipastikan di dalam ekstrak tersebut mengandung senyawa kimia yang ingin kita identifikasi. Selain mengidentifikasi adanya kandungan senyawa kimia flavonoid dan steroid/terpenoid, dilakukan juga penghitungan nilai Rf pada analisis secara spektrofotometri UV-Vis. Nilai Rf merupakan suatu nilai perbandingan jarak yang ditempuh solut dengan jarak yang ditempuh oleh fase gerak, pada analisis KLT diatas dilakukan juga pengukuran nilai Rf dari masing-masing lempeng KLT dan didapatkan hasil nilai Rf untuk senyawa flavonoid sebesar 0,875 dan untuk hasil nilai Rf untuk senyawa terpenoid sebesar 0,30 menurut Wulandari (2011), nilai Rf yang baik dalam analisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis nilai Rf yang baik berkisar antara 0,2-0,8.

C. Hasil Pengukuran Berat Badan Tikus

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi-Toksikologi, Universitas Setia Budi. Sebelum dilakukan perlakuan hewan uji diaklimatisasi selama 7 hari kemudian dipuasakan terlebih dahulu selama \pm 8 jam. Tujuan tikus dipuasakan untuk menghindari pengaruh makanan yang dapat mempengaruhi kadar glukosa darah tikus, selanjutnya dilakukan penimbangan berat badan dan pengambilan darah untuk mengetahui kadar gula darah awal (T_0). Penimbangan berat badan hewan uji dilakukan mulai pada hari ke-0 bertujuan untuk memastikan kondisi hewan uji antara kelompok perlakuan sama. Selanjutnya pengukuran berat badan hewan uji dilakukan setiap kali pengambilan darah yaitu ada hari ke-6, hari ke-13, dan hari ke-20 setelah pemberian perlakuan untuk melihat perubahan berat badan tikus pada masing-masing perlakuan sebelum dan sesudah diberikan sediaan uji, pemberian sediaan uji sendiri memiliki tujuan untuk melihat perubahan berat badan tikus pada masing-masing kelompok sesudah diberikan perlakuan terhadap obat sintetik dan ekstrak etanol bunga pinang.

Tabel 8. Rata-rata pengukuran berat badan tikus.

Kelompok	Rata-rata pengukuran berat badan tikus (gram)			
	T0	T1	T2	T3
Normal	211,40 \pm 3,65	224,80 \pm 3,83	232,20 \pm 3,42 ^{bc}	240,00 \pm 2,55 ^{bc}
Kontrol negatif	214,40 \pm 4,83	204,80 \pm 5,26 ^a	201,00 \pm 6,19 ^{bc}	196,00 \pm 5,61 ^{ac}
Kontrol Pembanding	215,20 \pm 6,98	206,60 \pm 8,11 ^a	212,60 \pm 9,07 ^{ab}	218,60 \pm 8,08 ^{ab}
Pinang125 mg/KgBB	217,60 \pm 4,04	209,60 \pm 3,36 ^a	210,80 \pm 3,19 ^{ab}	213,20 \pm 4,02 ^{ab}
Pinang250 mg/KgBB	217,60 \pm 5,32	208,80 \pm 6,06 ^a	213,60 \pm 6,50 ^{ab}	220,80 \pm 4,87 ^{ab}
Pinang 500mg/KgBB	216,80 \pm 4,76	208,80 \pm 5,17 ^a	213,40 \pm 6,11 ^{ab}	217,80 \pm 6,02 ^{ab}

Keterangan :

Kontrol diabetik : kelompok kontrol negatif (CMC Na 0,5%)
 Pembanding : kelompok kontrol positif (Glibenklamid 0,45 mg/KgBB)
 a : berbeda signifikan dengan kelompok kontrol normal
 b : berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif
 c : berbeda signifikan dengan kelompok kontrol glibenklamid
 T₀ : sebelum perlakuan hari ke-0
 T₁ : setelah induksi alokan hari ke-6
 T₂ : 7 hari setelah induksi sediaan uji
 T₃ : 14 hari setelah induksi sediaan uji

Pada Tabel 8, dapat dilihat pada hari ke-6 setelah penginduksian aloksan, terjadi penurunan berat badan tikus pada kelompok negatif sampai kelompok dosis uji yang disebabkan karena sel pankreasnya sudah mengalami kerusakan akibat induksi dari aloksan.

Pengukuran berat badan tikus pada kelompok perlakuan ekstrak dengan 3 variasi dosis yaitu dosis ekstrak bunga pinang 125 mg/KgBB, ekstrak etanol bunga pinang 250 mg/KgBB dan ekstrak etanol bunga pinang 500 mg/KgBB menunjukkan terjadinya peningkatan berat badan setelah tikus yang telah mengalami diabetes mellitus diberikan perlakuan dengan ekstrak etanol bunga pinang. Peningkatan berat badan ini jika dibandingkan dengan hasil analisis secara statistik, didapatkan hasil bahwa pada T1 menunjukkan berat badan tikus pada kelompok normal terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok yang lain, pada T2 berat badan tikus di kelompok normal mengalami perbedaan yang signifikan lagi dengan semua kelompok, tetapi pada kelompok negatif, positif, dan kelompok dosis uji 125 mg/KgBB tidak ada perbedaan yang signifikan, sedangkan pada kelompok kontrol positif, dosis uji 250 mg/KgBB, dan 500 mg/KgBB juga tidak mengalami perbedaan yang signifikan. Hasil analisis berat badan tikus pada T3 memberikan hasil bahwa pada kelompok negatif dan normal terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok positif, dosis uji 125mg/KgBB, 250 mg/KgBB, dan 500mg/KgBB.

D. Hasil Pengukuran Kadar Glukosa Darah Tikus

Pengujian aktivitas antidiabetes ekstrak etanol bunga pinang dilakukan terhadap hewan uji tikus putih jantan. Tikus putih jantan digunakan karena mempunyai kerja metabolisme obat yang lebih cepat dan kondisi biologis yang lebih stabil karena tikus jantan tidak dipengaruhi hormon estrogen, yang dapat

mempengaruhi kadar gula darah. Tikus diadaptasi selama 1 minggu sebelum digunakan. Setelah diadaptasikan, berat badan tikus kemudian ditimbang. Tikus terlebih dahulu dipuaskan selama ± 8 jam sebelum diberi perlakuan. Tujuannya untuk meminimalkan faktor makanan yang dapat mempengaruhi kadar glukosa darah tikus dan absorpsi obat yang diberikan.

Tikus kemudian dibuat keadaannya menjadi diabetes dengan induksi zat diabetogen yaitu senyawa aloksan. Aloksan adalah senyawa kimia yang digunakan untuk menginduksi diabetes pada hewan model hiperglikemik. Pemberian aloksan merupakan cara yang cepat untuk menghasilkan kondisi diabetik eksperimental (hiperglikemik) pada hewan percobaan. Peningkatan kadar glukosa dari darah dan menyimpannya dalam bentuk glikogen. Saat kadar glukosa meningkat, sel β pankreas terangsang untuk mensekresi hormon insulin sehingga kadar glukosa dalam tubuh menurun (Irdalisa *et al.* 2015). Mekanisme aloksan menginduksi diabetes kimia dalam berbagai spesies hewan dengan merusak sel-sel insulin. Survei literatur menunjukkan bahwa tikus yang diberi aloksan akan cepat mengalami kondisi hiperglikemia. Aloksan menghasilkan penghancuran parsial sel-sel β pankreas sehingga sel-sel β masih bisa bertahan dan melakukan regenerasi sel-selnya (Ghate *et al.* 2014). Peningkatan kadar gula darah setelah penginduksian aloksan mengindikasikan hewan coba sudah mengalami kondisi DM tipe 2. DM tipe 2 ditandai dengan penurunan respon jaringan perifer terhadap aksi insulin atau terjadinya malfungsi reseptor insulin, terjadinya penurunan kemampuan sel pada sel β Langerhaans pankreas sehingga mengakibatkan terganggunya produksi insulin dan pada akhirnya terjadi peningkatan kadar gula darah pada hewan coba (Thatit 2017).

Pengukuran kadar gula darah tikus dilakukan dengan menggunakan metode glukometer (Glukometer *Easy Touch GCU*). Glukosa darah diukur sebelum diberi perlakuan (T_0), hari ke- 6 (T_1), hari ke-13 (T_2), dan hari ke-20 (T_3). Pada penelitian ini pengujian aktivitas antidiabetes dilakukan dengan menggunakan metode uji diabetes induksi aloksan dimana hewan uji dibuat diabetes dengan menggunakan senyawa diabetogenik aloksan. Aloksan diberikan

secara intraperitoneal dengan dosis aloksan yang digunakan sebesar 150 mg/kg BB tikus. Hewan uji dapat dikatakan diabetes apabila setelah 3 hari pemberian aloksan terjadi hiperglikemia (kadar gula darah > 200 mg/dl) (Ghate *et al.* 2014). Cuplikan darah yang diambil dari vena lateralis ekor tikus dalam jumlah sangat sedikit yang berkisar hanya 1 μ l disentuhkan dalam *test strip*, kemudian alat tersebut akan segera mengukur kadar glukosa darah setelah strip terisi oleh darah, darah akan masuk ke dalam strip melalui aksi kapiler. Glukosa yang ada dalam darah akan bereaksi dengan glukosa oksidase dan kalium ferrisanida yang ada dalam strip dan akan dihasilkan kalium ferrosianida. Kalium ferrosianida yang dihasilkan sebanding dengan konsentrasi glukosa yang ada dalam sampel darah. Oksidasi kalium ferrosianida akan menghasilkan muatan listrik yang akan diubah oleh glukometer untuk ditampilkan sebagai konsentrasi glukosa pada layar.

β -D-Glukosa + kalium ferrisanida $\xrightarrow{\text{glukosa oksidase}}$ as. glukonat + kalium ferrosianida kalium ferrosianida $\xrightarrow{\text{oksidasi}}$ kalium ferrosianida + e- (Linghuat 2008). Pengukuran kadar gula darah dilakukan sebelum dan sesudah diberikan perlakuan (T_0-T_4). Pada awal penelitian dilakukan pengukuran kadar gula darah tikus yaitu pada T_0 . Data T_0 digunakan sebagai pembanding untuk melihat berhasil atau tidaknya induksi aloksan pada kelompok tikus diabetes melitus yaitu pada kelompok kontrol diabetes, pembanding, ekstrak etanol bunga pinang 125 mg/kgBB, 250 mg/kgBB, dan 500 mg/kgBB. Setelah kelompok tikus diabetes diinduksi aloksan, hari ke-6 kemudian dilakukan pengukuran kadar gula darah tikus kembali untuk memastikan tikus yang diinduksi telah mengalami diabetes (T_1). Pengukuran kadar gula darah hewan uji dengan metode glukometer. Aktivitas antidiabetes ekstrak etanol bunga pinang dilihat dari penurunan kadar gula darah tikus sebelum dan sesudah pemberian sediaan uji. Data pengukuran gula darah pada 6 kelompok perlakuan yang masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus putih jantan galur Wistar dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Data kuantitatif rata-rata hasil pengukuran kadar gula tikus pada berbagai kelompok perlakuan selama 20 hari.

Kelompok	Rata - rata pengukuran gula darah tikus (mg/dL)			
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃
Normal	82,60±5,37	87,00 ± 5,24	88,20±5,54 ^{bc}	90±4,80 ^b
Kontrol negatif	88,20 ± 7,76	214,60± 5,08 ^a	226,60±6,19 ^a	236±4,62 ^{ac}
Kontrol positif	87,60 ± 6,58	216,80± 6,38 ^a	155,20±3,96 ^{ab}	92±3,70 ^b
Pinang 125 mg/KgBB	89,80 ± 3,83	218,60± 5,41 ^a	178,40±5,32 ^{abc}	148±5,68 ^{abc}
Pinang 250 mg/KgBB	88,20 ± 6,42	218,60± 8,62 ^a	154,20±3,77 ^{ab}	97±2,86 ^b
Pinang 500mg/KgBB	88,80 ± 2,77	219,80± 3,49 ^a	175,60±5,18 ^{abc}	140±3,13 ^{abc}

Keterangan :

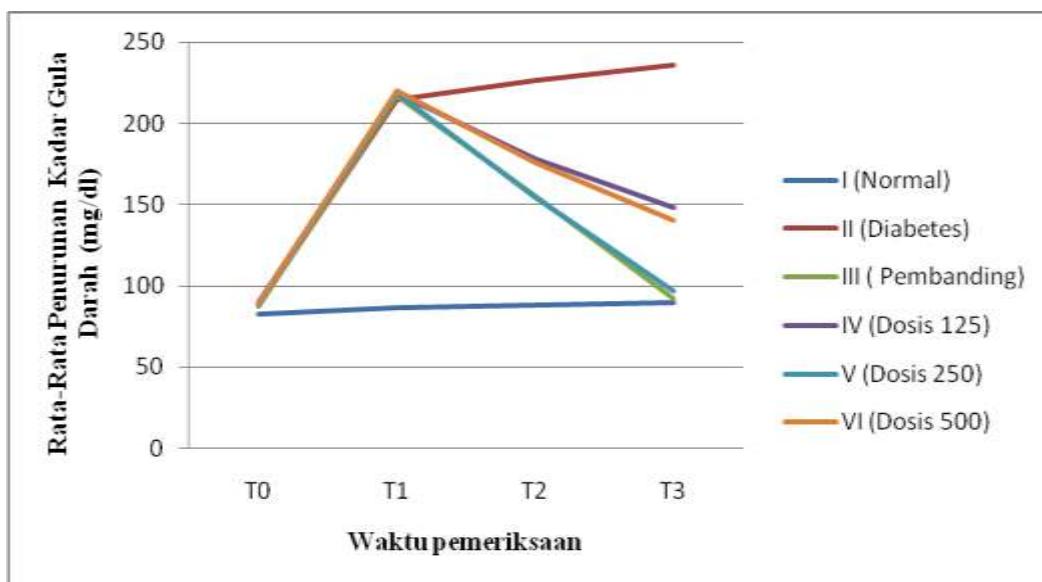
Kontrol diabetik : kelompok kontrol negatif (CMC Na 0,5%)
 Pembanding : kelompok kontrol positif (Glibenklamid 0,45 mg/KgBB)
 a : berbeda signifikan dengan kelompok kontrol normal
 b : berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif
 c : berbeda signifikan dengan kelompok kontrol glibenklamid
 T₀ : sebelum perlakuan hari ke-0
 T₁ : setelah induksi aloksan hari ke-6
 T₂ : 7 hari setelah induksi sediaan uji
 T₃ : 14 hari setelah induksi sediaan uji

Pada Tabel 9 di atas dapat dilihat kelompok normal memiliki kadar gula darah yang normal mengalami kenaikan tetapi masih di bawah 200 mg/dL karena hewan uji hanya diberikan pakan tinggi lemak dan glukosa tanpa adanya induksi aloksan. Kelompok kontrol negatif yang hanya diberikan perlakuan dengan CMC Na 0,5% memiliki kadar glukosa darah yang tetap tinggi karena (>200 mg/dL) kontrol negatif disini tidak memiliki pengaruh terhadap glukosa darah setelah diinduksi dengan aloksan yaitu di atas 200 mg/dL pada waktu T₁ sampai T₃ yang mengindikasikan bahwa induksi aloksan telah berhasil membuat tikus mengalami keadaan hiperglikemik.

Aloksan memiliki dua efek patologis yaitu selektif menghambat sekresi insulin yang diinduksi oleh glukosa melalui kemampuannya untuk menghambat sensor glukosa sel β (beta) dan mengakibatkan kerusakan sel β (beta) pankreas yang merupakan akibat dari adanya radikal hidroksil hasil reaksi antara aloksan dengan tiol intraseluler (glutation) yang dapat mengakibatkan nekrosis sel β (beta) pankreas (Lenzen 2008). Pada hari ke-7 setelah diberi sediaan uji, kadar glukosa

darah semua kelompok mengalami penurunan. Dilihat dari hasil analisa stastistik uji *post hoc test* pada kelompok 5 dan 6 dengan dosis ekstrak etanol bunga pinang 250 mg/kgBB dan dosis 500 mg/kgBB menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna ($p>0,05$) dengan kelompok pembanding (glibenklamid) nilai sig. = 1 & 0,949 sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol bunga pinang dengan dosis 250 mg/kgBB dan dosis 500 mg/kgBB mampu menurunkan kadar gula darah tikus yang diberi perlakuan selama 7 hari.

Pada hari ke-14 setelah diberi sediaan uji, kadar gula darah semua kelompok mengalami penurunan yang signifikan. Dilihat dari hasil analisa stastistik uji *post hoc test* pada kelompok 6 dengan dosis ekstrak etanol bunga pinang 250 mg/kgBB menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna ($p>0,05$) dengan kelompok normal dan kelompok pembanding (glibenklamid) nilai sig. = 0,117 sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol bunga pinang dengan dosis 250 mg/kgBB mampu menurunkan kadar gula darah tikus selama perlakuan 14 hari. Perubahan aktivitas ekstrak etanol bunga pinang yang terjadi pada hari ke-13 (T_2) dan hari ke-20 (T_3) dapat dikaitkan dengan salah satu prinsip kerja obat tradisional yaitu reaksi yang lambat tidak seperti obat kimia yang bisa langsung bereaksi. Hal itu disebabkan, senyawa-senyawa berkhasiat di dalam obat tradisional membutuhkan waktu relatif panjang untuk mempengaruhi fungsi metabolisme tubuh. Berbeda dengan kontrol pembanding (glibenklamid) yang bekerja dengan cara meningkatkan sekresi insulin dari sel beta pankreas sehingga dapat memberi efek penurunan kadar glukosa yang cenderung lebih cepat. Komponen aktif dalam ekstrak etanol bunga pinang diduga bekerja melalui berbagai mekanisme, diantaranya melalui kerja aktivitas antioksidan dari senyawa flavonoid yang bekerja dengan cara meningkatkan penyerapan glukosa dan meningkatkan kemampuan insulin (La Ode *et al.* 2018). Senyawa steroid memiliki mekanisme kerja dengan cara menstimulasi keluarnya insulin dari pankreas sehingga akan menurunkan kadar glukosa darah (Lestiani *et al.* 2015).



Gambar 9. Grafik rata-rata penurunan kadar glukosa darah tikus selama 20 hari.

Keterangan :

- I : kelompok kontrol normal
- II : kelompok kontrol negatif (CMC Na 0,5%)
- III : kelompok kontrol positif (Glibenklamid 0,45 mg/KgBB)
- IV : kelompok ekstrak bunga pinang 125 mg/KgBB
- V : kelompok ekstrak bunga pinang 250 mg/KgBB
- VI : kelompok ekstrak bunga pinang 500 mg/KgBB
- T₀ : pengukuran gula darah pada hari ke-0
- T₁ : pengukuran gula darah pada hari ke-6
- T₂ : pengukuran gula darah pada hari ke-13
- T₃ : pengukuran gula darah pada hari ke-20

Pada grafik di atas menunjukkan kadar glukosa darah pada kelompok I tidak mengalami kenaikan maupun penurunan yang signifikan karena kelompok I sebagai kontrol normal yang tidak diinduksi aloksan dan hanya diberi makan dan minum saja. Kelompok II (CMC Na 0,5%) setelah diinduksi terus mengalami peningkatan hingga hari ke 20, sedangkan grafik kelompok III hingga kelompok VI pada T₁ (induksi aloksan dosis 150 mg/KgBB) sama-sama mengalami peningkatan glukosa darah tetapi pada T₂ dan T₃ mengalami penurunan glukosa darah.

Pada grafik di atas menunjukkan bahwa ekstrak etanol bunga pinang dapat menurunkan kadar glukosa darah dilihat dari tiap waktu pengukuran glukosa darahnya pada hari ke-13 dan ke-20. Pada hari ke-13 atau 7 hari setelah induksi sediaan uji pada Kelompok dosis ekstrak etanol bunga pinang 250 mg/kgBB dan 500 mg/kg BB mengalami penurunan kadar glukosa yang setara

dengan kontrol positif (glibenklamid). Setelah 14 hari induksi sediaan uji kemudian diukur kembali kadar gula darahnya didapatkan hasil kadar glukosa tikus mengalami penurunan yang signifikan pada ekstrak etanol bunga pinang dosis 250 mg/kgBB setara dengan kontrol positif (glibenklamid). Glibenklamid merupakan golongan sulfonilurea yang memiliki efek menurunkan kadar glukosa darah yang ditimbulkan dengan cara meningkatkan produksi insulin dari sel beta pankreas sehingga dapat menurunkan glukosa darah (Raden *et al.* 2017). Glibenklamid hanya efektif pada diabetes mellitus tipe II yang keadaan diabetes tidak begitu berat dan sel betanya masih bekerja cukup baik dan juga glibenklamid dimetabolisme oleh hati dan metabolitnya di ekskresi di dalam urin (Prato *et al.* 2007).

Tabel 10. Persentase rata-rata penurunan kadar gula darah tikus.

Kelompok	Persen penurunan kadar gula darah T1 ke T3 dan T2 ke T3 (%)			
	T3-T1	%ΔT1	T3-T2	% ΔT2
Normal	-1,20	-10,20	-3,00	-2,60
Kontrol negatif	-12,00	-26,90	-22,00	-16,30
Kontrol positif	61,60	47,50	124,00	94,60
Bunga pinang mg/KgBB	125	40,20	30,90	71,00
Bunga pinang mg/KgBB	250	64,40	49,30	121,00
Bunga pinang mg/KgBB	500	44,20	33,80	79,00
				59,20

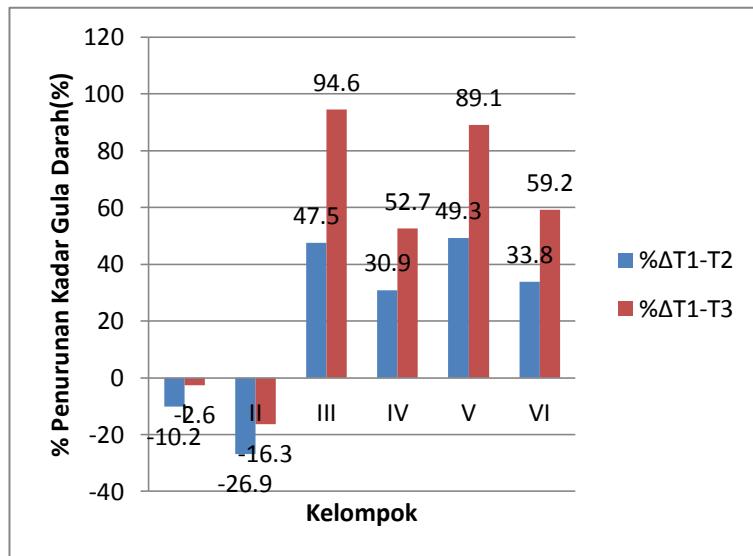
Keterangan :

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

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

%ΔT₁ : persen penurunan kadar glukosa darah dari T₃ ke T₁

%ΔT₂ : persen penurunan kadar glukosa darah dari T₃ ke T₂



Gambar 10. Grafik persentase rata-rata penurunan gula darah tikus.

Keterangan :

- I : kelompok normal
- II : kelompok kontrol negatif (CMC Na 0,5%)
- III : kelompok kontrol positif (Glibenklamid 0,45 mg/KgBB)
- IV : kelompok bunga pinang dosis 125 mg/KgBB
- V : kelompok bunga pinang dosis 250 mg/KgBB
- VI : kelompok bunga pinang dosis 500 mg/KgBB

Berdasarkan persentase penurunan kadar gula darah tikus pada ΔT_1 dan ΔT_2 (Tabel 10 dan Gambar 10), dapat ketahui bahwa pemberian ekstrak etanol bunga pinang dengan tiga variasi dosis dan kelompok kontrol pembanding yang diberikan glibenklamid disini terbukti mampu menurunkan kadar gula darah pada tikus. Pada ΔT_1 kelompok uji ekstrak etanol bunga pinang dengan dosis 125 mg/kgBB, 250 mg/kg BB, dan 500 mg/kg BB secara berturut-turut mampu menurunkan kadar gula darah pada tikus sebesar 30,90%; 49,30%; dan 33,80%, sedangkan untuk kelompok pembanding sebesar 47,50%, sedangkan pada ΔT_2 persentase penurunan kadar gula darah kelompok uji ekstrak etanol bunga pinang dengan dosis 125 mg/kgBB, 250mg/kg BB dan 500 mg/kg BB secara berturut-turut mampu menurunkan kadar gula darah pada tikus sebesar 52,70%; 89,10% dan 59,20% sedangkan pada kelompok pembanding yaitu glibenklamid menghasilkan persentase penurunan sebesar 94,60%.

Berdasarkan data yang diperoleh dari penelitian ini dapat diketahui bahwa semakin tinggi dosis ekstrak etanol bunga pinang yang diberikan maka semakin besar pula efek penurunan kadar gula darah yang dihasilkan tetapi penurunannya tidak signifikan seperti dosis tengahnya. Hal ini disebabkan karena di dalam

ekstrak etanol bunga pinang diduga masih mengandung senyawa-senyawa metabolit sekunder seperti tanin, alkaloida, saponin, dan lain-lain. Pada konsentrasi kecil senyawa-senyawa sampingan tersebut masih terdapat dalam jumlah yang kecil dan belum mempengaruhi hasil yang diharapkan, tetapi pada konsentrasi yang lebih besar, efek dari senyawa-senyawa sampingan tersebut menjadi besar secara perbandingan sehingga mulai berpengaruh kepada respon yang dihasilkan (Hidayat *et al.* 2014).

Penurunan kadar glukosa darah dengan pemberian ekstrak etanol bunga pinang dapat disebabkan oleh adanya senyawa bioaktif yang terkandung dalam bunga pinang yang dapat mencegah terjadinya oksidasi pada sel β pankreas sehingga kerusakan dapat diminimalkan. Senyawa bioaktif yang terbukti memiliki khasiat sebagai antidiabetes diantaranya adalah senyawa flavonoid dan senyawa steroid (Ghate *et al.* 2014).

Flavonoid dapat menurunkan kadar gula darah karena memiliki peranan dalam meningkatkan serapan glukosa oleh otot (La Ode *et al.* 2018). Ruhe *et al.* (2001), membuktikan bahwa antioksidan dapat mengikat radikal bebas sehingga dapat mengurangi resistensi insulin. Flavonoid termasuk senyawa fenolik alam yang memiliki potensial sebagai antioksidan dan mempunyai kemampuan bioaktivitas sebagai obat. Beberapa senyawa flavonoid telah diisolasi dari obat tradisional Cina untuk digunakan sebagai obat antidiabetes. Sebagian besar dari senyawa flavonoid ini sebagai antidiabetes menunjukkan mekanisme kerja dengan meningkatkan fungsi dari sel-sel pankreas (Novia dan Helmi 2016).

Flavonoid diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang diyakini mampu melindungi tubuh terhadap kerusakan yang disebabkan spesies oksigen reaktif, sehingga mampu menghambat terjadinya penyakit degeneratif seperti diabetes mellitus. Dalam mekanisme penyembuhan penyakit diabetes, flavonoid diduga berperan secara signifikan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan dan mampu meregenerasi sel-sel β -pankreas yang rusak sehingga defisiensi insulin dapat diatasi. Flavonoid yang terkandung di dalam tumbuhan diduga juga dapat memperbaiki sensitifitas reseptor insulin, sehingga adanya senyawa flavonoid

dapat memberikan efek yang menguntungkan pada keadaan diabetes mellitus (Marianne 2011).

E. Hasil Pemeriksaan Histopatologi Hati

Hati merupakan organ yang dapat memetabolisme semua zat yang masuk ke dalam tubuh, baik yang bersifat toksik maupun tidak toksik. Gambaran histopatologi hati tikus hiperglikemi yang telah diberikan sediaan uji selama 20 hari ditemukannya nekrosis/kerusakan yang terjadi pada organ hati tikus. Perubahan struktur histologi hati dipengaruhi oleh jumlah dan jenis senyawa yang masuk ke dalam organ hati, termasuk pemberian ekstrak bahan alam pada tikus (Swarayana *et al.* 2012). Nekrosis yang terjadi pada sel hati biasanya ditandai dengan adanya inti sel hati yang terlibat menyusut, batasnya tidak teratur dan berwarna gelap yang merupakan ciri-ciri dari inti piknotik. Inti piknotik merupakan pengertian inti akibat dari homogenisasi sitoplasma dan peningkatan eosinofilik. Setelah terjadi inti piknotik, inti hati dapat hancur dan meninggalkan pecahan-pecahan zat kromatin yang tersebar di dalam sel, proses ini disebut dengan karioreksis. Inti sel yang mati akan kehilangan kemampuan untuk diwarnai dan menghilang, proses ini disebut dengan kariolisis. Inti piknosis merupakan tahap awal terjadinya nekrosis dan nekrosis dapat ditandai dengan adanya perubahan pada inti sel (Ngudy *et al.* 2014).

Tabel 11. Total persentase kerusakan sel pada gambaran histopatologi hati.

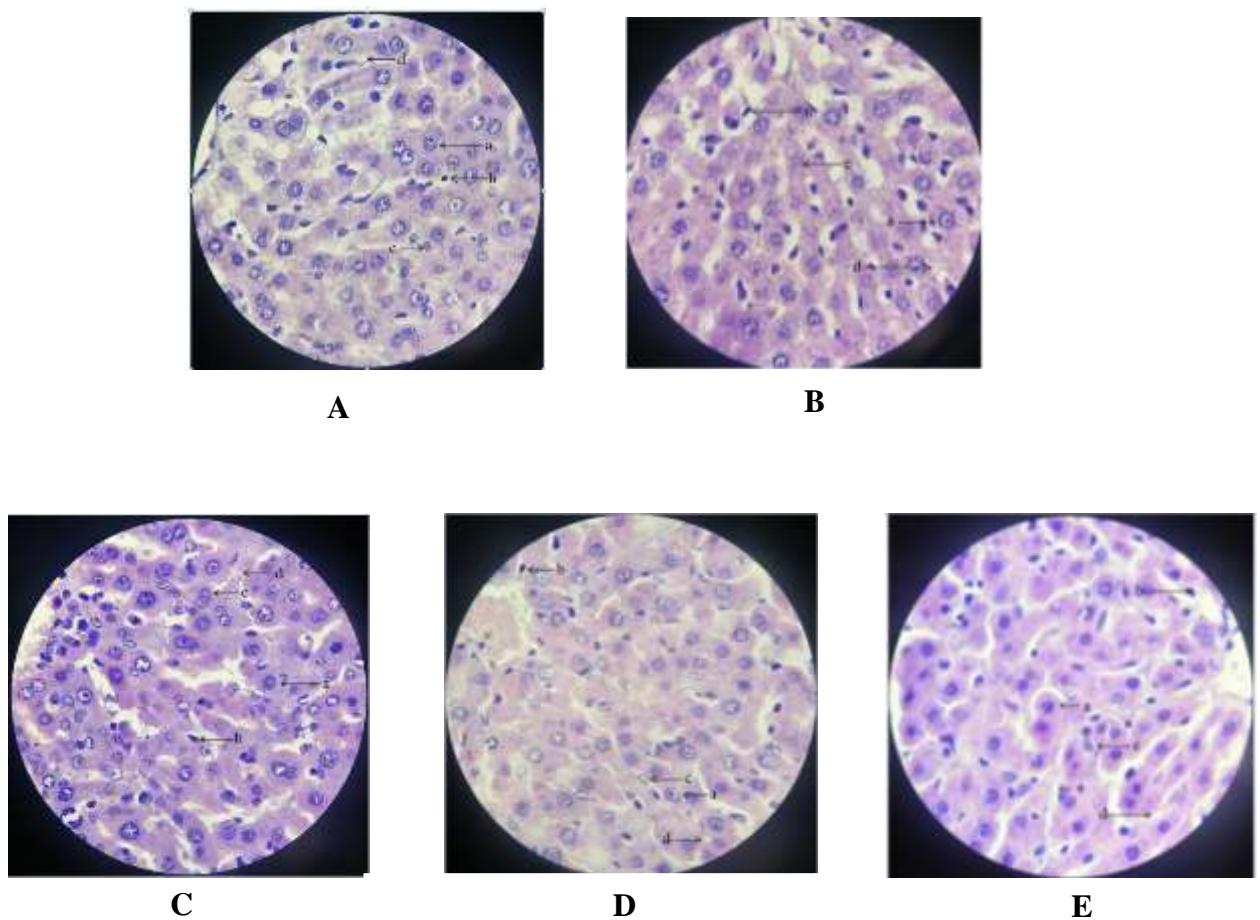
Kelompok Pengecatan	SKH (Skor Kerusakan Hati)	Rata-Rata SKH (Skor Kerusakan Hati)	% Kerusakan Sel Hati	Skor Derajat Kerusakan Hati
K. Normal	56		35	
	49	53	31	2
	54		33	
K. Negatif	100		68	
	104	102,67	69	3
	104		71	
K. Positif	73		47	
	68	69	45	2
	66		43	
K. 125	94		63	
	90	92,67	60	3
	94		62	
K. 250	82		53	
	82	80,67	54	3
	78		51	
K.500	82		55	
	83	81,67	54	3
	80		52	

SKH (Skor Kerusakan Hati) adalah suatu skor yang digunakan untuk menilai derajat kerusakan pada sel-sel hati dari hasil histopatologi hati. Skor ini digunakan untuk menentukan tingkat keparahan dari kerusakan yang terjadi di dalam sel hati akibat suatu induksi/paparan suatu zat tertentu. Nilai skor kerusakan hati sendiri dapat dihitung dengan cara menjumlahkan jumlah sel-sel yang mengalami kerusakan dengan nilai skor kerusakan yang terjadi. Penentuan scoring kerusakan hepar dapat ditentukan berdasarkan gambaran histologi beragam tergantung dari tujuan pemeriksa (Zohan 2018). Preparat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x, di setiap lapangan pandang, dihitung 100 sel. Jenis kerusakan hepar yang diamati meliputi piknosis, karioreksis, dan kariolisis.

Tabel 12. Tabel kriteria penilaian jenis kerusakan/nekrosis pada sel hati (Shiddiqi 2008).

Jenis Kerusakan/Nekrosis Sel Hati	Skor
Piknosis	1
Karioreksis	2
Kariolisis	3

Gambaran histologis hati diamati dan dinilai berdasarkan kerusakan histologis yang berupa inti piknosis, karioreksis, dan kariolisis. Caranya adalah apabila menemukan sel hati yang mengalami piknosis maka jumlah sel hati yang mengalami keadaan piknosis tersebut dikalikan 1, untuk jumlah sel hati yang mengalami keadaan karioreksis dikalikan 2, dan untuk jumlah sel hati yang mengalami keadaan kariolisis dikalikan 3 (Shiddiqi 2008). Kemudian, dari ketiga hasil perhitungan tersebut dijumlahkan dan dibandingkan dengan tabel Mordue *et al* (2001), dimana masing-masing kelompok perlakuan akan mendapat skor derajat kerusakan histopatologi hati yang dinyatakan dalam skor 0-4. Skor derajat kerusakan sel hati yang didapatkan akan diinterpretasikan ke dalam suatu kesimpulan sel hati tersebut mengalami berapa persen kerusakan yang meliputi nekrosis dan degenerasi sel. Semakin tinggi nilai derajat kerusakan histopatologi hati, maka persentase kerusakan yang terjadi di dalam sel hati tersebut cukup tinggi dan mengakibatkan kerusakan sel yang parah, sebaliknya jika skor derajat kerusakan histopatologi hati mendapat skor yang semakin rendah maka bisa disimpulkan bahwa persentase kerusakan yang terjadi di dalam sel hati tersebut kecil dan sel-selnya bisa beregenerasi dengan baik.



Gambar 11. Hasil irisan melintang histopatologi hati tikus.

Keterangan :

- A. Kontrol Positif Glibenklamid 0,45 mg/KgBB
- B. Kontrol Negatif CMC Na 0,5%
- C. Dosis Ekstrak Bunga Pinang 125 mg/KgBB
- D. Dosis Ekstrak Bunga Pinang 250 mg/KgBB
- E. Dosis Ekstrak Bunga Pinang 500 mg/KgBB

a = sel normal

b = piknosis

c = karioreksis

d=kariolisis

Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa ekstrak etanol bunga pinang memiliki kemampuan untuk menurunkan rata-rata persentase nekrosis sel hati hampir sama dengan kontrol positif. Hal ini disebabkan oleh adanya senyawa yang ditunjukan pada hasil identifikasi kualitatif pada Tabel 6 yakni flavonoid. Flavonoid disebut sebagai senyawa yang memiliki aktivitas antihiperglikemia karena dapat bertindak sebagai antioksidan dan inhibitor aldosa reduktase (Sasmita *et al.* 2017). Sebagai antioksidan, flavonoid menghambat pembentukan radikal bebas yang dapat merusak sel β pankreas dengan mendonorkan atom hidrogen dari gugus fenoliknya untuk berikatan dengan substituen radikal bebas sehingga membentuk radikal flavonoid (Sandhar *et al.* 2011).

Semakin besar nilai SKH menunjukkan bahwa semakin besar kerusakan yang terjadi ataupun sebaliknya semakin rendah nilai SKH mendeskripsikan adanya perbaikan pada hati tikus. Hasil rata-rata kerusakan pada Tabel 10 diatas mendeskripsikan bahwa dari berbagai kelompok perlakuan memberikan hasil rata-rata kerusakan yang berbeda-beda. Kelompok kontrol normal menunjukkan nilai rata-rata SKH terendah yaitu 53 lebih rendah dari kelompok lainnya, ini terjadi dikarenakan pada kelompok normal tidak diberi perlakuan seperti kelompok lainnya dan mendapatkan asupan makan yang tercukupi. Berbeda halnya dengan kontrol normal, pada kelompok kontrol negatif menunjukkan nilai rata-rata SKH 102,67 yang merupakan paling tinggi dibandingkan kelompok lainnya, ini membuktikan bahwa pemberian aloksan sebagai agen diabetogenik yang bersifat toksik dan dapat mengakibatkan kerusakan sel-sel di hati tikus baik dalam bentuk piknosis, karioreksis, kariolisis hal ini sesuai dengan pernyataan Puspitasari (2016). Aloxan juga merupakan turunan pirimidin yang memiliki reaktivitas menghasilkan sebuah protoxin xenobiotik yang akan menghasilkan toksik ROS (*Reactive Oxygen Species*) melalui siklus redoks dengan asam dialurik untuk periode yang lama sehingga akan mengakibatkan terjadinya pembentukan toksin ROS yang menyebabkan pembentukan radikal bebas. Peningkatan radikal bebas yang semakin bertambah akan menyebabkan kerusakan pada organ hati sehingga proses metabolisme glukosa menjadi terganggu (Ummah 2015; Notariza dan Krisnamurti 2017). Hasil rata-rata SKH pada 3 variasi dosis

ekstrak etanol bunga pinang menunjukkan dari 3 variasi dosis tersebut didapatkan hasil pada dosis ekstrak etanol bunga pinang 250 mg/KgBB menghasilkan nilai rata-rata SKH yang lebih kecil dibandingkan dengan nilai rata-rata SKH dosis ekstrak yang lain, yaitu sebesar 80,67, maka dari hasil nilai rata-rata SKH histopatologi hati tikus diatas bisa disimpulkan bahwa ekstrak etanol bunga pinang dengan dosis 250 mg/KgBB terbukti mampu menurunkan kadar glukosa darah dan mampu meregenerasi kerusakan sel-sel hati pada tikus yang mengalami hiperglikemia.

