

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN GEDI MERAH
(Abelmoschus manihot L. Medik) **TERHADAP RADIKAL BEBAS**
DPPH DAN AKTIVITAS ENZIM GLUTATION
PEROKSIDASE PADA TIKUS DIABETES



Diajukan oleh :

Muhammad Firdaus
20144098A

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN GEDI MERAH
(*Abelmoschus manihot* L. Medik) TERHADAP RADIKAL BEBAS
DPPH DAN AKTIVITAS ENZIM GLUTATION
PEROKSIDASE PADA TIKUS DIABETES**



Diajukan oleh :

**Muhammad Firdaus
20144098A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

PENGESAHAN SKRIPSI

berjudul

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN GEDI MERAH (*Abelmoschus manihot* L.Medik) TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH DAN AKTIVITAS ENZIM GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS DIABETES

Oleh :

Muhammad Firdaus

20144098A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal 29 Juni 2018



Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi

Pembimbing,

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

Pembimbing Pendamping,

Mamik Ponco Rahayu, M.Si., Apt.

Penguji :

1. Dr. Rina Herowati, M.Si., Apt.
2. Dr. Wiwin Herdwiani, M.Sc., Apt.
3. Hery Muhamad Ansory, S.Pd., M.Sc.
4. Dr. Gunawan Pamudji W, M.Si., Apt.

1.
2.
3.
4.

HALAMAN PERSEMBAHAN

**“Sesungguhnya sesudah kesulitan ada kemudahan
Maka apabila kamu telah selesai (dari suatu urusan)
Kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urus) yang lain
Dan hanya kepada Tuhan-Mu lah hendaknya kamu berharap”**
(QS. Al-Insyirah: 6-8)

Dengan cinta dan ketulusan hati
Dengan rasa syukur yang tak terhingga
Ku persembahkan karya ini unuk Ayahanda tercinta (ARBANI) dan Ibunda
tersayang (NORHIDAYAH) atas perhatian, pengorbanan, kasih sayang serta do'a
yang senantiasa selalu mengiringi setiap langkahku dan takkan pernah mampu ku
gantikan peluhmu yang mengucur deras demi asa dan cita-citaku serta untuk
kakak dan adikku

*Seutama-utama manusia ialah seorang mukmin yang berilmu. Jika ia dibutuhkan,
maka ia memberi manfaat. Dan jika ia tidak dibutuhkan maka ia dapat memberi
manfaat pada dirinya sendiri”.*
(HR. Al-Baihaqi)

Niat adalah ukuran dalam menilai benarnya suatu perbuatan, oleh
karenanya, ketika niatnya benar, maka perbuatan itu benar, dan jika
niatnya buruk, maka perbuatan itu buruk.
(Imam An Nawawi)

PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa skripsi 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 skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, Juni 2018



Muhammad Firdaus

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, hidayah, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN GEDI MERAH (*Abelmoschus monihot* L. Medik) TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH DAN AKTIVITAS GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS DIABETES”**. Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh derajat sarjana di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan dan penulisan skripsi ini tidak lepas dari bantuan, dukungan, dan bimbingan dari berbagai pihak sehingga penulis menyampaikan terimakasih kepada yang terhormat:

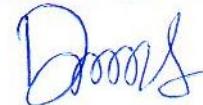
1. Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA selaku rektor Universitas Setia Budi.
2. Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt, selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Dr Gunawan Pamudji W., M.Si., Apt., selaku pembimbing utama yang telah memberikan bimbingan, arahan, nasehat, dan ilmunya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
4. Mamik Ponco Rahayu., M.Si., Apt., selaku pembimbing pendamping yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Tim penguji yang telah meluangkan waktu serta memberikan kritik dan saran sehingga skripsi ini menjadi lebih baik.
6. Bapak, ibu, kakak, adik dan semua keluarga terima kasih untuk do'a, dukungan dan semangat yang diberikan
7. Rekan-rekan khususnya Sopan, Jofrin, Fani dan Yati terima kasih atas kerjasama dan bantuannya selama ini untuk menyelesaikan penelitian skripsi ini.
8. Para sedulur khususnya Dzulyan, Adam, Afif, Serli, Rika, Oyak, Tuca, April, Nyoman, Sukron, joli, Zaidy, Hilmie, Hendrik, Vincen dan teman-teman yang

lain terima kasih banyak atas bantuan dan suporrtnya selama ini untuk supaya skripsi ini selesai.

9. Segenap dosen, staff, laboran, dan asisten laboratorium, perpustakaan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi yang telah memberikan bantuan selama penelitian.
10. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dari pihak terkait maka skripsi ini tidak selesai dengan baik. Penulis juga menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis sangat berharap kritik dan saran. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi seluruh masyarakat dan perkembangan ilmu pengetahuan khususnya di bidang farmasi.

Surakarta, April 2018



Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PERSEMPAHAN.....	iii
PERNYATAAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xv
INTISARI.....	xvi
ABSTRACT	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Tanaman Gedi	5
1. Klasifikasi.....	5
2. Nama lain	5
3. Deskripsi.....	5
4. Etiologi	6
5. Kandungan kimia dan kegunaan	6
B. Tinjauan Fitokimia	7
1. Alkaloid	7
2. Saponin.....	7
3. Flavonoid.....	8
4. Tanin.....	8
C. Simplisia.....	8
1. Pengertian.....	8

2.	Pengumpulan	9
3.	Pencucian dan pengeringan	9
D.	Ekstraksi	10
1.	Pengertian	10
2.	Ekstrak	10
3.	Merasasi	10
4.	Pelarut	11
E.	Diabetes Mellitus	11
1.	Klasifikasi	11
1.1	Diabetes mellitus tipe 1	11
1.2	Diabetes mellitus tipe 2	11
1.3	Diabetes mellitus gestasional	12
1.4	Diabetes mellitus lain	12
2.	Gejala	12
2.1	Gejala akut diabetes mellitus	12
2.2	Gejala kronik diabetes mellitus	13
3.	Diagnosis	13
4.	Manifestasi klinik	13
5.	Stress oksidatif pada diabetes	14
5.1	Autooksidasi glukosa	15
5.2	Glikasi protein nonenzimatis	15
5.3	Jalur poliol-sorbitol (aldose reduktase)	16
F.	Antioksidan	17
1.	Klasifikasi	17
1.1	Antioksidan endogen	17
1.2	Antioksidan eksogen	18
2.	Berdasarkan mekanisme kerjanya	18
2.1	Antioksidan primer	18
2.2	Antioksidan sekunder	18
2.3	Antioksidan tersier	19
3.	Mekanisme kerja	19
G.	Radikal Bebas	20
1.	Pengertian	20
2.	Sumber radikal bebas	20
3.	Mekanisme pembentukan	20
4.	Efek radikal bebas	21
H.	Metode Uji Antioksidan <i>In Vitro</i>	21
1.	Uji DPPH	21
2.	Uji TRAP	23
3.	Uji ABTS	23
4.	Uji FRAP	24
I.	Metode Uji Antioksidan <i>In vivo</i> Terhadap GPx	24
J.	Kuersetin	26
K.	Streptozotosin dan Nikotinamid	27
1.	Penginduksi streptozotosin (STZ)	27
2.	Penginduksi nikotinamid (NA)	28

L. Glibenklamid	29
1. Sifat fisika kimia	29
2. Indikasi dan kontra indikasi	29
3. Dosis dan aturan pakai	29
4. Mekanisme kerja	29
5. Efek samping.....	29
M. Hewan Uji.....	30
1. Sistematika	30
2. Karakteristik utama	30
3. Jenis kelamin	31
N. Landasan Teori	31
O. Hipotesis	33
 BAB III METODE PENELITIAN	34
A. Populasi dan Sampel.....	34
1. Populasi	34
2. Sampel.....	34
B. Variabel Penelitian	34
1. Identifikasi variabel utama	34
2. Klasifikasi variabel utama	34
3. Definisi operasional variabel utama	35
C. Bahan dan Alat	35
1. Bahan.....	35
1.1 Bahan sampel	35
1.2 Bahan uji farmakalogi.....	36
2. Alat	36
3. Hewan uji	36
D. Jalannya Penelitian	37
1. Determinasi daun gedi merah.....	37
2. Pengambilan dan pembuatan serbuk daun gedi merah	37
3. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun gedi merah.....	37
4. Pembuatan ekstrak etanol daun gedi merah	37
5. Uji bebas alcohol.....	38
6. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun gedi merah.....	38
7. Uji aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH.....	39
7.1 Penyiapan larutan DPPH 80 ppm	39
7.2 Penyiapan larutan ekstrak daun gedi merah.....	39
7.3 Penyiapan larutan kuersetin	39
7.6 Penentuan <i>operating time</i>	40
7.7 Uji aktivitas antioksidan	40
7.8 Analisa data.....	40
8. Uji aktivitas antioksidan terhadap glutation peroksidase	40
8.1 Penentuan Dosis Glibenklamid.....	40
8.2 Penentuan Dosis STZ-NA.....	40
8.3 Sediaan uji.....	41

8.4	Pembuatan bahan uji	41
8.5	Pembuatan bahan uji	41
8.7	Penentuan hewan uji	41
8.8	Perlakuan hewan uji	41
8.9	Pengorbanan hewan uji	42
8.10	Preparasi sampel	42
8.11	Pemeriksaan Aktivitas Antioksidan Terhadap GPx	42
8.12	Pengukuran aktivitas GPx	42
E.	Analisa Statistik	43
F.	Skema Penelitian	44
BAB IV	HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	46
A.	Determinasi Daun Gedi Merah	46
1.	Hasil determinasi tanaman	46
2.	Deskripsi tanaman	46
B.	Pembuatan Serbuk Daun Gedi Merah	47
C.	Penetapan Kadar Air Serbuk Daun Gedi Merah	48
D.	Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah	49
E.	Hasil Uji Bebas Alkohol Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah	49
F.	Identifikasi Kandungan Kimia Daun Gedi Merah	49
G.	Uji Aktivitas Antioksidan terhadap Radikal Bebas DPPH	50
1.	Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum	50
2.	Penetapan Operating time	50
3.	Hasil pengujian aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH	51
H.	Uji Aktivitas Terhadap Enzim GPx	53
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	61
A.	Kesimpulan	61
B.	Saran	61
DAFTAR PUSTAKA	62	
LAMPIRAN	70	

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1. Struktur kimia DPPH	22
Gambar 2. Reaksi antara DPPH dengan H [·] yang berasal dari senyawa peredam radikal bebas	22
Gambar 3. Struktur GPx.....	24
Gambar 4. Perubahan <i>Hydrogen Peroxide</i> Menjadi Air yang Dikatalisis oleh GPx (Prangdimurti, 2007).	26
Gambar 5. Struktur kimia kuersetin	27
Gambar 6. Struktur Kimia Glibenklamid.....	30
Gambar 7. Pengujian aktivitas antioksidan (<i>in vitro</i>) menggunakan metode DPPH.....	44
Gambar 8. Pengujian aktivitas enzim glutation peroksidase (<i>in vivo</i>).....	45
Gambar 9. Aktivitas GPx (U/mg) seluruh kelompok perlakuan.....	54

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Tingkat Kekuatan Antioksidan	19
Tabel 2. Rendemen pengeringan daun gedi merah.....	48
Tabel 3. Penetapan kadar air serbuk daun gedi merah	48
Tabel 4. Rendemen ekstrak etanol daun gedi merah	49
Tabel 5. Hasil uji bebas alkohol ekstrak etanol daun gedi merah	49
Tabel 6. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun gedi merah	50
Tabel 7. Hasil aktivitas antioksidan ekstrak daun gedi merah.....	51
Tabel 8. Rata-rata hasil pengukuran aktivitas enzim GPx pada hati tikus	54

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1.	Surat determinasi tanaman	71
Lampiran 2.	Ethical clearance.....	72
Lampiran 3.	Surat Praktik Penelitian	73
Lampiran 4.	Hasil presentase rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun gedi merah	75
Lampiran 5.	Hasil penetapan kadar air daun gedi merah.....	76
Lampiran 6.	Perhitungan rendemen ekstrak etanol daun gedi meah	77
Lampiran 7.	Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun gedi merah.....	78
Lampiran 8.	Hasil identifikasi ekstrak etanol daun gedi merah.....	79
Lampiran 9.	Radikal bebas DPPH	80
Lampiran 10.	Penetapan panjang gelombang maksimum DPPH	81
Lampiran 11.	Ekstrak etanol daun gedi merah	82
Lampiran 12.	Penetapan <i>operating time</i> daun gedi merah.....	83
Lampiran 13.	Data ekstrak.....	84
Lampiran 14.	Perhitungan IC ₅₀ ekstrak etanol daun gedi merah	86
Lampiran 15.	Kuersetin.....	88
Lampiran 16.	Penetapan <i>operating time</i> kuersetin.....	89
Lampiran 17.	Data kuersetin	90
Lampiran 18.	Perhitungan IC ₅₀ kuersetin.....	92
Lampiran 19.	Hasil uji statistik <i>Independent sampels t-test</i> rata-rata nilai IC ₅₀ kuersetin dan ekstrak	94
Lampiran 20.	Foto alat, bahan dan hasil uji aktivitas antioksidan secara <i>in vitro</i>	95
Lampiran 21.	Perhitungan dosis dan volume pemberian	97

Lampiran 22. Hasil penimbangan dan hasil rata - rata penimbangan berat badan tikus.....	100
Lampiran 23. Hasil pengukuran aktivitas enzim GPx hati tikus.....	101
Lampiran 24. Hasil statistik	102
Lampiran 25. Foto tanaman gedi merah	104
Lampiran 26. Foto hewan percobaan,proses pembedahan, ginjal tikus.....	105

DAFTAR SINGKATAN

ANOVA	<i>Analysis of variances</i>
CMC	<i>Carboxymethylcellulose</i>
DPPH	<i>Diphenylpicrylhydrazyl</i>
EDTA	Ethylene Diamine Tetra acetic Acid
GPX	Glutation peroksidase
GR	<i>Glutathione Reductase</i>
GSH	Glutation tereduksi
GSSG	Glutation teroksidasi
H ₂ O	Hidrogen; air
H ₂ O ₂	Hidrogen peroksidase
IC ₅₀	<i>Inhibitory Concentration 50</i>
NADPH	Nicotinic Adenin Dinucleotide Phospat Hydrogen
SOD	<i>Superoksidasi Dismutase</i>
UV-Vis	<i>Ultra Violet Visible</i>

INTISARI

FIRDAUS M., 2018, PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN GEDI MERAH (*Abelmoschus manihot* L. Medik) TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH DAN AKTIVITAS ENZIM GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS DIABETES. SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L. Medik) merupakan daun yang berkhasiat sebagai antioksidan dan antidiabetes. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antioksidan dari daun gedi merah secara *in vitro* dan *in vivo*.

Ekstrak etanol daun gedi merah diuji aktivitas antioksidannya secara *in vitro* dengan metode penangkapan radikal bebas DPPH dengan parameter IC₅₀ dan dibandingkan dengan aktivitas antioksidan dari quersetin. Uji antioksidan secara *in vivo* pada penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus tikus putih jantan yang dibagi menjadi 6 kelompok yaitu kontrol normal, kontrol negatif, kontrol positif (glibenklamid), ekstrak etanol daun gedi merah dengan dosis 100 mg, 200 mg, dan 400 mg/kg bb. Dilakukan pengukuran peningkatan aktivitas enzim glutation peroksidase pada jaringan hati tikus yang telah diinduksi streptozotosin-nikotinamid., data yang diperoleh dianalisa dengan metode One way anova (P<0,05) dilanjutkan uji tukey.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun gedi merah memiliki aktivitas antioksidan IC₅₀ sebesar 133,05 ppm sehingga tergolong antioksidan sedang. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun gedi merah dapat meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase pada tikus wistar hiperglikemia. Dosis yang paling efektif adalah dosis 400 mg/kg BB tikus yang menunjukkan aktivitas tertinggi dan setara dengan kontrol positif.

Kata kunci : daun gedi merah, DPPH, glutation peroksidase, antioksidan.

ABSTRACT

FIRDAUS M., 2018, EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACT GEDI MERAH LEAF (*Abelmoschus manihot* L. Medik) AGAINST FREE RADICAL DPPH AND ACTIVITY OF GLUTATHIONE PEROXIDASE ENZYME IN DIABETIC RAT. THESIS, PHARMACY FACULTY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Red gedy (*Abelmoschus manihot* L. Medik) is the leaf that have an antioxidant and antidiabetic effects. This study aims to know the antioxidant effect of red gedy leaf by *in vitro* and *in vivo* methods.

Ethanolic extract of red gedy leaf, is tested due to the antioxidant activity by *in vitro* with free radical DPPH with IC₅₀ parameters and compared with the antioxidant activity of quercetin. Antioxidant tested by *in vivo* in this study using 30 rats of male white rat divided into 6 groups namely normal control, negative control, positive control (glibenklamid), extract of ethanol of red gedy leaves with dose of 100 mg, 200 mg, and 400 mg / kg bb. Measurements of increased activity of glutathione peroxidase enzyme in tissue rat liver it has been than induction with streptozotocin-nicotinamide, the data that obtained is analyze by One Way Anova (p<0,05) than continued by tukey test.

The results of this study indicate that the extract of red gedy ethanol has IC₅₀ antioxidant activity of 133.57 ppm sehingga classified as a moderate antioxidant. The results of this study indicate that administration of red gedy ethanol extract can increase the activity of glutathione peroxidase enzyme in hyperglycemic wistar rats. The most effective dose is a dose of 400 mg / kg BB of rat that shows the highest activity and is equivalent to positive control.

Keywords : red gedy leaf, DPPH, glutathione peroxidase, antioxidant

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Diabetes mellitus (DM) merupakan penyakit gangguan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia yang berhubungan dengan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein yang disebabkan oleh penurunan sekresi insulin atau penurunan sensitivitas insulin, atau keduanya dan menyebabkan komplikasi kronis mikrovaskular, makrovaskular, dan neuropati (Sukandar *et al.* 2008). Peningkatan kadar gula darah (hiperglikemia) pada DM menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein, dan aktivasi jalur metabolisme poliol yang selanjutnya mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif (Ueno *et al.* 2002).

Pembentukan senyawa oksigen reaktif tersebut dapat meningkatkan modifikasi lipid, DNA, dan protein pada berbagai jaringan. Modifikasi molekuler pada berbagai jaringan tersebut mengakibatkan ketidak seimbangan antara antioksidan protektif (pertahanan antioksidan) dan peningkatan produksi radikal bebas, hal ini merupakan awal kerusakan oksidatif yang dikenal sebagai stress oksidatif. Lebih lanjut, stress oksidatif juga memiliki kontribusi pada perburukan dan perkembangan kejadian komplikasi (Setiawan dan Suhartono 2005).

Adanya stress oksidatif pada diabetes dikaitkan dengan terjadinya komplikasi pada penyakit diabetes, khususnya karena pembentukan radikal bebas superokksida (Oberley 1998). Luasnya komplikasi pada diabetes tampak berkorelasi dengan konsentrasi glukosa darah sehingga glukosa berlebih diduga menjadi penyebab utama kerusakan jaringan (Rahbani-Nobar *et al.* 1999). Sumber stress oksidasi pada DM diantaranya perpindahan keseimbangan reaksi redoks karena perubahan metabolisme karbohidrat dan lipid yang akan meningkatkan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dari reaksi glikasi dan oksidasi lipid sehingga menurunkan sistem pertahanan antioksidan di antaranya glutation tereduksi (GSH) (Halliwell dan Gutteridge 1999).

Senyawa antioksidan sintetik maupun alami (dari berbagai tanaman) mampu mengontrol kadar glukosa darah dan mencegah komplikasi diabetes, dilihat dari adanya aktivitas antioksidan dan hipoglikemik dari senyawa aktif golongan polifenol pada tanaman (Widiowati 2008). Polifenol mempunyai kemampuan untuk menghambat reaksi oksidasi dan menangkap radikal bebas. Polifenol juga mempunyai aktivitas sebagai antioksidan dan antiradikal (Burda dan Oleszek 2001).

Berdasarkan penelitian, senyawa-senyawa yang mempunyai potensi sebagai antioksidan umumnya merupakan senyawa flavonoid, fenol dan alkaloid. Senyawa flavonoid dan polifenol bersifat antioksidan, antidiabetes, antikanker, antiseptik dan antiinflamasi, sedangkan alkaloid mempunyai sifat antineoplastik yang juga ampuh menghambat pertumbuhan sel-sel kanker (Atta *et al.* 2001).

Daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L. medik) merupakan salah satu tanaman yang memiliki potensi sebagai antioksidan alami untuk pengobatan penyakit degeneratif, salah satunya diabetes melitus. Daun gedi merah merupakan tanaman yang tumbuh di Sulawesi Utara khususnya kota Manado. Oleh masyarakat Sulawesi Utara, Daun gedi merah dipercaya dapat menyembuhkan berbagai penyakit seperti diabetes dan hipertensi. (Suoth 2013). Daun gedi merah mengandung senyawa antioksidan alami yaitu flavonoid dan senyawa fenolik yang mampu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas (Chumbale 2013).

Flavonoid sebagai salah satu kelompok senyawa fenolik yang banyak terdapat pada jaringan tanaman dapat berperan sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan flavonoid bersumber pada kemampuan mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam (Redha 2010). Flavonoid dapat memperbaiki sensitivitas reseptor insulin (Song *et al.* 2005).

Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo*. Pengujian secara *in vitro* dapat menggunakan metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*). Metode ini sederhana. Metode DPPH memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. Pengujian antioksidan secara *in vivo* dapat dilakukan dengan melihat status antioksidan endogen, salah satunya terhadap enzim glutation peroksidase (Gpx) pada jaringan hepar tikus

diabetes yang diinduksi STZ-NA. Gpx sebagai enzim peredam (*quenching*) radikal bebas merupakan enzim yang berperan penting dalam melindungi organisme dari kerusakan oksidatif (Sen *et al.* 2010).

Daun gedi merah digunakan oleh masyarakat Sulawesi Utara sebagai obat tradisional untuk antidiabetes masih kurang informasi ilmiahnya, maka pada penelitian ini perlu dilakukan pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol Daun gedi merah terhadap radikal bebas DPPH dan enzim glutation peroksidase pada tikus diabetes.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang dikemukakan di atas dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

Pertama, apakah ekstrak etanol daun gedi merah memiliki aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH?

Kedua, apakah dari ekstrak etanol daun gedi merah mampu meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase pada tikus yang diinduksi streptozotosin-nikotinamid?

Ketiga, berapakah dosis ekstrak etanol daun gedi merah yang paling kuat dalam meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

Pertama, mengetahui aktivitas ekstrak etanol daun gedi merah sebagai antioksidan terhadap radikal bebas DPPH.

Kedua, mengetahui aktivitas ekstrak etanol daun gedi merah mampu meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase pada tikus yang diinduksi streptozotosin-nikotinamid.

Ketiga, mengetahui dosis ekstrak etanol daun gedi merah yang paling kuat dalam meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase.

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi atau pengetahuan bagi masyarakat umum, mengenai khasiat dari ekstrak etanol daun gedi merah sebagai salah satu obat alternatif untuk penderita penyakit diabetes mellitus. Menambah referensi serta bahan acuan untuk penelitian lebih lanjut mengenai ekstrak etanol daun gedi merah sebagai antidiabetes.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Gedi

1. Klasifikasi

Dalam sistem klasifikasi tumbuhan, tanaman gedi diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyte
Subdivisi : Angiospermae
kelas : Monocotyledonae
Ordo : Malvales
Famili : Malvaceae
Genus : abelmoschus
Spesies : *Abelmoschus manihot* L (Kayadu 2013)

2. Nama lain

Gedi (Sulawesi), Gidi (Minahasa), nating, iyondong kuei, maree (Sulawesi Utara), degi(Ternate), ki dedi, edi (Jawa) dan singa depa (Sunda) (Sutarto 2007)

3. Deskripsi

Tanaman gedi berasal dari suku Malvaceae yaitu suku yang sama dengan tanaman kembang sepatu. Tanaman ini merupakan tumbuhan tahunan yang berbatang tegak dengan tinggi tanaman sekitar 1,2 – 1,8 meter dan permukaan kulit batang licin atau sedikit kasar (Kayadu 2013).

Daun gedi berwarna hijau gelap dengan bentuk menjari dan tekstur tepian daun yang bergelombang. Pertulangan daun gedi menonjol pada permukaan serta memiliki tangkai daun yang panjang. Daun gedi tersusun berseling dan bervariasi dalam bentuk, ukuran, warna pigmentasi dan pigmentasi. Ukuran panjang daun mencapai 10-40 cm sebanyak 3-7helai (Kayadu 2013)

Bunga berukuran besar dan berbentuk lonceng dengan diameter 4-8cm. tangkai bunga gedi berukuran pendek dan berbulu halus. Buah gedi berbentuk

kapsul dengan panjang 5-20 cm tanaman gedi memiliki biji berbentuk bulat dan berwarna coklat dengan diameter 2-4cm (kayadu 2013)

4. Etiologi

Tanaman gedi tumbuh subur di lingkungan tropis pada dataran rendah dengan ketinggian 0-500 m tetapi masih dapat tumbuh hingga mencapai ketinggian 1200 m dpl. Tanaman gedi memerlukan distribusi curah hujan yang merata sepanjang tahun dengan curah hujan 1200 mm per tahun (Kayadu 2013).

Gedi mampu tumbuh pada berbagai jenis tanah, tetapi akan tumbuh dengan baik pada jenis tanah lempung berpasir dan tanah liat dengan pH antara 5-7. Pertumbuhannya akan terhambat pada tanah-tanah yang sangat basa karena terjadi defisiensi unsur mikro dan kekeringan (kayadu 2013)

5. Kandungan kimia dan kegunaan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Jefri *et al* (2015), ditemukan bahwa daun gedi merah mengandung senyawa flavonoid, saponin, tanin, quinon, steroid dan alkaloid.

Tanaman ini mengandung quercetin-3-o- robinobiosid, hyperin, isoquercetin, gossipetin-8-oglukuronoid, dan Myricetin. Sedangkan bunganya mengandung quercetin- 3- robinoside, quersetin-o-glikosida, hyperin, myrecetin, antosianin dan hyperoside (Lin- lin *et al.* 2007).

Selain itu, pada bunga tanaman ini juga mengandung myricetin, cannabiscitrin, myricetin-3-0-beta-D-glucopyranoside, glycerolmonopalmitate, asam 2,4-dihidroksi benzoat, guanosin, adenosin, asam maleat, heptatriacontanoic, asam 1- triakontanol, tetracosane, beta sitosterol, dan beta-sitosterol-3-0-beta-D-glukosida yang memiliki efek sebagai antidiabetes dan antiinflamasi (Sarwar, *et al.* 2011).

Penelitian lain Chumbhale (2013), tentang kandungan fenolik yang terdapat dalam daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L) melaporkan adanya kandungan flavonoid yaitu flavon, flavonol, isoflavon, antosianin dan proantosianin.

Beberapa pengalaman secara empiris menyatakan bahwa tanaman gedi merah (*Abelmoschus manihot* L) dapat dijadikan sebagai obat diare, obat usus

buntu dan berkhasiat untuk mempercepat proses melahirkan. Daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L) yang direbus tanpa garam, digunakan untuk mengobati beberapa penyakit, antara lain sakit ginjal, maag dan kolesterol tinggi (mamahit dan soekamto 2010)

Di Papua, daunnya banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional usai persalinan bagi ibu hamil, daunnya dipercaya mampu meningkatkan produksi ASI bagi ibu yang sedang menyusui (Assagaf, 2013)

Di daerah kecamatan Pineleng kabupaten Minahasa bahwa daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L) dapat dimanfaatkan sebagai penanganan herbal yang dapat menyembuhkan beberapa penyakit, seperti diabetes, kolesterol dan hipertensi (Adeline, 2015).

B. Tinjauan Fitokimia

1. Alkaloid

Alkaloid merupakan suatu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam. Hampir seluruh alkaloid berasal dari berbagai jenis tumbuhan. Semua alkaloid mengandung atom nitrogen yang bersifat basa dan merupakan bagian dari cincin heterosiklik (Ahmad 1986) dalam ikatan primer, sekunder, atau kuartener, dan bersifat basa, serta pada umumnya berasa pahit dan mempunyai aksi farmakologi tertentu (Robinson 1995). Alkaloid merupakan zat golongan tumbuhan sekunder yang terbesar. Alkaloid mempunyai kegiatan fisiologi yang menonjol dan sering digunakan secara luas dalam bidang pengobatan (Harborne 1987). Alkaloid terbukti mempunyai kemampuan regenerasi sel β pankreas yang rusak (Arjadi dan Susatyo 2010).

2. Saponin

Saponin merupakan glikosida yang aglikonnya berupa sapogenin, tersebar luas di tanaman tinggi. Saponin dapat dideteksi dengan pembentukan larutan koloidal dengan air yang apabila digojog menimbulkan buih yang stabil (Gunawan dan Mulyani 2007). Saponin larut dalam air dan etanol tetapi tidak larut dalam eter (Robinson 1995). Saponin mempunyai bagian utama berupa turunan triterpen dengan sedikit steroid. Residu gula dihubungkan oleh gugus OH biasanya C_3 -OH dari aglikon (*monodesmoside saponin*) dan jarang dengan 2

gugus OH atau satu gugus OH dan satu gugus karboksil (Mustarichie *et al.* 2011). Saponin (triterpenoid, steroidal glikosides) mempunyai aktivitas menstimulasi pelepasan insulin dan memblok pembentukan glukosa dalam aliran darah (Bhushan *et al.* 2010).

3. Flavonoid

Flavonoid merupakan bagian dari senyawa fenolik, golongan ini memberikan warna pada buah dan bunga. Flavonoid adalah senyawa fenolik yang terhidrosilasi dan merupakan senyawa C₆-C₃-C₆ dimana C₆ diganti dengan cincin benzene dan C₃ adalah rantai alifatik yang terdiri dari cincin piran. Ada 7 tipe flavonoid yaitu flavon, flavanon, flavonon, flavanol, khalkon, antosianin, dan isoflavon (Mustarichie *et al.* 2011). Flavonoid tersebut dapat bersifat sebagai antidiabetes karena flavonoid mampu berperan sebagai senyawa yang menekan kadar glukosa dan meningkatkan aktivitas glukokinase hepatis dengan meningkatkan pelepasan insulin dari pankreas (Bhushan *et al.* 2010).

4. Tanin

Tanin adalah senyawa polifenol yang memiliki berat molekul cukup tinggi (>1000) dan dapat membentuk kompleks dengan protein. Tanin terdapat luas dalam tumbuhan pembuluh. Tanin adalah golongan bahan yang memberikan rasa kesat dan pahit. Sifat utama tanin adalah mampu berikatan dengan protein (Heinrich 2009). Tanin memiliki aktivitas dalam menurunkan kadar glukosa darah yaitu dengan meningkatkan glikogenesis. Selain itu, tanin juga berfungsi sebagai adstringen atau pengkelat yang dapat mengkerutkan membran epitel usus halus sehingga mengurangi penyerapan sari makanan dan menghambat asupan gula sehingga laju peningkatan gula darah tidak terlalu tinggi (Meidiana dan Widjanarko 2014).

C. Simplisia

1. Pengertian

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 dari 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. Pengumpulan

Bagian simplisia yang diambil dari tanaman, misalnya daun, bunga, buah, akar atau rimpang karena zat berkhasiat tidak terdapat pada seluruh bagian dari tanaman. Kadangkala ada bagian dari tanaman justru beracun dan tidak dikehendaki. Bila yang dikumpulkan daun sebaiknya tidak tercampur dengan bagian lain dari tanaman seperti biji, bunga, atau tangkai. Pengumpulan simplisia juga perlu memperhatikan kondisi khusus, misalnya pemanenan daun yang dilakukan sewaktu daun masih muda atau ketika masih tunas (Dalimarta 2008).

3. Pencucian dan pengeringan

Pencucian simplisia bertujuan untuk melepaskan kotoran (tanah, debu, dan kotoran lainnya) yang melekat pada tanaman obat sehingga mikroba atau kotoran yang dapat merusak dan mengubah komposisi zat pada tanaman dapat dihilangkan. Proses pencucian dilakukan dengan cara mengalirkan air bersih pada simplisia sehingga kotoran dapat terlarut dan terbuang. Kualitas air yang digunakan untuk membersihkan simplisia harus air bersih yang tidak mengandung mikroba atau logam, air yang digunakan disarankan dengan air tanah yang bersih (Dalimarta 2008).

Pengeringan simplisia bertujuan mengurangi kadar air simplisia, sehingga simplisia tidak mudah rusak, berjamur, atau kandungan bahan aktif berubah jika disimpan dalam waktu cukup lama. Sebelum proses pengeringan, simplisia seperti rimpang, batang, atau kulit kayu dipotong kecil-kecil untuk mempercepat proses pengeringan. Pengeringan dilakukan secara alami, dilakukan dengan menjemur di bawah sinar matahari langsung. Simplisia ini dihamparkan merata setipis mungkin

dengan alas tikar atau plastik dengan sambil sering dibalik agar keringnya merata (Dalimarta 2008).

D. Ekstraksi

1. Pengertian

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ekstraksi biasa digunakan untuk memisahkan dua zat berdasarkan perbedaan kelarutan yang berbeda dari komponen-komponen tersebut. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman (Mukhriani 2014). Pemilihan penyari harus mempertimbangkan banyak faktor. Cairan penyari yang baik harus memenuhi kriteria yaitu murah, mudah diperoleh stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak menguap, tidak mudah terbakar, selektif hanya menarik zat berkhasiat dan tidak mempengaruhi zat berkhasiat (Agoes 2007).

2. Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau pelarut yang tersisa diberlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang ditetapkan (Simanjuntak 2008).

3. Maserasi

Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Kerugian utama dari metode maserasi ini adalah memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa akan sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun di sisi lain, metode

maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Mukhriani 2014).

4. Pelarut

Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus 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 dan air. Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 96%. Keuntungan penggunaan etanol 96% adalah tidak beracun dan tidak berbahaya. Robinson (2005) menyatakan suatu senyawa fenol dengan gugus hidroksil yang memiliki sifat polar dapat diekstraksi menggunakan pelarut polar yaitu etanol 96%.

E. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus adalah suatu kelompok penyakit metabolismik dengan karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin maupun kedua-duanya. Gejala yang timbul disebabkan oleh adanya peningkatan kadar glukosa darah akibat penurunan sekresi insulin (Soegondo 2013).

1. Klasifikasi

Jenis diabetes mellitus menurut organisasi kesehatan dunia (WHO) yaitu :

1.1 Diabetes mellitus tipe 1. Diabetes mellitus tipe 1 (Diabetes Mellitus yang tergantung insulin [*Insulin Dependent Diabetes Mellitus/ IDDM*]) merupakan 5-10 persen dari semua kasus diabetes mellitus, biasanya ditemukan pada anak atau orang dewasa dan tidak ada pembentukan insulin sehingga penderita memerlukan suntikan insulin setiap hari. Pada diabetes mellitus tipe 1 terjadi pada sel β Langerhans sehingga mengakibatkan produksi insulin berhenti atau sedikit sekali (Nugroho 2012).

1.2 Diabetes mellitus tipe 2. Diabetes mellitus tipe 2 yaitu adanya resistensi insulin atau gangguan sekresi insulin. Pada tipe 2 ini tidak selalu dibutuhkan insulin, kadang-kadang cukup dengan diet dan antidiabetik oral. Karenanya tipe ini sering disebut dengan *noninsulin dependent diabetes mellitus*

atau NIDDM (Robbins *et al.* 2007). Disebabkan oleh dua hal yaitu respon jaringan terhadap insulin atau sering disebut dengan resistensi insulin dan penurunan produksi insulin akibat regulasi sekresinya terganggu atau terjadi kerusakan fungsional pada sel β Langerhans. Sebagian besar penderita diabetes mellitus tipe 2 disebabkan karena kegemukan karena kelebihan makanan (Nugroho 2012).

Patogenesis diabetes mellitus tipe 2 lebih sedikit diketahui, meskipun tipe ini sering ditemukan. Pada diabetes tipe ini dapat terjadi akibat efek genetik dan juga dipengaruhi oleh lingkungan. Dua efek metabolisme yang menandai diabetes mellitus tipe 2 adalah gangguan sekresi insulin pada sel β dan ketidakmampuan jaringan perifer merespon insulin (Robbins *et al.* 2007).

1.3 Diabetes mellitus gestasional. Diabetes mellitus yang terjadi pada kehamilan toleransi terhadap glukosa secara normal berfluktuasi selama kehamilan. Sebagian besar perempuan dengan diabetes mellitus gestasional memperlihatkan pemulihan kadar glukosa normal setelah persalinan (Sacher dan Mc Pherson 2004).

1.4 Diabetes mellitus lain. Diabetes mellitus tipe lain merupakan diabetes mellitus yang timbul akibat penyakit lain yang mangakibatkan gula darah meningkat misalnya infeksi berat, pemakaian obat kortikosteroid dan lain-lain. Dalam klasifikasi diabetes mellitus ini individu mengalami hiperglikemia akibat kelainan spesifik seperti kelainan genetik fungsi sel β dan endokrinopati (Nabyl 2012).

2. Gejala

Gejala Diabetes Mellitus dapat digolongkan menjadi gejala akut dan gejala kronik (Parkeni 2011).

2.1 Gejala akut diabetes mellitus. Permulaan gejala yang ditunjukkan oleh penderita DM meliputi yaitu banyak makan (poliphagi), banyak minum (polidipsi) dan banyak kencing (poliuri). Gejala utama penderita diabetes yaitu poliuri (peningkatan pengeluaran urin) karena air mengikuti glukosa yang keluar melalui urin (Corwin 2009). Keadaan tersebut jika tidak segera diobati maka akan timbul gejala banyak minum, banyak kencing, nafsu makan mulai berkurang atau

berat badan turun dengan cepat (turun 5-10 kg dalam 2-4 minggu), mudah lelah dan apabila tidak lekas diobati akan timbul rasa mual, bahkan penderita akan jatuh koma yang disebut dengan koma diabetic (Parkeni 2011).

2.2 Gejala kronik diabetes mellitus. Gejala kronik yang sering dialami oleh penderita DM adalah kesemutan, kulit terasa panas, atau seperti tertusuk-tusuk jarum, rasa tebal di kulit, kram, capai, mudah mengantuk, mata kabur, biasanya sering ganti kacamata, gatal sekitar kemaluan terutama wanita, gigi mudah goyah dan mudah lepas, kemampuan seksual menurun, bahkan impotensi dan para ibu hamil sering mengalami keguguran atau kematian janin dalam kandungan, atau dengan bayi berat lahir lebih dari 4 kg (Soegondo 2013).

3. Diagnosis

Diagnosa DM harus didasarkan atas pemeriksaan kadar gula darah. Uji diagnostik DM dilakukan pada mereka yang menunjukkan gejala DM. Kepastian diagnostik diabetes mellitus umumnya berdasarkan adanya gejala dan keluhan serta hasil pemeriksaan glukosa darah sewaktu ≥ 200 mg/dl (dalam plasma) dan kadar gula darah puasa ≥ 126 mg/dl dan ≥ 110 mg/dl (darah kapiler) (Sudoyo *et al.* 2006).

Pemeriksaan yang dapat dilakukan untuk mendiagnosis diabetes mellitus antara lain adalah pemeriksaan urin untuk mendeteksi adanya glukouria. Pemeriksaan darah yang meliputi glukosa darah puasa, glukosa darah sewaktu, tes toleransi glukosa oral (TTGO), glukosa darah kapiler dan tes glikohemoglobin (HbA1c) (Porth dan Matfin 2009).

4. Manifestasi klinik

Penderita diabetes mellitus tipe 1 biasanya memiliki tubuh yang kurus dan cenderung berkembang menjadi diabetes ketoasidosis karena insulin sangat kurang disertai peningkatan hormon glukagon. Sejumlah 20-40% pasien mengalami diabetes ketodiasis setelah beberapa hari mengalami poliuria (pengeluaran urin secara berlebihan), polidipsi (minum air secara berlebihan), poliphagi (makan secara berlebihan) dan kehilangan berat badan (Sukandar *et al.* 2008).

Pasien dengan diabetes mellitus tipe 2 sering asimptomatik. Munculnya komplikasi dapat mengindikasikan bahwa pasien telah menderita diabetes mellitus selama bertahun-tahun, umumnya muncul neuropati dan terdeteksi letargi, poliuri, nokturia dan polidipsi sedangkan penurunan bobot badan secara signifikan jarang terjadi (Sukandar *et al.* 2008).

5. Stress oksidatif pada diabetes

Pada DM pertahanan antioksidan dan sistem perbaikan seluler akan terangsang sebagai respon tantangan oksidatif (Nuttal *et al.* 1999). Sumber stress 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 (Kowluru 2001). Kemaknaan stress oksidatif pada patologi penyakit sering tidak tentu (Halliwell dan Gutteridge 1999). Dengan demikian stress oksidatif dan gangguan pertahanan antioksidan merupakan keistimewaan DM yang terjadi sejak awal penyakit. Di samping itu, stress oksidatif juga memiliki kontribusi pada perburukan dan perkembangan kejadian komplikasi. Beberapa studi mengungkapkan penurunan status antioksidan dalam plasma dan serum sampel dibandingkan kontrol berdasarkan usia. Fenomena ini dapat terjadi sejak anak-anak serta berjalan secara progresif dan memburuk sesuai perjalanan waktu dan berkembangnya komplikasi (Nuttal *et al.* 1999).

Diabetes pada anak ditemukan penurunan glutation eritrosit, glutation total, α -tokoferol plasma, dan β -karoten plasma secara bermakna. Penurunan berbagai antioksidan tersebut terkait dengan pembentukan senyawa penanda adanya stress oksidatif, misalnya peningkatan lipid hidroperoksida, diena terkonjugasi, dan protein karbonil secara bermakna (Haffner 1999). Pada diabetes usia 50-60 tahun ditemukan peningkatan peroksidasi lipid sejak onset diabetes.

DM merupakan salah satu kelainan metabolismik yang dapat menimbulkan komplikasi vascular dan nonvascular. Salah satu hipotesis penyebab munculnya berbagai komplikasi tersebut adalah stress oksidatif. Pada diabetes terdapat tiga jalur munculnya stress oksidatif, yaitu autooksidasi glukosa, glikasi protein nonenzimatik, dan jalur poliol sorbitol (aldose reduktase).

5.1 Autooksidasi glukosa. Proses autooksidasi glukosa dikatalisis oleh senyawa logam dalam jumlah kecil seperti besi dan seng. Hasil katalisis tersebut adalah senyawa oksigen reaktif. Autooksidasi glukosa terjadi pada fase I proses glikasi nonenzimatik pada protein yang secara alamiah masih bersifat reversibel. Fase ini merupakan sumber hidrogen peroksid yang mampu menghambat Cu/Zn SOD, selain hidrogen peroksid, radikal superoksid juga dihasilkan oleh proses autooksidasi glukosa tersebut serta terkait dengan pembentukan protein glikasi dalam plasma penderita diabetes. Akibat yang ditimbulkan berupa peningkatan aktivitas radikal superoksid serta kerusakan enzim superoksid dismutase (Soesilowati 2003; Droege 2002).

5.2 Glikasi protein nonenzimatik. Keadaan hiperglikemia menyebabkan produksi berbagai pereduksi antara lain glukosa, glukosa-6-fosfat, dan fruktosa akan meningkat melalui proses glikolisis dan jalur poliol. Glukosa sebagai gula pereduksi dapat menjadi agen yang bersifat toksik. Sifat toksik tersebut disebabkan oleh kemampuan kimiawi gugus karbonil aldehid yang dimilikinya. Meskipun sebagian besar keberadaan gula pereduksi dalam larutan sebagai struktur cincin nonaldehid, glukosa dalam bentuk rantai lurusnya merupakan aldehid (Rahbani-Nobar *et al.* 1999). Aldehid merupakan senyawa yang mampu berikatan secara kovalen sehingga terjadi modifikasi protein. Modifikasi protein dapat dibangkitkan dalam tubuh melalui berbagai mekanisme enzimatik dan nonenzimatik (Anderson *et al.* 1999).

Selain glukosa, semua jenis gula pereduksi juga mampu menyebabkan reaksi glikasi pada bermacam protein, target kerusakan lain adalah lipid-amino seperti *fosfatidiletanolamin*, dan DNA (Rahbani-Nobar *et al.* 1999). Reaksi pengikatan aldehid pada protein dikenal sebagai reaksi glikasi. Hewan dengan diabetes, proses glikasi dapat teramat secara luas pada berbagai organ dan jaringan termasuk ginjal, hati, otak, paru dan saraf (Oldfield *et al.* 2001). Secara keseluruhan, perubahan kimia ini dikenal sebagai reaksi Maillard (Beckman *et al.* 2001).

Reaksi Maillard dapat terjadi pada kondisi penuaan fisiologis *in vivo* sebaik kondisi *in vitro* serta meningkat pada keadaan hiperglikemia (Oldfield *et*

al. 2001; Ueno *et al.* 2002). Selain itu reaksi maillard juga berkaitan dengan komplikasi kronik DM. Reaksi ini secara umum terdiri atas 4 tahap, meliputi kondensasi nonenzimatis gula pereduksi, aldehid atau ketosa dengan gugus amino bebas dari protein atau asam nukleat membentuk glikosilamin. Reaksi ini dikenal sebagai fase satu serta secara alamiah bersifat *reversibel* dan terjadi dalam beberapa jam (kurang dari 24 jam). Selanjutnya pada fase kedua akan terjadi penataan ulang glikosilamin menjadi produk Amadori. Reaksi ini terjadi akibat kadar glukosa yang masih tinggi dalam waktu lebih dari 24 jam. Produk Amadori tersebut bersifat toksik bagi jaringan namun masih reversible. Kadar produk Amadori pada sejumlah protein meningkat sebanding dengan derajat hiperglikemia pada DM, kemudian pada fase ketiga, penataan ulang dan dehidrasi berganda produk Amadori menjadi amino atau senyawa karnonil reaktivitas tinggi seperti *3-deoxyglucosane*. Fase terakhir reaksi antara senyawa karbonil dengan gugus amino lain dilanjutkan proses penataan ulang membentuk beragam *advance glycosylation end products* (AGE-product/AGEs) sebagai petunjuk *cross linking* dan *browning* pada protein (Soesilowati 2003).

AGEs merupakan salah satu produk penanda modifikasi protein sebagai akibat reaksi gula pereduksi terhadap asam amino. Akumulasi AGEs di berbagai jaringan merupakan sumber utama radikal bebas yang mampu berperan dalam peningkatan stress oksidatif, serta terkait dengan patogenesis komplikasi diabetes mirip pada penuaan yang normatif. Pada diabetes, akumulasi AGEs secara umum mempercepat terjadinya aterosklerosis, nefropati, neuropati, retinopati, serta katarak. Pengikatan AGEs terhadap reseptor makrofag spesifik (RAGE) mengakibatkan sintesis sitokin dan faktor pertumbuhan serta peningkatan stress oksidatif (Ueno *et al.* 2002).

5.3 Jalur poliol-sorbitol (aldose reduktase). Normoglikemia, sebagian besar glukosa seluler mengalami fosforilasi menjadi glukosa-6-fosfat oleh enzim heksokinase. Bagian kecil dari glukosa yang tidak mengalami fosforilasi memasuki jalur poliol, yakni jalur alternatif metabolisme glukosa (Ueno *et al.* 2002). Melalui jalur ini, glukosa dalam sel dapat diubah menjadi sorbitol dengan bantuan enzim aldose reduktase (AR) (Nishimura 1998). Enzim aldose

reduktase dapat ditemukan pada sejumlah jaringan mamalia termasuk lensa dan retina. Enzim tersebut mengkonversi glukosa menjadi polialkohol sorbitol dan retinol. Enzim tersebut mengkonversi glukosa menjadi polialkohol sorbitol melalui reduksi gugus aldehid glukosa (Rahbani-Nobar *et al.* 1999).

Dalam keadaan normal, konsentrasi sorbitol di dalam sel rendah. Akan tetapi, apabila terjadi keadaan hiperglikemia konsentrasi sorbitol meningkat. Sorbitol dengan bantuan enzim sorbitol dehydrogenase (SDH), akan diubah menjadi fruktosa. Degradasi sorbitol ini berjalan lambat sehingga sorbitol menumpuk dalam sel, sehingga dapat menyebabkan peningkatan tekanan osmotik dan selanjutnya dapat merusak sel (Nishimura 1998).

Masuknya substrat (substrat flux) melalui jalur poliol, selain dapat meningkatkan kadar sorbitol dan fruktosa intraseluler, juga menurunkan rasio NADPH terhadap NADP+. Selain itu, rasio NADH terhadap NAD+ sitosolik juga menurun. Berkurangnya NADPH di dalam sel akibat meningkatnya AR dapat menghambat aktivitas enzim lain yang membutuhkan NADPH.

F. Antioksidan

Antioksidan adalah sebuah molekul yang dapat mencegah oksidasi molekul lain, berperan penting dalam melindungi sel dari kerusakan dengan kemampuan memblokir proses kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas. Antioksidan melindungi sel dari kerusakan radikal bebas dengan menyumbangkan elektron ke radikal bebas sehingga menstabilkan dan menghentikan reaksi berantai, atau dengan menerima satu elektron tidak berpasangan bertujuan untuk menstabilkan radikal bebas dan mencegah kerusakan protein, DNA dan lipid. Antioksidan menyumbangkan elektron pada radikal bebas untuk menghentikan reaksi berantai, antioksidan itu sendiri berubah menjadi radikal bebas. Reaktivitas dari antioksidan tidak sereaktif radikal bebas sehingga tidak berbahaya dan dapat dinetralkan dengan antioksidan lain (Draelos 2010)

1. Klasifikasi

1.1 Antioksidan endogen. Antioksidan endogen yaitu sejumlah komponen protein dan enzim yang disintesis dalam tubuh yang berperan dalam

menangkal oksidasi oleh radikal bebas yang terdiri dari katalase, superoksid dismutase, serta protein yang berikatan dengan logam seperti transferin dan seruloplasmin. Antioksidan endogen dibagi menjadi dua kelompok antioksidan enzimatis dan antioksidan non-enzimatis. Antioksidan enzimatis seperti enzim superokida dismutase (SOD), katalase dan glutation peroksidase (GPx). Sedangkan antioksidan non-enzimatis dibagi menjadi dua 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.

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

2. Berdasarkan mekanisme kerjanya

2.1 Antioksidan primer. Antioksidan primer disebut juga antioksidan enzimatis, suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan primer, apabila dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal, kemudian radikal antioksidan yang terbentuk segera berubah menjadi senyawa yang lebih stabil. Antioksidan primer bekerja dengan cara mencegah pembentukan senyawa radikal bebas baru atau mengubah radikal bebas yang telah terbentuk menjadi molekul yang kurang reaktif (Youngson 2005).

2.2 Antioksidan sekunder. Antioksidan sekunder disebut juga antioksidan eksogenus atau antioksidan non-enzimatis. Antioksidan dalam kelompok ini juga disebut sistem pertahanan preventif. Dalam sistem pertahanan ini, terbentuknya senyawa oksigen reaktif dihambat dengan cara pengelatan metal atau dirusak pembentukannya, pengelatan metal terjadi dalam cairan ekstraselular. Antioksidan non-enzimatis dapat berupa komponen non-nutrisi dan komponen nutrisi dari sayuran dan buah-buahan. Kerja sistem antioksidan non-enzimatik yaitu dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkapnya akibatnya radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen selular.

Antioksidan sekunder meliputi vitamin C, vitamin E, karoten, flavonoid, asam urat, bilirubin dan albumin. Senyawa antioksidan non-enzimatis bekerja dengan cara menangkap radikal bebas (*free radical scavenger*), kemudian mencegah reaktivitasnya. Ketika jumlah radikal bebas berlebihan, kadar antioksidan non-enzimatik yang dapat diamati dalam cairan biologis menurun (Youngson 2005).

2.3 Antioksidan tersier. Antioksidan tersier meliputi enzim DNA-repair dan metionin sulfoksida reduktase. Enzim-enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas (Youngson 2005).

Tabel 1. Tingkat Kekuatan Antioksidan

Intensitas	Nilai IC ₅₀ (ppm)
Kuat	< 50
Aktif	50-100
Sedang	101-250
Lemah	250-500
Tidak aktif	>500

(Sumber : Jun *et al.* 2003)

3. Mekanisme kerja

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

Radikal bebas dapat berkurang dan diubah menjadi air dengan kerjasama tiga enzim antioksidan utama atau antioksidan endogen yaitu SOD, CAT dan GPx. SOD mengkatalis O₂ ke H₂O₂ (langkah pertama), selanjutnya catalase dan glutation peroksidase mengubah H₂O₂ menjadi H₂O oleh dua jalur yang berbeda. Jika tidak dicegah maka radikal hidroksil dari hidroperoksid akan mengakibatkan kerusakan oksidatif sel seperti kerusakan DNA, karboksilasi dari protein dan lipid peroksidasi, termasuk lipid di membran mitokondria. Sehingga jalur kerusakan oksidatif ini akan berakhir kepada kematian selular (Moron dan Cortazan 2012).

G. Radikal Bebas

1. Pengertian

Radikal bebas adalah atom atau gugus atom apa saja yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Elektron dari radikal bebas yang tidak berpasangan ini sangat mudah menarik elektron dari molekul lainnya sehingga radikal bebas tersebut menjadi lebih reaktif. Senyawa yang dihasilkan oleh polusi, asap rokok, kondisi stress, bahkan oleh sinar matahari akan berinteraksi dengan radikal bebas di dalam tubuh (Hernani dan Rahardjo 2005).

2. Sumber radikal bebas

Sumber radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh (*endogenus*) yang terbentuk sebagai sisa proses metabolisme (proses pembakaran) protein atau karbohidrat dan lemak yang dikonsumsi. Radikal bebas dapat pula diperoleh dari luar tubuh (*eksogenus*) yang berasal dari polusi udara, asap kendaraan motor, asap rokok, berbagai bahan kimia, makanan yang terlalu hangus dan lain sebagainya. Beberapa contoh radikal bebas antara lain : anion superoksida, radikal hidroksil (OH^{\cdot}), nitrit oksida (NO^{\cdot}), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan sebagainya (Windono *et al.* 2001).

3. Mekanisme pembentukan

Tubuh secara terus menerus membentuk radikal oksigen (Khlifi *et al.* 2005). Radikal ini dibentuk melalui mekanisme metabolisme normal. Radikal bebas juga terbentuk akibat respon terhadap pengaruh luar tubuh seperti polusi udara, sinar ultraviolet, asap kendaraan bermotor dan asap rokok. Salah satu unsur kimia sering terlibat dalam pembentukan radikal bebas oksigen. Molekul oksigen (O_2) sangat penting untuk fungsi sel karena memainkan peranan penting dalam serangkaian reaksi biokimia yang terjadi dalam rantai pernapasan yang bertanggung jawab untuk sebagian besar produksi adenosine trifosfat (ATP), yang menyediakan energi yang dibutuhkan untuk banyak reaksi seluler dan fungsi. Sumber radikal bebas terjadi melalui sederetan mekanisme reaksi, yang pertama pembentukan awal radikal bebas (inisiasi), lalu perambatan atau terbentuknya

radikal baru (propagasi). Tahap terakhir yaitu pengubahan menjadi radikal bebas stabil dan tidak reaktif. Autooksidan adalah senyawa yang mengandung ikatan rangkap, hydrogen alilik, benzilik atau tersier yang rentan terhadap oksidan oleh udara (Winarsi 2007).

Radikal bebas dapat bereaksi dengan radikal bebas yang lain atau dengan molekul non radikal. Elektron yang tidak berpasangan dari dua radikal yang saling bertemu akan bergabung dengan membentuk ikatan kovalen dan tidak bersifat sebagai radikal. Radikal yang bertemu dengan spesies non radikal akan menghasilkan radikal baru (Winarsi 2007).

4. Efek radikal bebas

Radikal bebas dibutuhkan tubuh untuk membunuh kuman dalam keadaan normal. Radikal bebas dalam jumlah sangat banyak dan bertemu dengan asam lemak tidak jenuh yang ada di dalam membran sel akan menyebabkan kerusakan oksidatif dan terjadilah proses penuaan.

Radikal bebas sebenarnya penting bagi kesehatan dan fungsi tubuh yang normal dalam memerangi peradangan, membunuh bakteri, dan mengendalikan tonus otot polos pembuluh darah dan organ-organ dalam tubuh kita. Radikal bebas yang dihasilkan melebihi batas proteksi antioksidan seluler, maka akan menyerang sel itu sendiri. Struktur sel yang berubah turut merubah fungsinya, yang akan mengarah pada proses munculnya penyakit (Khomsan 2009).

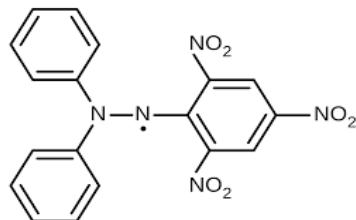
H. Metode Uji Antioksidan *In Vitro*

Beberapa metode pengukuran aktivitas antioksidan yang sering digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan suatu senyawa diantaranya uji DPPH, uji TRAP, uji ABTS, dan uji FRAP.

1. Uji DPPH

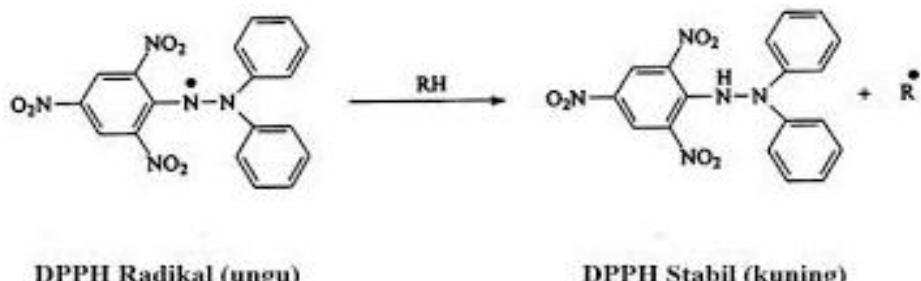
Salah satu metode untuk menentukan aktivitas antioksidan penangkap radikal adalah metode DPPH (*1,1-Diphenyl-2-picrylhidrazyl*). Metode DPPH memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517 nm dengan warna

violet gelap. Penangkap radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang kemudian menyebabkan penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Sunarni 2005).



Gambar 1. Struktur kimia DPPH

Radikal bebas DPPH (*1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl*) jika bereaksi dengan senyawa antioksidan akan berubah menjadi DPPH hidrasin yang berwarna kuning, tingkat perubahan dari warna ungu menjadi warna kuning menunjukkan bahwa radikal bebas DPPH menjadi DPPH hidrasin yang stabil (Narayanaswami dan Duraisami 2011).



Gambar 2. Reaksi antara DPPH dengan H^{\cdot} yang berasal dari senyawa peredam radikal bebas

Menurut Mifta Fauziah berdasarkan studi literatur untuk menentukan IC_{50} , diperlukan persamaan kurva standar dari % inhibisi sebagai sumbu y dan konsentrasi ekstrak antioksidan sebagai sumbu x . IC_{50} dihitung dengan cara memasukkan nilai 50% ke dalam persamaan kurva standar sebagai sumbu y kemudian dihitung nilai x sebagai konsentrasi IC_{50} . Semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan semakin tinggi aktivitas antioksidannya (Molyneux 2004). Dalam hal ini diharapkan bahwa radikal bebas dapat ditangkap oleh senyawa antioksidan hanya dengan konsentrasi yang kecil.

Persen inhibisi dan IC₅₀

Persen inhibisi adalah perbandingan antara selisih dari absorbansi blanko dan absorbansi sampel dengan absorbansi blanko. Persen inhibisi digunakan untuk menentukan persentase hambatan dari suatu bahan yang dilakukan terhadap senyawa radikal bebas. Persen inhibisi dihitung dengan rumus berikut:

$$Pi = [(Ab-As)/Ab] \times 100\%$$

Keterangan:

Pi : Persen inhibisi

Ab : Absorbansi blanko

As : Absorbansi sampel

2. Uji TRAP

Pengujian TRAP (*Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*) bekerja berdasarkan pengukuran konsumsi oksigen selama reaksi oksidasi lipid terkontrol yang diinduksi oleh dekomposisi termal dari AAPH (*Azobis (2-amidinopropane dihydrochloride*) untuk mengukur total aktivitas antioksidan. Hasil uji diekpresikan sebagai jumlah (dalam mikromolar) radikal peroksil yang terperangkap oleh 1liter plasma. Pengukuran serum trap berdasarkan pada penentuan lamanya waktu yang diperlukan oleh serum uji untuk bertahan dari oksidasi buatan (Setyanto 2012).

3. Uji ABTS

Pengujian ABTS (*Azinobis ethyl-Benzo Thiazoline Sulfonic acid*) merupakan substrat dari peroksidase, dimana ketika dioksidasi dengan kehadiran H₂O₂ akan membentuk senyawa radikal kation yang menstabilkan dengan karakteristik menunjukkan absorbansi kuat pada panjang gelombang 414 nm. ABTS merupakan senyawa yang larut air dan stabil secara kimia. Akumulasi dari ABTS dapat dihambat oleh antioksidan pada medium reaksi dengan aktivitas yang bergantung pada waktu reaksi dan jumlah antioksidan. Kemampuan relatif antioksidan untuk mereduksi ABTS dapat diukur dengan menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 734 nm. Absorbansi maksimal juga dapat terjadi pada panjang gelombang yang lain. Panjang gelombang yang mendekati daerah infra merah (734 nm) dipilih untuk meminimalkan interfensi dari absorbansi komponen lainnya. Hasil pengukuran dengan spektrofotometer

selanjutnya dibandingkan dengan standar baku antioksidan sintetik, yaitu trolox yang merupakan analog vitamin E. Hasil perbandingan ini diekspresikan sebagai TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Activity*). TEAC adalah konsentrasi (dalam milimolar) larutan trolox yang memiliki efek antioksidan ekuivalen dengan 1,0 nM larutan zat uji. TEAC mencerminkan kemampuan relatif dari antioksidan untuk menangkap radikal ABTS dibandingkan dengan trolox (Setyanto 2012).

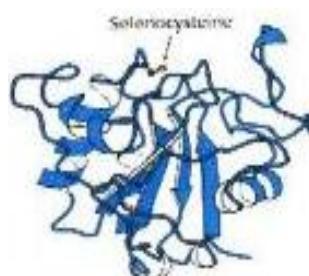
4. Uji FRAP

Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) bekerja berdasarkan pada reduksi dari analog ferroin, kompleks Fe^{3+} dari tripoliditiazin Fe (TPTZ) $^{3+}$ menjadi Fe^{2+} , $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{2+}$ yang berwarna biru intensif oleh antioksidan pada suasana asam. Hasil pengujian diinterpretasikan dengan peningkatan absorbansi pada panjang gelombang 593 nm, sehingga dapat disimpulkan jumlah Fe^{2+} (dalam mikromolar) ekuivalen dengan antioksidan standar (Antolovich *et al.* 2002).

I. Metode Uji Antioksidan *In vivo* Terhadap GPx

Pemeriksaan enzim antioksidan pada hewan uji seperti pemeriksaan peningkatan enzim GPx, SOD dan katalase.

Glutation peroksidase (GPx) merupakan salah satu antioksidan enzimatik yang mencegah kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas dengan mengkatalisis berbagai hidroperokside dan merupakan suatu protein yang memiliki bentuk tetramer. Enzim ini mengandung empat atom selenium yang terikat sebagai *selenocysteine*. Struktur enzim ini dapat dilihat pada gambar di bawah ini:



Gambar 3. Struktur GPx

Penderita diabetes menunjukkan penurunan vitamin E dan glutation. Glutation dalam bentuk tereduksi (GSH) terdapat dalam plasma manusia, intraseluler, dengan kemampuan sebagai antioksidan untuk menghambat radikal bebas dengan fungsi secara umum sebagai *buffer* redoks dan kofaktor enzim glutation peroksidase (GPx) (Setiawan dan Suhartono 2005). Glutation peroksidase akan mereduksi H_2O_2 menjadi H_2O dan Glutation disulfide (GSSH) dengan bantuan Glutation tereduksi (GSH).

GPx terdapat dalam hepar dan sel darah merah dengan konsentrasi tinggi, sedangkan jantung, ginjal, paru-paru, adrenal, lambung dan jaringan adipose mengandung kadar glutation peroksidase dalam kadar sedang. Glutation peroksidase kadar rendah sering ditemukan dalam otak, otot, testis dan lensa mata. Pada penderita nekrosis hati dan penyakit degeneratif aktivitas glutation peroksidase rendah karena terjadi defisiensi selenium (Rohrdanz *et al.* 2002; Chen *et al.* 2002).

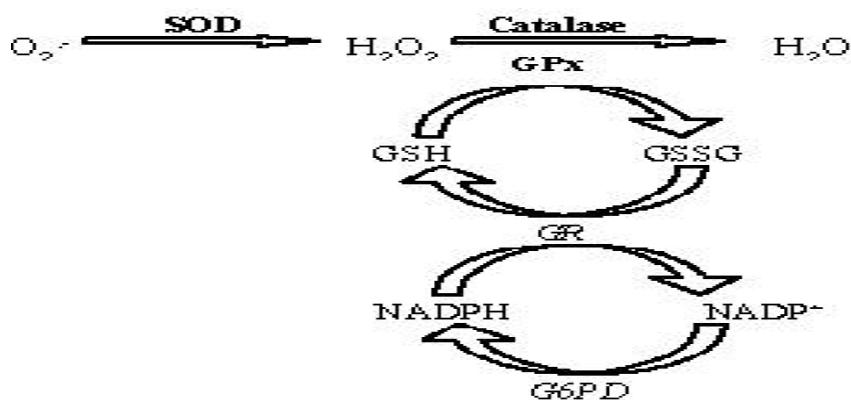
$$\text{Aktivitas GPx} = \frac{(B - B^0)}{(T2 - T1) \times V} \times \text{dilusi sampel} = \text{nmol/menit/ml} = \text{mU/mL}$$

Keterangan :

- B = sampel
- B^0 = kontrol
- T1 = waktu saat pembacaan pertama
- T2 = waktu saat pembacaan kedua
- V = volume sampel pre test ditambah ke sumur pereaksi

Metode pemeriksaan yang dilakukan adalah metode enzimatis dengan menggunakan glutation peroksidase. Glutation peroksidase (GPx) mengkonversi glutation tereduksi (GSH) menjadi glutation teroksidasi (GSSH) sekaligus mengurangi hidroperokside lipid ke beberapa koresponden alkohol atau hidrogen peroksid bebas ke air. Beberapa isozim telah ditemukan di berbagai lokasi seluler dan spesifitas substrat yang berbeda. Rendahnya GPx telah berkorelasi dengan gangguan terkait radikal bebas. Dalam Glutathione peroxidase *assay*, GPx mereduksi *Cumene Hydroperoxide* saat terjadi perubahan GSH ke GSSH. Selanjutnya GSSH yang dihasilkan direduksi menjadi GSH oleh GR dengan mengkonsumsi NADPH. Penurunan NADPH (biasanya diukur pada panjang gelombang 340 nm) sebanding dengan aktivitas GPx (Biovision 2012).

Glutathione peroxidase merupakan enzim *scavenger* terhadap *hydrogen peroxide*, terdapat terutama dalam mitokondria. *Glutathione peroxidase* memerlukan glutathione sebagai substrat, terdapat dalam dua bentuk yaitu glutathione tereduksi (*reduced glutathione* atau GSH) dan glutathione teroksidasi (*glutathione disulfide* atau GSSG). Ketika mengkatalisis perubahan *hydrogen peroxide* (H_2O_2) menjadi H_2O , GSH dioksidasi menjadi GSSG, dan GSSG dapat direduksi kembali oleh NADPH untuk mendapatkan kembali GSH (Marciniak *et al.*, 2009).



Gambar 4. Perubahan *Hydrogen Peroxide* Menjadi Air yang Dikatalisis oleh GPx (Prangdimurti, 2007).

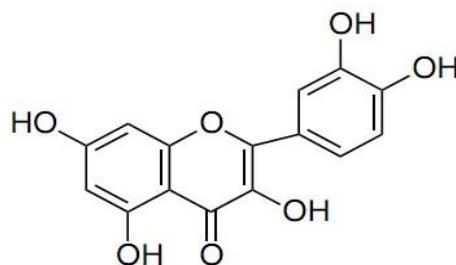
Glutathione peroxidase berpotensi mengubah molekul hidrogen peroksid dengan cara mengoksidasi GSH menjadi GSSG. Glutathione bentuk tereduksi mencegah lipid membran dan unsur-unsur sel lainnya dari kerusakan oksidasi dengan cara merusak molekul hidrogen peroksid dan lipid peroksid (Winarsi, 2007).

J. Kuersetin

Kuersetin (*Quercetin*) adalah salah satu zat aktif kelas flavonoid yang secara biologis amat kuat. Bila vitamin C mempunyai aktivitas antioksidan 1, maka kuersetin memiliki aktivitas antioksidan 4,7. Flavonoid merupakan sekelompok besar antioksidan bernama polifenol yang terdiri atas antosianidin, biflavon, katekin, flavanon, flavon, dan flavonol. Kuersetin termasuk kedalam kelompok flavonol.

Kuersetin dipercaya dapat melindungi tubuh dari beberapa jenis penyakit degenerative dengan cara mencegah terjadinya proses peroksidasi lemak. Kuersetin memperlihatkan kemampuan mencegah proses oksidasi dari *Low Density Lipoproteins* (LDL) dengan cara menangkap radikal bebas dan menghela¹ ion logam transisi. (Resi 2009)

Kuersetin dikategorikan sebagai *flavonol*, salah satu dari enam subclass senyawa flavonoid. *The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* menyebutkan nomenklatur untuk kuersetin adalah *3,3',4',5,7pentahydroxyflavanone*. Kuersetin adalah aglikon. Aglikon adalah komponen bukan gula sedangkan glikon adalah komponen gula. Berbagai flavonol dibuat oleh penempatan diferensial kelompok fenolik-OH dan gula (glikon). Semua flavonol, termasuk kuersetin memiliki kesamaan yaitu *3-hydroxyflavone*. (Siswarni 2017).



Gambar 5. Struktur kimia kuersetin

Kuersetin sering digunakan sebagai pembanding pada uji aktivitas antioksidan karena senyawa ini merupakan antioksidan dari golongan flavonoid yang cukup efektif guna meredam aksi destruktif radikal bebas. Kuersetin merupakan senyawa flavonoid dari kelompok flavonol, tepatnya merupakan glikosida flavonol yang terdiri atas aglikon kuersetin dan rutinosida sebagai gulanya (Susilowati 2010).

K. Streptozotosin dan Nikotinamid

1. Penginduksi streptozotosin (STZ)

STZ merupakan analog nitrosurea dimana *N-metil N-nitrosourea* terikat pada karbon hexose. Aksi racun STZ bersifat alkilasi DNA. STZ adalah selektif

terakumulasi dalam sel β pankreas melalui GLUT 2 dengan afinitas rendah dalam membran plasma (Lenzen, 2007).

Nama kimia STZ adalah 2(deoxy-2(3-methyl-3-nitrosoureido) glucopyranose. STZ digunakan untuk menginduksi DM tipe 1 atau DM tipe 2 pada hewan. Mekanisme STZ adalah terjadinya perpindahan gugus metil menuju molekul DNA, sehingga menyebabkan rantai DNA pada sel β pankreas terputus. Dengan demikian poli (ADP-ribosa) polimerase distimulasi secara berlebihan sehingga menurunkan kadar NAD^+ dan ATP, dengan menipisnya energi yang disimpan pada sel menyebabkan kematian pada sel β , sehingga sintesis proinsulin dihambat dan terjadi hiperglikemia (Lenzen, 2007). Pentingnya transporter glukosa GLUT2 dalam proses ini juga ditunjukkan oleh pengamatan bahwa streptozotocin merusak organ lain yang mengekspresikan transporter ini, khususnya ginjal dan hati. Meskipun streptozotocin juga protein termetilasi, metilasi DNA bertanggung jawab atas kematian sel beta, tetapi kemungkinan bahwa metilasi protein memberikan kontribusi terhadap cacat fungsional dari sel beta setelah terpapar streptozotocin.

2. Penginduksi nikotinamid (NA)

NA adalah vitamin B3 (niacin) yang larut dalam air. NA melindungi sel β pankreas terhadap sitotoksitas STZ. NA bekerja dengan cara menghambat aksi STZ dalam menurunkan biosintesa proinsulin, memperbaiki efek penghambatan sekresi insulin, menghambat kegagalan oksidasi glukosa dan menghambat penurunan kemampuan hidup sel β pankreas akibat STZ. NA juga memberikan efek perlindungan pada sel inset yaitu dengan menurunkan kerusakan DNA akibat STZ. Pemberian NA secara Intraperitoneal atau intravena dapat meminimalkan penurunan berat badan yang disebabkan oleh STZ (Szkudelski, 2012).

L. Glibenklamid

1. Sifat fisika kimia

Kelarutan glibenklamid adalah praktis tidak larut dalam air dan dalam eter, sukar larut dalam etanol dan dalam metanol, larut sebagian dalam kloroform (Depkes 1995 RI).

2. Indikasi dan kontra indikasi

Glibenklamid diindikasikan pada pengobatan diabetes mellitus tipe 2 onset maturitas stabil dan tidak terkomplikasi ringan atau tidak parah, yang tidak dapat diobati hanya dengan diet saja. Kontraindikasi glibenklamid hipersensitif, penderita yang terkomplikasi dengan ketoasidosis, koma diabetik, demam, trauma parah atau gangrene dan penderita fungsi ginjal yang tidak sempurna (Anonim 2008).

3. Dosis dan aturan pakai

Pengobatan dengan glibenklamid dimulai dari dosis rendah (2,5 mg) diberikan pada pagi hari, sedangkan profil mingguan glukosa serum dipantau. Dosis permulaan 1 kali sehari 2,5-5 mg, bila perlu dinaikkan setiap minggu sampai maksimal 2 kali sehari 10 mg (Tan dan Raharja 2002).

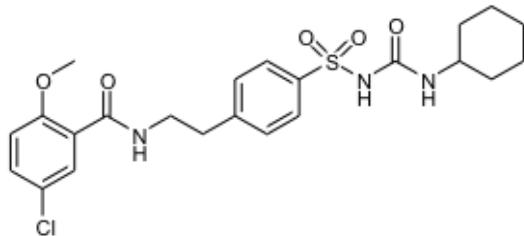
4. Mekanisme kerja

Glibenklamid bekerja dengan menghambat ATP sensitive potassium channel di sel β pankreas, sehingga membantu untuk mengurangi jumlah gula dalam darah orang dengan diabetes tipe 2 (Anonim 2008). Mengurangi kadar glukagon dalam serum, dan meningkatkan pengikatan insulin pada jaringan target dan reseptor (Mycek *et al.* 2001). Satheesh (2004) mengemukakan bahwa glibenklamid memiliki aktivitas antioksidan dimana glibenklamid mampu meningkatkan kandungan GSH dan SOD hewan uji diabetes.

5. Efek samping

Glibenklamid mempunyai efek samping antara lain : gejala saluran cerna berupa mual, diare, sakit perut, hiper sekresi asam lambung. Gejala susunan saraf pusat berupa vertigo, menimbulkan gejala hipertiroidisme dan ikterus obstruktif. Hipoglikemia dapat terjadi pada penderita yang tidak mendapat dosis tepat, tidak

makan cukup, atau dengan gangguan fungsi hati atau ginjal (Sukandar *et al.* 2008).



Gambar 6. Struktur Kimia Glibenklamid

M. Hewan Uji

Hewan uji adalah setiap hewan yang dipergunakan pada sebuah penelitian biologis dan biomedis yang dipilih berdasarkan syarat atau standar dasar yang diperlukan dalam penelitian tersebut. Dalam memperlakukan hewan uji untuk penelitian diperlukan pengetahuan yang cukup mengenai berbagai aspek tentang sarana biologis, dalam hal penggunaan hewan percobaan laboratorium.

1. Sistematika

Sistematika tikus menurut Depkes (2009), sebagai berikut :

Dunia	: Animalia
Filum	: Chordata
Sub Filum	: Vertebrata
Classis	: Mammalia
Sub classis	: Plasentalia
Order	: Rodentia
Familia	: Muridae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i> .

2. Karakteristik utama

Tikus merupakan hewan yang cerdas dan relatif resisten terhadap infeksi. Tikus putih umumnya tenang dan mudah ditangani, tidak begitu fotophobia. Tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*) memiliki berat antara 150-600 g, hidung tumpul dan panjang badannya antara 18-25 cm. kepala dan badan tikus galur

wistar lebih pendek dibandingkan ekornya, serta ukuran telinganya tidak lebih dari 20-33 mm (Anonim 1993).

3. Jenis kelamin

Penelitian ini menggunakan tikus jantan sebab kondisi hormonalnya dinilai lebih stabil dibanding tikus betina yang sangat berfluktuasi pada saat mulai beranjak dewasa, sehingga dikhawatirkan akan memberikan respon yang berbeda dan dapat mempengaruhi hasil penelitian (Anonim 1993).

N. Landasan Teori

Antioksidan adalah sebuah molekul yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas. Mekanisme kerja antioksidan yaitu dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stress oksidatif. Stress oksidatif adalah ketidak keseimbangan antara jumlah radikal bebas dengan pertahanan antioksidan di dalam tubuh, stress oksidatif dapat mengganggu metabolisme sel dan menyebabkan kerusakan DNA, lipid, dan protein. Radikal bebas adalah suatu atom atau molekul yang sangat reaktif dan memiliki elektron yang tidak berpasangan, sehingga sangat mudah untuk menarik elektron dari molekul lain (radikal bebas baru).

Salah satu penyakit yang berhubungan dengan radikal bebas adalah diabetes mellitus. Diabetes mellitus adalah penyakit degeneratif yang ditandai dengan hiperglikemia dan berhubungan dengan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. Diabetes mellitus disebabkan oleh penurunan sekresi insulin atau penurunan sensitivitas insulin. Hiperglikemia yang terjadi pada diabetes mellitus menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein nonenzimatik, dan jalur poliol sorbitol yang selanjutnya mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif. Peningkatan produksi senyawa oksigen reaktif dari proses tersebut mengakibatkan timbulnya stress oksidatif yang berkontribusi pada perburukan dan perkembangan kejadian komplikasi pada diabetes mellitus.

Peningkatan suplai antioksidan dalam tubuh akan membantu mengurangi resiko komplikasi pada penderita diabetes. Senyawa antioksidan sintetik maupun alami (dari berbagai tanaman) mampu mengontrol kadar glukosa darah dan mencegah komplikasi diabetes. Hal ini dilihat dari adanya aktivitas antioksidan dan hipoglikemik dari senyawa aktif golongan polifenol pada tanaman. Polifenol mempunyai kemampuan untuk menghambat reaksi oksidasi dan menangkap radikal bebas, selain itu senyawa-senyawa yang memiliki potensi sebagai antioksidan adalah flavonoid dan alkaloid.

Salah satu tanaman yang memiliki potensi sebagai antioksidan alami untuk pengobatan diabetes mellitus adalah daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L.). Daun gedi merupakan tanaman yang tumbuh di Sulawesi Utara, penggunaan daun gedi oleh masyarakat Sulawesi Utara masih bersifat pemanfaatan secara tradisional. Daun gedi merah mengandung senyawa antioksidan alami yaitu flavonoid dan fenolik yang mampu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas.

Penelitian terdahulu menyatakan bahwa ekstrak etanol daun gedi memiliki nilai IC₅₀ sebesar 0,575 mg (Pine et al., 2010) sehingga termasuk dalam senyawa antioksidan yang memiliki kemampuan untuk menangkal radikal bebas secara efektif. Flavonoid sebagai salah satu kelompok senyawa fenolik yang banyak terdapat pada jaringan tanaman dapat berperan sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan flavonoid bersumber pada kemampuan mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam. Selain itu, flavonoid dapat bersifat sebagai antidiabetes karena flavonoid mampu berperan sebagai senyawa yang menekan kadar glukosa darah dan meningkatkan aktivitas glukokinase hepatic dengan meningkatkan pelepasan insulin dari penkreas.

Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo*. Pengujian secara *in vitro* dapat menggunakan metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*). Radikal bebas DPPH (*1,1-Diphenyl-2-picrylhidrazyl*) jika bereaksi dengan senyawa antioksidan akan berubah menjadi DPPH hidrasin yang berwarna kuning, tingkat perubahan dari warna ungu menjadi warna kuning menunjukkan bahwa radikal bebas DPPH menjadi DPPH hidrasin yang stabil. Pengujian antioksidan secara *in vivo* dapat dilakukan dengan melihat status antioksidan

endogen, salah satunya terhadap enzim glutation peroksidase pada jaringan hepar tikus diabetes yang diinduksi oleh STZ-NA. Glutation peroksidase sebagai enzim peredam (*quenching*) radikal bebas merupakan enzim yang berperan penting dalam melindungi organisme dari kerusakan oksidatif dengan cara mereduksi H_2O_2 menjadi H_2O dan glutation disulfide (GSSH) dengan bantuan glutation tereduksi.

DM tipe 2 dapat disebabkan oleh induksi STZ-NA. STZ adalah substansi penginduksi DM yang memiliki potensi alkali dan bersifat toksik. STZ menghambat dari siklus kreb, menurunkan produksi ATP mitokondria dan selanjutnya akan menghambat sekresi insulin yang diinduksi glukosa (Lanzen, 2007; Szkudelski, 2017). STZ masuk ke dalam sel β pankreas secara selektif melalui GLUT-2 dalam membran plasma. NA adalah vitamin B3 yang bekerja dengan cara menghambat aksi STZ dalam menurunkan biosintesa proinsulin, memperbaiki efek penghambatan sekresi insulin, menghambat kegagalan oksidasi glukosa dan menghambat penurunan kemampuan hidup sel β pankreas akibat STZ (Szkudelski 2012).

Pada penelitian ini akan diamati efek anti diabetes pada tikus yang diinduksi STZ dosis 45 mg/kg BB dan NA dosis 110 mg/kg BB. Peneliti menggunakan variasi dosis ekstrak etanol daun gedi merah yaitu dosis 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB dan 400 mg/kg BB yang diberikan secara oral.

O. Hipotesis

Berdasarkan uraian sebelumnya, dapat disusun hipotesis sebagai berikut :

Pertama, ekstrak etanol daun gedi merah memiliki aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH yang dinyatakan dalam nilai IC_{50}

Kedua, ekstrak etanol daun gedi merah mampu meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase pada tikus yang diinduksi STZ-NA.

Ketiga, ekstrak etanol daun gedi merah pada dosis 150 mg akan meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase paling kuat.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L. Medik.) yang diambil dari daerah Sawangan Tombulu Kabupaten Minahasa Sulawesi Utara.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L. Medik) secara acak, dengan kondisi daun tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda dan tidak rusak.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini adalah aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L. Medik) terhadap radikal bebas DPPH.

Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah aktivitas dari ekstrak etanol daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L. Medik) dalam berbagai variasi dosis terhadap aktivitas enzim glutation peroksidase (GPx) pada tikus putih jantan diabetes.

Variabel utama ketiga pada penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar.

Variabel utama keempat dalam penelitian ini adalah peneliti, kondisi laboratorium, kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, usia, jenis kelamin dan galur.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L. Medik) yang diberikan pada tikus dengan berbagai variasi dosis.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah aktivitas enzim GPx pada hewan uji setelah diberi perlakuan menggunakan ekstrak etanol daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L. Medik) pada kelompok uji, kontrol negatif dan kontrol positif dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol terhadap radikal bebas DPPH.

Variabel kendali pada penelitian ini adalah peneliti, kondisi laboratorium, kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, usia, jenis kelamin, galur, dan kit pereaksi pengujian DPPH dan GPx serta kondisi instrumen pengujian.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun gedi merah merupakan daun yang diperoleh dari daerah Sawangan Tombulu Kabupaten Minahasa Sulawesi Utara.

Kedua, serbuk daun gedi merah merupakan serbuk yang berasal dari daun gedi merah yang telah dikeringkan, digiling dan diayak dengan ayakan no. mesh 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun gedi merah adalah ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi serbuk daun gedi merah dengan pelarut etanol 96%, selanjutnya dipekatkan menggunakan *vacum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak pekat daun gedi merah.

Keempat, aktivitas antioksidan secara *in vitro* adalah uji aktivitas yang dilakukan dengan menggunakan metode penangkapan radikal bebas DPPH.

Kelima, tikus diabetes adalah tikus jantan dengan berat badan sekitar 150-200 g yang mengalami diabetes akibat induksi STZ-NA.

Keenam, aktivitas glutation peroksidase adalah aktivitas enzim antioksidan yang ditetapkan dari data supernatan hati menggunakan enzim glutation peroksidase.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L. Medik) dari Manado, Sulawesi Utara.

1.2 Bahan uji farmakalogi. Bahan uji farmakologi yang digunakan pada penelitian ini adalah glibenklamid (Indofarma), streptozotosin 45 mg/kg BB dilarutkan dalam buffer sitrat (0,1 M; pH 4,5), nikotinamid 110 mg/kg BB dilarutkan dalam normal salin, NaCl 0,9%, air suling, phosphate buffer, GSH, *glutathione peroxidase assay kit*, DPPH (*1,1 difenil-2-pikrilhidrazil*), kuersetin, methanol p.a dan etanol 96%

2. Alat

Alat yang dipakai untuk membuat simplisia daun gedi merah adalah penghalus yang berfungsi untuk menghancurkan daun gedi merah, oven, mesin penggiling, ayakan nomor mesh 40. Alat penyari untuk daun gedi merah yang digunakan antara lain alat-alat gelas, peralatan maserasi yang terdiri dari botol cokelat, *vacum rotary evaporator*. Alat yang digunakan untuk mengukur kadar air adalah *Sterling-Bidwell*, alat-alat gelas, timbangan elektrik, mortir dan stamfer, batang pengaduk. Alat yang digunakan untuk perlakuan hewan uji yaitu timbangan, spuit oral, jarum suntik, pipa kapiler dan kandang tikus. Alat untuk pengujian glutation peroksidase yaitu spektrofotometer UV-Vis, lemari beku -80⁰C, sentrifugase dingin Eppendorf, tabung EDTA LOT, mikropipet *Eppendorf*, *microsentrifugase tube eppendorf* dan vortex.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih galur Wistar berkelamin jantan, dengan berat badan rata-rata 150-200 g sebanyak 30 ekor. Pengelompokan dilakukan secara acak masing-masing 5 ekor per kelompok. Semua tikus dipelihara dengan cara yang sama, mendapat diet yang sama, ukuran kandang yang sesuai dengan temperatur 30±10⁰C.

Penerangan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap. Selama penelitian kebutuhan makanan dan minuman harus selalu terkontrol agar mencegah kematian tikus terutama saat diinduksi streptozotosin untuk membuat tikus diabetes.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Daun Gedi Merah

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L. Medik) yang bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L. Medik) yang dilakukan dengan mencocokan ciri-ciri morfologi yang ada pada daun gedi merah yang dibuktikan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret Surakarta.

2. Pengambilan dan pembuatan serbuk daun gedi merah

Sampel penelitian yang digunakan adalah tanaman gedi yang diperoleh dari Manado, Sulawesi Utara. Sampel daun gedi merah yang diperoleh disortasi basah lalu dicuci. Sampel kemudian dirajang dan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C, kemudian dilakukan sortasi kering dan diserbukkan.

3. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun gedi merah

Penetapan kadar air serbuk daun gedi merah dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Caranya dengan menimbang serbuk daun gedi merah sebanyak 20 gram dimasukkan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut xilena sebanyak 100 ml sampai serbuk terendam, kemudian memasang alat *Sterling-Bidwell*, tahap selanjutnya dipanaskan dengan api kecil. Pemanas dihentikan bila air pada penampung tidak menetes lagi, kemudian diukur kadar airnya dengan melihat volume pada skala alat tersebut dan dihitung persen kadar airnya (Sudarmadji *et al.* 2010).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{volume terbaca}}{\text{berat bahan}} \times 100\%$$

4. Pembuatan ekstrak etanol daun gedi merah

Serbuk daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L. Medik) diambil satu bagian dimasukkan ke dalam sebuah bejana maserasi, dituangi dengan 7,5 bagian cairan penyari yaitu etanol 96%, tutup biarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sering diaduk, saring menggunakan kain flanel, peras, tambahkan cairan penyari dengan 2,5 bagian lalu disaring kembali memakai kain flanel, hingga diperoleh filtrat. Sebagian filtrat dipekatkan dengan rotary evaporator pada

suhu maksimal 50°C hingga bebas etanol, sedangkan sebagian digunakan untuk penelitian selanjutnya (Pine 2011; Depkes 1980; Handayani & Sriherfyna 2016).

5. Uji bebas alkohol

Tes bebas alkohol ekstrak etanol daun gedi merah dilakukan dengan cara esterifikasi alkohol, dimana ekstrak daun gedi merah ditambah asam asetat encer dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan. Bila tidak ada bau ester (etil asetat) berarti sudah tidak ada etanol (Depkes 1979).

6. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun gedi merah

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk memastikan kebenaran zat kimia yang terkandung di dalam daun gedi merah. Identifikasi senyawa meliputi senyawa flavonoid, tanin, saponin, dan alkaloid.

Pada identifikasi senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun gedi merah berdasarkan reaksi warna menggunakan tabung reaksi dan bahan-bahan kimia seperti berikut:

6.1 Identifikasi flavonoid. Sebanyak 2 gram daun gedi merah ditambahkan 10 ml air panas lalu dipanaskan lagi selama 5 menit. Sebanyak 5 ml filtratnya diuji dengan menambahkan sedikit serbuk Mg, 1 ml HCL pekat dan 1 ml amilalkohol kemudian dikocok. Apabila terjadi warna merah/kuning/jingga pada lapisan amilalkohol menunjukan adanya flavonoid (Suoth 2013).

6.2 Identifikasi tanin. Sejumlah ekstrak ditambah 20 ml air panas kemudian didihkan selama 15 menit, setelah dingin disaring. Sebanyak 5 ml filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi larutan besi (III) klorida 1%. Jika tanin positif maka akan terbentuk warna hijau violet setelah direaksikan dengan larutan besi (III) klorida (Depkes 1995).

6.3 Identifikasi saponin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun gedi merah dimasukan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah air panas 10 ml dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Kemudian diamkan 10 menit. Tambahkan 1 tetes HCl 2N dan amati jika terjadi reaksi positif yang ditunjukan dengan buih yang terbentuk setinggi 1-10 cm dan tidak hilang (Robinson 1995).

6.4 Identifikasi alkaloid. Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan cara serbuk dan ekstrak simplisia sebanyak 500 mg dilarutkan dalam 100 ml air panas,

kemudian didinginkan dan disaring. Filtrate sebanyak 5 ml dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan dengan 1,5 ml HCl 2% kemudian dilanjutkan dengan penambahan 2 sampai 4 tetes reagen Dragendorff. Alkaloid positif terjadi kekeruhan atau endapan coklat (Harborne 1987).

7. Uji aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH

7.1 Penyiapan larutan DPPH 80 ppm. Larutan pereaksi DPPH 80 ppm dibuat dengan cara menimbang 8 mg serbuk DPPH yang kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml dan ditambahkan metanol p.a ke dalam labu takar sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 80 ppm.

7.2 Penyiapan larutan ekstrak daun gedi merah. Pembuatan larutan stok ekstrak daun gedi merah dengan konsentrasi 1000 ppm. Dibuat dengan cara menimbang 100 mg ekstrak kental secara teliti kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sampai larut dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, selanjutnya ditambah metanol p.a sampai tanda batas. Kemudian dibuat larutan seri konsentrasi ekstrak etanol daun gedi merah 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm.

7.3 Penyiapan larutan kuersetin. Pembuatan larutan stok kuersetin dibuat dengan konsentrasi 50 ppm. Dengan cara menimbang 50 mg kuersetin kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sampai larut dan dimasukkan dalam labu ukur 100 ml, selanjutnya ditambah metanol p.a sampai tanda batas. Setelah itu dibuat larutan seri konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm.

7.4 Pembuatan larutan blanko. Pembuatan larutan blanko dilakukan dengan cara memipet 2 ml metanol p.a dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 ml larutan DPPH 80 ppm, dikocok hingga homogen dan diinkubasi pada suhu 37C selama 30 menit.

7.5 Penentuan Panjang gelombang maksimum DPPH. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH untuk uji aktivitas antioksidan ekstrak daun gedi merah dilakukan dengan 2 ml larutan DPPH 80 ppm ditambah 2 ml metanol p.a dikocok sampai homogen dan diamati serapan pada rentang 500-525 nm dengan menggunakan blanko metanol p.a

7.6 Penentuan *operating time*. Penentuan *operating time* dilakukan dengan 2 ml larutan DPPH 80 ppm ditambah 2 ml metanol p.a, dikocok homogen dan diamati serapannya pada panjang gelombang 517 nm, dibaca mulai dari menit 0 sampai menit didapatkan nilai absorbansi yang stabil pada menit tertentu. Untuk penentuan operating time dapat ditentukan dari grafik antara waktu pembacaan dan absorbansi.

7.7 Uji aktivitas antioksidan. Setiap konsentrasi larutan uji dipipet sebanyak 2 ml, kemudian ditambahkan dengan 2 ml larutan pereaksi DPPH 80 ppm dalam vial, kocok, biarkan ditempat gelap selama 30 menit dan kemudian diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan (517 nm). Percobaan dilakukan 3 kali pengulangan. Pengamatan terhadap larutan kontrol dari 2 ml metanol ditambah 2 ml DPPH 80 ppm.

7.8 Analisa data. Hasil pengukuran absorbansi yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung prosentase aktivitas penangkap radikal bebas dari berbagai konsentrasi uji. Harga IC_{50} dihitung dari persamaan regresi linear antara probit dari persen (%) peredaman radikal (% radikal) versus logaritma berbagai konsentrasi uji. Rumus prosentase peredaman sebagai berikut :

$$\text{Peredaman} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

8. Uji aktivitas antioksidan terhadap glutation peroksidase

8.1 Penentuan Dosis Glibenklamid. Dosis glibenklamid pada manusia 70 kg adalah 5 mg. Faktor konversi manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018 sehingga dosis glibenklamid adalah 0,09 mg/200gram BB tikus atau 0,45 mg/kg BB tikus.

8.2 Penentuan Dosis STZ-NA. STZ dilarutkan dalam buffer sitrat 0,1 M; pH 4,5 dan NA dilarutkan dalam larutan salin (Sheela, 2013). Induksi diabetes dilakukan dengan menggunakan kombinasi STZ dengan dosis 45 mg/kg BB dan NA 110 mg/kg BB pada tikus yang diberikan satu kali sehingga dapat menyebabkan DM dalam lima hari setelah induksi STZ-NA. Sebelumnya tikus dipuasakan semalam. NA diberikan 15 menit sebelum pemberian STZ. Induksi STZ-NA diberikan secara intraperitoneal.

8.3 Sediaan uji. Dosis yang diberikan pada tikus mengacu pada dosis pemakaian daun gedi merah secara tradisional. Penentuan dosis dilakukan setelah melakukan orientasi dengan mengkonversi rendemen pengeringan dan ekstrak daun gedi merah dari manusia 70 kg ke tikus 200 gram (faktor konversi 0,018), maka dosis yang diberikan kepada tikus dalam penelitian ini yaitu dosis I (100 mg/Kg BB tikus), dosis II (200 mg/Kg BB tikus), dan dosis III (400 mg/Kg BB tikus) banyaknya ekstrak daun gedi merah yang digunakan dihitung berdasarkan berat badan dari masing-masing tikus.

8.4 Pembuatan bahan uji Glibenklamid. Suspensi glibenklamid 0,09 mg/ml dibuat dengan cara melarutkan serbuk glibenklamid sebanyak 9 mg dalam CMC Na 0,5% sampai volume 100 ml.

8.5 Pembuatan bahan uji CMC Na 0,5%. Larutan CMC Na konsentrasi 0,5% dibuat dengan cara melarutkan 0,5 gram serbuk CMC Na sedikit demi sedikit ke dalam air suling panas sambil diaduk pada volume 100 ml air suling hingga mengembang sampai homogen.

8.6 Pembuatan larutan STZ dan NA. Pembuatan dosis STZ 45 mg/kg BB dilarutkan dalam buffer sitrat 0,1 M pH 4,5. NA 110 mg/kg BB dilarutkan dalam normal salin (Sheela 2013).

8.7 Penentuan hewan uji. Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar dan tidak cacat dengan berat sekitar 150-200 g sebanyak 30 ekor yang kemudian dibagi menjadi 6 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Tikus-tikus tersebut kemudian diaklimatisasi selama satu minggu.

8.8 Perlakuan hewan uji. Tikus yang telah beradaptasi dengan lingkungannya kemudian ditimbang, tikus yang digunakan sebanyak 30 ekor secara acak yang dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor, sebelumnya tikus dipuaskan terlebih dahulu selama 18 jam sebelum diberi perlakuan.

Kelompok 1 : kontrol normal tanpa perlakuan.

Kelompok 2 : kontrol negatif (tikus diberikan CMC Na 0,5%)

- Kelompok 3 : kontrol pembanding (tikus diberikan glibenklamid 0,45 mg/kg BB tikus)
- Kelompok 4 : tikus diberikan ekstrak etanol daun gedi merah dengan dosis 100 mg/Kg BB tikus selama 14 hari.
- Kelompok 5 : tikus diberikan ekstrak etanol daun gedi merah dengan dosis 200 mg/Kg BB tikus selama 14 hari.
- Kelompok 6 : tikus diberikan ekstrak etanol daun gedi merah dengan dosis 400 mg/Kg BB tikus selama 14 hari.

8.9 Pengorbanan hewan uji. Pada akhir penelitian, hewan uji dikorbankan dan langsung segera di otopsi untuk dilakukan pengambilan jaringan organ hepar yang dilakukan pada hari ke-31. Hewan coba dikorbankan dengan cara dislokasi leher kemudian dilakukan pembedahan. Pembedahan dimulai dengan merebahkan tikus dengan rebah dorsal pada papan pembedahan. Keempat kaki tikus difiksasi menggunakan jarum. Pembedahan dilakukan dengan mengincisi peritoneum. Incisi dilakukan selebar mungkin untuk memudahkan pengambilan organ. Hepar terletak di bagian dextra abdomen. Hepar terlihat berwarna merah bata dan berlobus-lobus. Organ hepar diambil dan dicuci dengan NaCl-fisiologis 0,9% kemudian hepar dimasukkan ke dalam formalin 10% untuk pengukuran kadar GPx

8.10 Preparasi sampel. Hati segar tikus \pm 1,25 g dicacah dalam kondisi dingin dalam 5 ml larutan *Phosphate Buffer* salin (PBS) yang mengandung 11,5 g/L KCl. Homogenat disentrifugasi pada 4.000 rpm selama 10 menit sebanyak 2 kali hingga diperoleh supernatan jernih. Supernatan diambil untuk pengujian sedangkan sedimennya dibuang

8.11 Pemeriksaan Aktivitas Antioksidan Terhadap GPx. Pemeriksaan kadar GPx supernatan jernih hati dilakukan dengan *Glutation Peroxidase Assay* Kit merek Bio Vision disimpan pada suhu -20°C dan terlindungi dari sinar matahari langsung. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

8.12 Pengukuran aktivitas GPx. Pengukuran menggunakan metode Lawrence dan Burk (1976) yang dimodifikasi. Sebanyak 200 μl supernatan hati

ditambahkan 200 μ l buffer phosphat 0,1 M pH 7,0 yang mengandung 0,1 mM EDTA, 200 μ l glutation tereduksi (GSH) 10 mM dan 200 μ l enzim glutation reduktase (2,4 unit). Kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C, ditambahkan 200 μ l NADPH 1,5 mM dan diinkubasi lagi selama 3 menit pada suhu yang sama dan dilanjutkan dengan penambahan 200 μ l H_2O_2 1,5 mM. Laju perubahan serapan selama konversi NADPH menjadi NADP⁺ diukur secara spektrofotometri pada $\lambda = 340$ nm selama 3 menit. Aktivitas GSH-Px dinyatakan sebagai μ mol NADPH yang dioksidasi menjadi NADP⁺ menit⁻¹ mg⁻¹ protein dengan koefisien ekstrinsik ($6,22\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) untuk NADPH. Perhitungannya adalah sebagai berikut :

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

Keterangan :

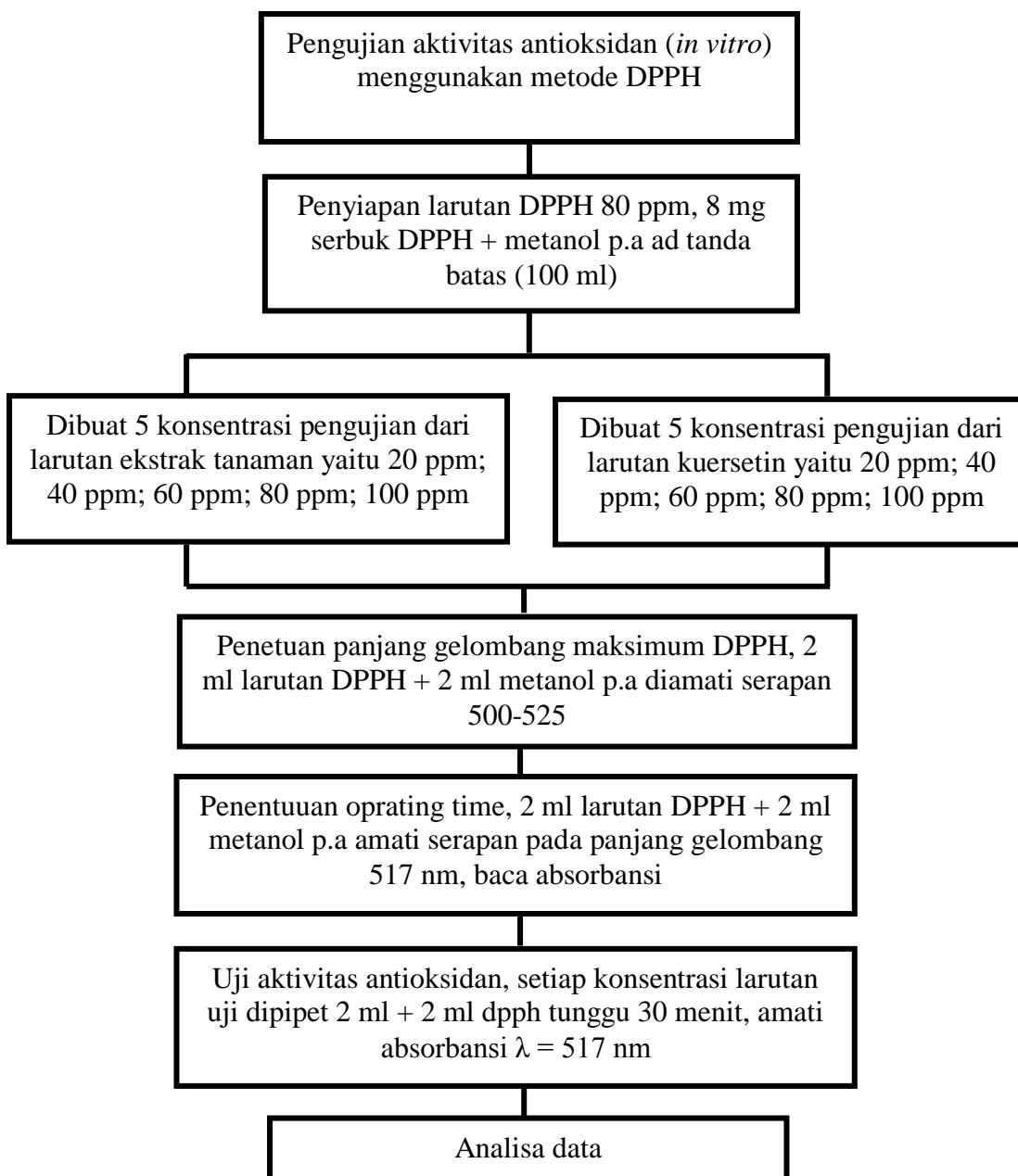
- Abs = perubahan absorbansi
- Vt = volume total
- 6,22 = koefisien ekstrinsik dari NADPH
- 2 = 2 mol GSH yang setara dengan 1 mol NADPH
- 1000 = perubahan menjadi mili unit
- Vs = volume sampel

E. Analisa Statistik

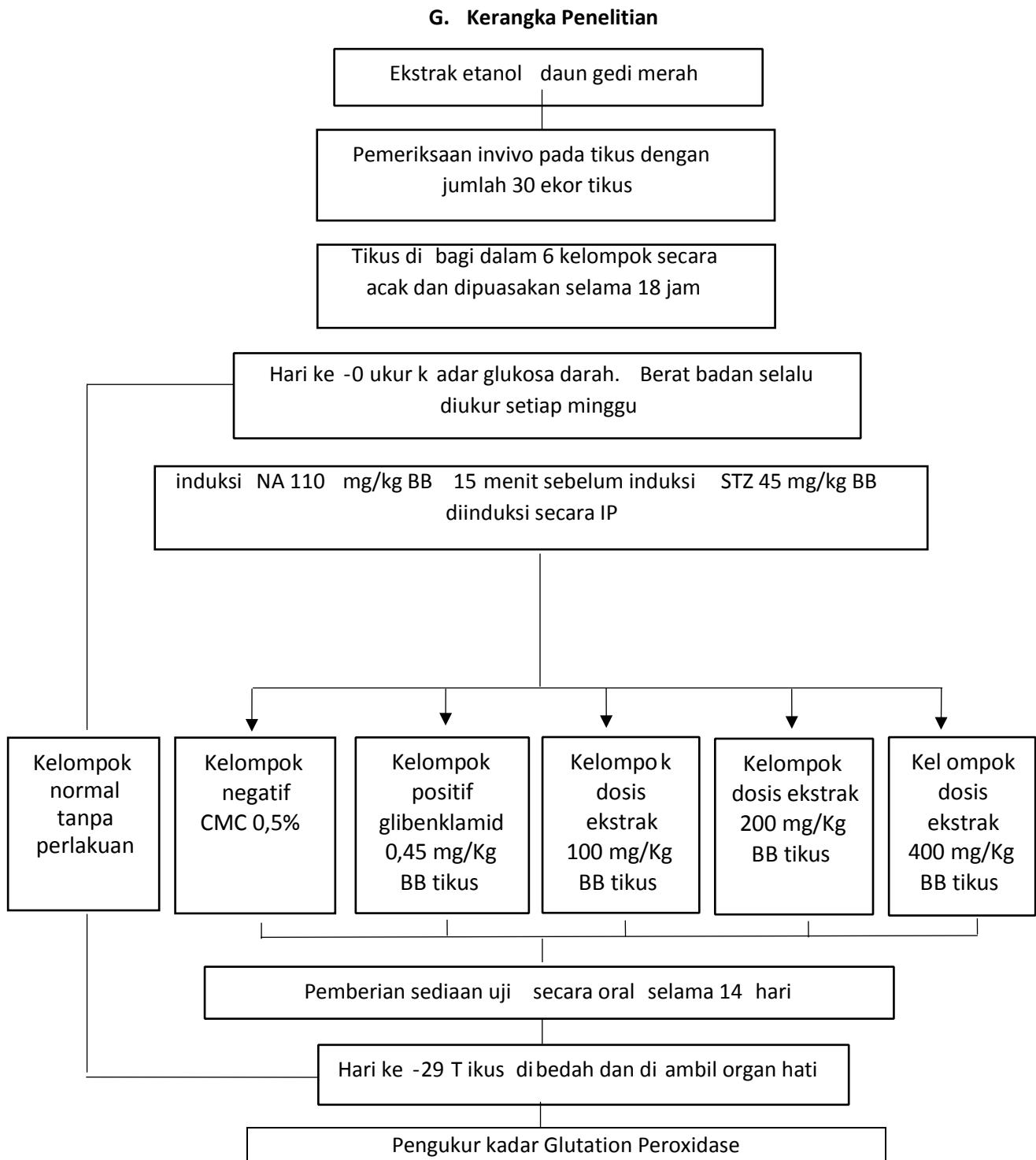
Analisa statistik yang pertama digunakan dalam penelitian ini adalah untuk melihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak yaitu dengan menggunakan uji distribusi normal (*Sapiro Wilk*). Jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$), analisis data dilanjutkan dengan uji parametrik (*One Way ANOVA*) untuk mengetahui perbedaan yang nyata diantara perlakuan. Jika hasil uji *One Way ANOVA* dan uji *Lavene Statistic* menunjukkan hasil normal ($p > 0,05$), selanjutnya dilakukan uji *Post Hoc* untuk melihat aktivitas glutation peroksidase yang efektif diantara kelompok perlakuan. Namun, jika distribusi data tidak normal ($p < 0,05$), maka dilakukan uji non parametrik. Jika perbedaannya bermakna, dilanjutkan dengan uji Least Significant Difference (LSD) atau Tukey dengan taraf kepercayaan 95%. Apabila data terdistribusi tidak normal, dilakukan

uji Kruskal-Wallis dan jika perbedaan bermakna dilanjutkan dengan uji Mann-Whithney untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

F. Skema Penelitian



Gambar 7. Pengujian aktivitas antioksidan (*in vitro*) menggunakan metode DPPH



Gambar 8. Pengujian aktivitas enzim glutation peroksidase (in vivo)

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi Daun Gedi Merah

Determinasi tanaman adalah suatu teknik untuk melihat kecocokan suatu tanaman berdasarkan ciri morfologi tanaman tersebut. Determinasi tanaman gedi merah dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang diambil, untuk menghindari kesalahan dalam mengumpulkan bahan serta kemungkinan tercampur dengan bahan tumbuhan lain. Determinasi ini dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

2. Hasil determinasi tanaman

Tanaman gedi merah yang digunakan dalam penelitian ini telah dilakukan determinasi, dinyatakan bahwa gedi merah adalah benar-benar *Abelmoschus manihot* L.Medik yang dimaksudkan, sehingga tanaman ini yang akan digunakan dalam penelitian. Data mengenai kebenaran hasil determinasi dapat dilihat pada kunci determinasi dibawah ini:

1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21a-22b-23b-24b-25b-26b-27b-28b-29b-30b-31a-32a-33a-34a-35a-36d-37b-38b-39b-41b-42b-44b-45b-46e-50b-51b-53b-54b-56b-57b-58b-59d-72b-73b-74b-631b-632b-633a-634b-635b-636b-637b-638a-639b-640b-652d-653b-655b-656a-657b-658a-659b-

660a_____96. Malvaceae 1b-3b-5b-13b-14b-15a-

16a_____14.

Abelmoschus 1a-2b-

3b_____ *Abelmoschus manihot* (L.)

Medik. (C.A. Backer & R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr. 1963). Dapat dilihat dilampiran 1

3. Deskripsi tanaman

Habistus: perdu, menahun, tumbuh tegak, tinggi 1.5-1.7 m. Akar: tunggang, bercabang-cabang, kuning muda hingga kuning keputihan. Batang: bulat, berkayu, bercabang-cabang, percabangan monopodial, permukaan batang

muda sedikit berambut tetapi gundul pada batang dewasa. Daun : tunggal, tersebar, helaian daun bulat hingga bulat telur memanjang, panjang 10-60 cm, lebar 5-60 cm, pangkal berlekuk seperti jantung, tepi berbagi 5-7 taju, ujungnya membulat, berambut hingga gundul, permukaan atas hijau tua, permukaan bawah hijau muda, pertulanagan menjari; taju daun berbentuk segitiga atau lanset memanjang atau bulat telur memanjangatau garis, ujungnya runcing hingga meruncing, tepi rata hingga bergerigi, tangkai daun bulat, panjang 2-60 cm, sedikit berambut hingga gundul, hijau; daun penumpu sepasang, terletak bebas di kanak kiri pangkal tangkai daun, berbentuk lanset, panjang 1-1.5 cm, hijau. Bunga : tunggal, berkelamin 2 (biseksual), berbentuk lonceng, diameter 12 cm, tumbuh di ketiak daun, tumbuh menggantung ke bawah; tangkai bunga bulat, hijau, panjang 1-5 cm, sedikit berambut hingga gundul; daun kelopak tambahan (epicalyx) seringkali 5, panjang 2-3 cm, lebar 0.2-1 cm, hijau, berambut; kelopak bunga berbentuk tabung, berbagi 5, tajunya bentuk lanset, berambut, warna hijau tua; daun mahkota bulat telur terbalik, panjang 3.5-8 cm, lebar 3-6 cm, tepi rata, berwarna kuning cerah dan bagian tengahnya ungu; benang sari bentuk tabung, panjang 1.5-2 cm, kepala sari hamper duduk, kuning; kepala putik berwarna ungu gelap. Buah: buah kapsul, bulat memanjang, panjang 4-5 cm, diameter 2.5-3 cm. Biji: kecil, banyak, berbentuk seperti ginjal, berambut.

4. Pembuatan Serbuk Daun Gedi Merah

Daun gedi merah dalam penelitian ini diperoleh dari Kupang, Nusa Tenggara Timur pada bulan Oktober 2017. Daun gedi merah dengan berat 4 kg dibersihkan menggunakan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel dan setelah ditimbang kembali daun gedi merah menjadi 3,6 kg. Untuk memperkecil ukuran maka daun merah dipotong kecil-kecil sehingga mempercepat proses pengeringan. Selanjutnya daun gedi merah dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C selama 4 hari. Pengeringan dimaksudkan untuk mengurangi kadar air sehingga mencegah timbulnya jamur yang dapat menyebabkan terjadinya perubahan kimia dan dapat menurunkan mutu dan khasiat dari daun gedi merah. Setelah melalui proses pengeringan dengan oven didapatkan berat kering sebesar 1,8 kg. Daun gedi merah yang telah kering

dibuat serbuk dengan menggunakan alat penggiling. Selanjutnya serbuk diayak dengan pengayak no. 40 untuk memperoleh serbuk yang halus. Simplisia dibuat menjadi serbuk untuk memperluas permukaan partikel simplisia yang kontak dengan pelarut sehingga penyaringan dapat berlangsung efektif.

Penentuan persentase berat kering terhadap berat basah dilakukan dengan cara menimbang daun gedi merah yang masih basah, kemudian hasilnya dibandingkan dengan daun gedi merah yang sudah kering. Hasil persentase berat kering terhadap berat basah gedi merah dapat dilihat pada Tabel 2 di bawah ini.

Tabel 2. Rendemen pengeringan daun gedi merah

Simplisia	Berat basah (Kg)	Berat kering (Kg)	Rendemen (%)
Daun gedi merah	9	1,7	18,88

Daun gedi merah sebanyak 9 kg dikeringkan dan setelah dikeringkan beratnya menjadi 1,7 kg sehingga persentase berat kering terhadap berat basah adalah 18,88%. Hasil perhitungan % rendemen dapat dilihat pada Lampiran 4.

5. Penetapan Kadar Air Serbuk Daun Gedi Merah

Serbuk daun gedi merah yang diperoleh dilakukan penetapan kadar air dengan cara destilasi menggunakan rangkaian alat *Sterling-BidwellI*. Penetapan kadar air serbuk bertujuan agar mutu dan khasiat serbuk daun gedi merah tetap terjaga. Persyaratan kadar air suatu serbuk simplisia yaitu kurang dari 10%, Pelarut yang digunakan yaitu xylen karena xylen memiliki titik didih yang lebih tinggi dan berat jenis yang lebih kecil dibandingkan air selain itu xylen tidak bercampur dengan air. Hasil penetapan kadar air serbuk daun gedi merah dapat dilihat pada Tabel 3 di bawah ini.

Tabel 3. Penetapan kadar air serbuk daun gedi merah

Berat serbuk (g)	Volume terbaca (mL)	Kadar air (%)
20	1,5	7,5
20	1,4	7
20	1,4	7
Rata-rata		7,167±0,289

Penetapan kadar air serbuk daun gedi merah dilakukan dengan tiga kali replikasi dan kadar air serbuk daun gedi merah yang telah ditetapkan yaitu sebesar 7,167%, hasil tersebut telah memenuhi syarat yaitu tidak lebih dari 10%, sehingga

dalam penyimpanan tidak mudah untuk ditumbuhinya mikroba. Perhitungan penetapan kadar air dapat dilihat pada Lampiran 5.

6. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi dan menggunakan pelarut yang mampu untuk menyari sebagian besar metabolit sekunder yang terkandung dalam serbuk simplisia yang tidak dinyatakan lain dengan etanol 96% (Kemenkes 2013). Metode maserasi memiliki keuntungan yaitu menggunakan alat yang sederhana dan biaya yang dibutuhkan murah. Etanol 96% merupakan pelarut yang dapat menyari senyawa dari simplisia secara optimal dimana bahan pengotor hanya dalam skala kecil atau larut dalam cairan pengekstraksi (Voight 1995). Selain itu etanol 96% tidak beracun, netral, absorpsi baik, sulit ditumbuhinya bakteri dan jamur, dan panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit (Depkes 1986).

Tabel 4. Rendemen ekstrak etanol daun gedi merah

Berat serbuk (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
1500	104,765	6,984

Ekstrak kental yang didapat dari 1500 gram serbuk daun gedi merah sebesar 104,7646 gram dan diperoleh rendemen ekstrak sebesar 6,984 %. Hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 6.

7. Hasil Uji Bebas Alkohol Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah

Ekstrak etanol daun gedi merah yang diperoleh diuji bebas alkohol. Ekstrak ditambah larutan asam asetat dan larutan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan hingga tidak tercium bau ester khas alkohol. Berdasarkan hasil uji bebas alkohol, ekstrak etanol daun gedi merah tidak mengandung alkohol. Uji bebas alkohol dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi.

Tabel 5. Hasil uji bebas alkohol ekstrak etanol daun gedi merah

Prosedur	Hasil	Keterangan
Ekstrak + H_3COOH + H_2SO_4 condipanaskan	Tidak tercium bau ester khas dari alkohol	(-)

8. Identifikasi Kandungan Kimia Daun Gedi Merah

Hasil ekstrak ekstrak kental daun gedi merah diperiksa kandungan kimianya menggunakan reaksi warna. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol

daun gedi merah dilakukan untuk mengetahui kebenaran kandungan kimia yang terdapat dalam daun gedi merah.

Tabel 6. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun gedi merah

Kandungan Kimia	Hasil Penelitian	Interpretasi Hasil	Pustaka
Flavonoid	Warna jingga pada lapisan amil alkohol	+	Warna jingga pada lapisan amil alkohol
Tanin	Warna hijau violet	+	Terbentuk warna hijau violet
Saponin	Buih tinggi 1-10 cm	+	Buih tinggi 1-10 cm
Alkaloid	Endapan warna cokelat	-	Terbentuk kekeruhan atau endapan warna cokelat

Hasil pengujian pada tabel tersebut menunjukkan bahwa serbuk dan ekstrak etanol daun gedi merah mengandung tanin, saponin, alkaloid, dan flavonoid. Hasil identifikasi ini sesuai dengan penelitian Joni *et al.* (2016) bahwa daun gedi merah mengandung senyawa tersebut.

9. Uji Aktivitas Antioksidan terhadap Radikal Bebas DPPH

9.1 Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum

Sebelum dilakukan pengujian aktivitas antioksidan sampel ekstrak etanol daun gedi merah dan quersetin sebagai pembanding, terlebih dahulu dilakukan pengukuran panjang gelombang radikal bebas DPPH. Panjang gelombang yang digunakan untuk pengukuran adalah panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang yang memiliki absorbansi yang paling tinggi. Pemilihan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk meminimalkan kesalahan pada saat pengukuran sehingga data yang didapat akurat, selain itu pada panjang gelombang maksimum dapat meningkatkan kepekaan pengukuran karena pada panjang gelombang maksimum tersebut, perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi adalah yang paling besar (Gandjar 2010). Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH adalah 517 nm dengan absorbansi 0,604. Hasil penetapan panjang gelombang maksimum DPPH dapat dilihat pada lampiran 8.

9.2 Penetapan Operating time

Penentuan *operating time* digunakan untuk menentukan kestabilan absorbansi senyawa DPPH setelah direaksikan dengan senyawa uji. Dari hasil pengukuran *operating time* ekstrak etanol daun gedi merah waktu stabil dimulai

dari menit ke-24 sampai menit ke-30. *Operating time* kuersetin dimulai dari menit ke-25 sampai menit ke-30. Sehingga penelitian ini menggunakan waktu menit 30 untuk *operating time* (Sagar B 2011). Hasil penentuan *operating time* dapat dilihat pada lampiran 9.

9.3 Hasil pengujian aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH

Pengujian persen peredaman larutan uji (ekstrak etanol daun gedi merah) dilakukan dengan metode DPPH. Pengujian dilakukan 3 kali replikasi. quersetin digunakan sebagai pembanding dalam pengujian ini karena quersetin merupakan glikosida flavonoid yang sudah terbukti memiliki aktivitas antioksidan.

Penambahan larutan uji yang mengandung senyawa aktif yang mampu meredam radikal bebas akan menurunkan konsentrasi DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl*), diikuti dengan menurunnya serapan dari DPPH karena senyawa aktif dalam larutan uji memberikan atom hidrogen kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (*1,1-difenil-2-picrilhidrazin*) dengan ditandai perubahan warna violet larutan DPPH menjadi warna kuning. Proses perubahan warna yang terjadi pada DPPH karena ikatan rangkap terkonjugasi pada DPPH berkurang.

Tabel 7. Hasil aktivitas antioksidan ekstrak daun gedi merah

Bahan	Rata-rata konsentrasi (ppm)	Rata-rata absorbansi	% inhibisi	IC ₅₀
Ekstrak daun gedi merah	20	0,492	18,5430	133,05
	40	0,480	20,5298	
	60	0,466	22,8477	
	80	0,420	30,4636	
	100	0,335	44,5364	
Kuersetin	2	0,458	24,1722	6,121
	4	0,366	39,4040	
	6	0,286	52,6490	
	8	0,218	63,9072	
	10	0,202	66,5563	

Pengukuran nilai absorbansi peredaman radikal bebas DPPH dilakukan terhadap ekstrak etanol daun gedi merah dan kuersetin yang dibuat dengan beberapa seri konsentrasi, setelah mereaksikan larutan uji dengan DPPH dan didiamkan selama 30 menit sehingga terjadi reaksi yang stabil antara senyawa aktif dengan DPPH. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang

517 nm sesuai dengan hasil yang diperoleh dari pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH.

Hasil dari tabel pengujian aktivitas antioksidan menunjukan bahwa Semakin besar konsentrasi larutan antiokidan yang diberikan maka konsentrasi DPPH akan semakin berkurang. Berkurangnya konsentrasi DPPH dapat terlihat dari absorbansi yang menurun, pada daun gedi merah konsentrasi 20 ppm menuujukan nilai absorbansi 0,492 kemudian pada konsentrasi 100 ppm terjadi penurunan nilai absorbansi menjadi 0,335. Kuersetin pada konsentrasi 20 ppm memiliki nilai absorbansi 0,458 kemudian dengan meningkatnya konsentrasi menjadi 100 ppm maka terjadi penurunan nilai absorbansi menjadi 0,202 kemudian dilakukan perhitungan untuk mendapatkan % inhibisi dengan adanya % inhibisi maka nilai IC_{50} dapat ditentukan semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin efektif sebagai antioksidan. Hasil perhitungan nilai IC_{50} dapat dilihat pada lampiran 14 dan 15.

Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai $IC_{50} < 50$ ppm, aktif 50-100 ppm, sedang 101-250 ppm, lemah 250-500 ppm, dan tidak aktif > 500 ppm (Jun *et al.* 2003). Melihat nilai IC_{50} ekstrak etanol daun gedi merah adalah 133,05 ppm dan nilai IC_{50} quersetin yang diperoleh adalah sebesar 6,121 ppm yang tergolong antioksidan kuat.

Quersetin merupakan antioksidan dari golongan flavonoid yang cukup efektif dalam meredam aksi destruktif radikal bebas, dengan cara mendonorkan atom hidrogen pada radikal bebas sehingga radikal bebas tersebut menjadi stabil. Aktivitas antioksidan quersetin mampu mencegah kerusakan oksidatif dan kematian sel (Susilowati 2010).

Ekstrak etanol daun gedi merah memiliki nilai IC_{50} yang berkisar antara 101-250 ppm, termasuk dalam antioksidan sedang karena mengandung senyawa flavonoid yang mampu untuk melindungi tubuh dari serangan radikal bebas (Siswandi *et al.* 2013). Flavonoid berperan dalam mencegah terjadinya komplikasi pada penderita diabetes mellitus dilihat dari adanya aktivitas antioksidan dan hipoglikemik dari senyawa aktif golongan flavonoid pada tanaman (Widiowati 2008). Flavonoid mempunyai kemampuan untuk

menghambat reaksi oksidasi dan menangkap radikal bebas (Burda dan Oleszek 2001).

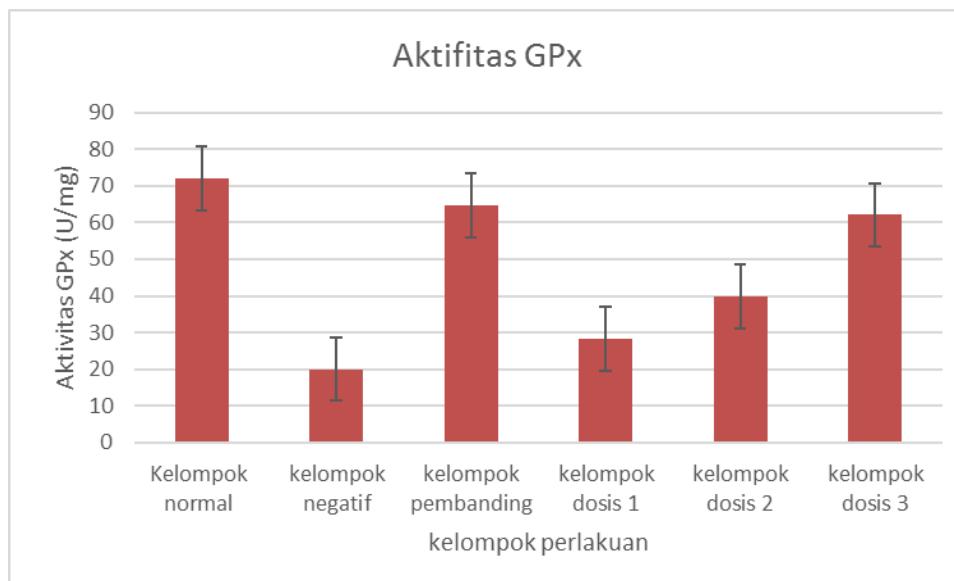
Pada penelitian ini % inhibisi larutan ekstrak etanol daun gedi merah dari setiap seri konsentrasi (20 ppm 40 ppm 60 ppm 80 ppm 100 ppm) belum mencapai 50% peredaman dari radikal bebas sehingga untuk penelitian selanjutnya diperlukan peningkatan seri konsentrasi untuk mendapatkan hasil yang mampu meredam 50% radikal bebas

10. Uji Aktivitas Terhadap Enzim GPx

Ekstrak etanol daun gedi merah dilakukan uji aktivitas terhadap enzim GPx secara *in vivo* dengan cara mengukur aktivitas enzim glutation peroksidase pada homogenat hati tikus, setelah diberi ekstrak etanol daun gedi merah selama 14 hari dengan dosis sebesar 100, 200, dan 400 mg/Kg BB tikus.

GPx mengkatalisis reaksi perubahan GSH menjadi GSSH, sekaligus mengurangi jumlah hidrogen peroksid (H₂O₂) yang dirubah menjadi air (H₂O). H₂O₂ merupakan senyawa oksigen reaktif non radikal, tetapi mudah berubah menjadi radikal bebas (Droge 2007)

Dalam *Gluthation peroxidase activity assay*, GPx mereduksi *Cumene Hydroperoxide* saat terjadi oksidasi glutathion tereduksi (GSH) menjadi glutathion disulfide (GSSH). Selanjutnya GSSH yang dihasilkan direduksi menjadi GSH, reaksi tersebut dikatalisis oleh glutation reduktase (GR) dengan mengkonsumsi NADPH. Penurunan NADPH (biasanya diukur pada panjang gelombang 340 nm) sebanding dengan aktivitas GPx (Biovision 2012).



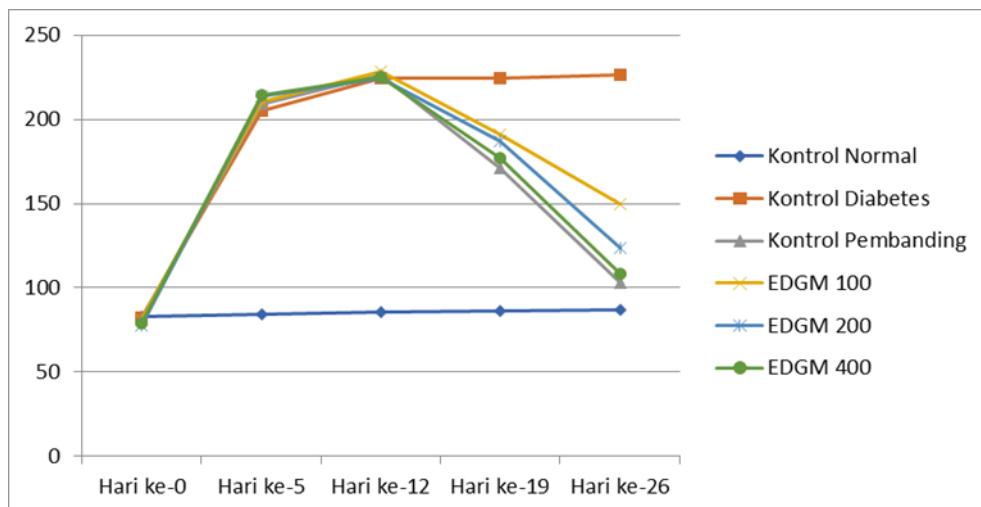
Gambar 9. Aktivitas GPx (U/mg) seluruh kelompok perlakuan

Tabel 8. Rata-rata hasil pengukuran aktivitas enzim GPx pada hati tikus

Kelompok	N	Aktivitas GPx (U/mg)±SD
Kontrol normal	5	71.92±2.00
Kontrol negatif	5	20.06±1.22 ^{ac}
Kontrol pembanding	5	64.67±3.36 ^{ab}
Dosis ekstrak 100 mg/Kg BB tikus	5	28.40±1.84 ^{abc}
Dosis ekstrak 200 mg/Kg BB tikus	5	39.82±2.09 ^{abc}
Dosis ekstrak 400 mg/Kg BB tikus	5	62.05±2.00 ^{ab}

Keterangan:

- a: berbeda signifikan terhadap kelompok kontrol normal
 b: berbeda signifikan terhadap kelompok kontrol negatif
 c: berbeda signifikan terhadap kelompok kontrol pembanding



Gambar 10. Grafik hubungan antara rata-rata kadar glukosa darah tikus dengan waktu perlakuan

Tabel 9. Rata - rata kadar gula darah tikus (mg/dL)

Kelompok	Hari ke - 0	Hari ke - 15	Hari ke - 29
Normal	82,87 ± 2,20	72,32 ± 2,28	73,10 ± 2,10
Kontrol diabetes	81,99 ± 2,19	224,10 ± 3,28	237,89 ± 2,45 ^{ac}
Pembanding	81,44 ± 2,55	226,10 ± 2,94	115,99 ± 2,14 ^{ab}
Gedi merah 100 mg/Kg	80,69 ± 1,43	228,19 ± 4,70	170,49 ± 4,15 ^{abc}
Gedi merah 200 mg/Kg	77,76 ± 1,66	224,58 ± 3,08	151,97 ± 1,75 ^{abc}
Gedi merah 400 mg/Kg	79,07 ± 1,52	224,74 ± 9,84	122,84 ± 4,67 ^{ab}

Keterangan:

a: berbeda signifikan terhadap kelompok kontrol normal

b: berbeda signifikan terhadap kelompok kontrol negatif

c: berbeda signifikan terhadap kelompok kontrol pembanding

Tabel hasil penelitian kadar glukosa darah yang dilakukan jofrin (2018). Pada kelompok normal hasil rata-rata pengukuran aktivitas GPx menunjukkan nilai yang tertinggi yaitu 71,92 U/mg. Hal tersebut disebabkan karena pada kondisi normal berbagai organ tubuh mampu bekerja dengan baik, termasuk organ hati yang memiliki mekanisme sistem pertahanan alami berupa enzim antioksidan intrasel yaitu GPx yang berfungsi menetralkan dan mempercepat degradasi senyawa radikal bebas untuk mencegah kerusakan komponen makromolekul sel (Setiawan dan Suhartono 2005). Pada keadaan fisiologis, *Reactive Oxygen Species* (ROS) membantu menjaga homeostasis (Robertson 2004). Pada kondisi normal terjadi keseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan endogen sehingga tidak terjadi peroksidasi lipid yang merupakan proses perusakan oksidasi asam lipid tidak jenuh rantai panjang (*polyunsaturated fatty acids*) pada membran sel (Yustika 2013), dan pada kelompok normal memiliki kadar glukosa darah yang normal dimana peningkatan kadar glukosa darah yang terjadi tidak sampai melebihi 200 mg/dl karena hewan uji hanya diberikan pakan tanpa induksi STZ-Na.

Kelompok kontrol negatif menunjukkan aktivitas GPx yang paling rendah yaitu 20,06 U/mg dan berbeda secara signifikan ($p<0,05$) jika dibandingkan dengan kelompok normal, kelompok pembanding, dan kelompok variasi dosis ekstrak. Hal tersebut disebabkan karena kelompok kontrol negatif selama 14 hari

hanya diberikan pembawa CMC 0,5% dan kondisi hiperglikemia akibat induksi STZ-Na. Dan Kelompok kontrol negatif yang hanya diberikan perlakuan dengan CMC Na 0,5% memiliki kadar glukosa darah yang tetap tinggi setelah diinduksi dengan STZ-Na yaitu di atas 200 mg/dl pada waktu hari ke 15 sampai hari ke 29 yang mengindikasikan bahwa induksi STZ-Na telah berhasil membuat tikus mengalami keadaan hiperglikemik. STZ-Na sebagai agen radikal bebas yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada pankreas tikus. Kondisi hiperglikemia menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein, dan aktivasi jalur metabolisme poliol yang selanjutnya mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif yang dapat menyebabkan modifikasi molekuler berbagai jaringan, hal ini merupakan awal kerusakan oksidatif karena terjadi ketidakseimbangan antara antioksidan protektif dan peningkatan produksi radikal bebas. Radikal bebas yang dihasilkan tidak mampu dinetralkan oleh antioksidan endogen yaitu GPx. Kelompok kontrol negatif pada penelitian ini digunakan sebagai penanda kerusakan oksidatif akibat radikal bebas. Kerusakan oksidatif pada kelompok ini dapat dilihat dari penurunan aktivitas GPx jika dibandingkan dengan kelompok normal yang hanya diberi makan dan minum, karena pada kontrol normal tidak diinduksi dengan STZ-Na sehingga tidak terjadi proses kerusakan oksidatif (Monroy dan Mejia 2013). *Streptozotocin* merupakan suatu nitrosurea penghasil radikal nitrogen oksida (NO) dan radikal hidroksil (OH) dalam jumlah besar. Mekanismenya pada sel β pankreas adalah melalui efek sitotoksik yang dipicu oleh *reactive oxygen species* (ROS) yang dapat meningkatkan konsentrasi kalsium sitosol secara simultan yang menyebabkan kerusakan sel β pankreas dengan cepat. STZ memasuki sel β pankreas melalui GLUT-2 dan menyebabkan alkilasi *deoxyribonucleic acid* (DNA). Kerusakan DNA memicu aktivasi poli-*adenosine diphosphate* (ADP)-ribosilasi, suatu proses yang lebih penting dari diabetogenisitas STZ daripada kerusakan DNA itu sendiri. Poli-ADP-ribosilasi ini menyebabkan deplesi *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD^+) dan *adenosine triphosphate* (ATP) sel. Sehingga terjadi penurunan ATP setelah pemberian STZ akan menyediakan substrat untuk xantin oksidase menghasilkan formasi dari radikal superoksida. Akibatnya, hydrogen peroksida dan radikal hidroksil juga terbentuk.

Terlebih STZ melepaskan sejumlah toksik nitrit oksida yang menghambat aktivitas akonitase dan berpartisipasi terhadap kerusakan DNA. Hasilnya, aktivitas STZ terhadap sel β pankreas menyebabkan terjadinya destruksi yang berlanjut nekrosis sehingga terjadi defisiensi insulin, aksi insulin pada sel target menurun sehingga menyebabkan hiperglikemik. Nikotinamid (pyridine-3-carboxamide) adalah derifat vitamin B₃ (niasin) yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan sehingga dapat mereduksi aksi sitotoksik dari STZ. NA melindungi sel beta dengan cara melawan aksi STZ melalui beberapa mekanisme. NA berperan menangkap radikal bebas oksigen dan NO, menghasilkan NAD⁺, serta berperan sebagai inhibitor PARP-1 (*poly ADP-ribose polymerase*). Penghambatan PARP-1 mengakibatkan terjadinya peningkatan NAD⁺ diikuti dengan meningkatnya produksi ATP dan sensitifitas insulin sehingga dapat menghambat terjadinya apoptosis dan nekrosis sel beta Langerhans (Ghasemiet al 2014; Puspitasari 2016) sehingga terjadi peningkatan sekresi insulin.

Hasil pengukuran rata-rata aktivitas GPx pada kelompok kontrol pembanding yaitu 64,67 U/mg jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p<0,05$) berdasarkan analisis statistik. Hal tersebut disebabkan karena kelompok kontrol pembanding diberikan glibenklamid. Glibenklamid merupakan obat antidiabetes golongan sulfonilurea (SU) yang mampu untuk meningkatkan sekresi insulin oleh sel-sel β pulau Langerhans pankreas. Glibenklamid akan berikatan dengan reseptor SUR yang terkait dengan kanal K (*ATP-dependent potassium channel*) menyebabkan penutupan kanal K_{ATP}. Tertutupnya kanal K_{ATP} menyebabkan depolarisasi karena K⁺ tidak dapat masuk ke dalam sel sehingga memicu terbukanya kanal Ca²⁺ (*Calcium dependent voltage channel*) yang memungkinkan kenaikan Ca²⁺ intraseluler dan memicu pelepasan insulin (Ikawati 2008). Peningkatan sekresi insulin dari sel-sel β pulau Langerhans pankreas menyebabkan *intake* glukosa darah sehingga kadar glukosa darah menjadi turun dan tidak terjadi hiperglikemia yang berperan dalam reaksi berantai pembentukan radikal bebas (DiPiro 2008).

Hasil pengukuran rata-rata aktivitas GPx pada kelompok yang diberikan ekstrak etanol daun gedi merah dengan dosis 100, 200, dan 400 mg/Kg BB tikus

yaitu sebesar 28,40 U/mg ; 39,82 U/mg , 62,05 U/mg dan memiliki kadar glukosa darah 170,49 mg/dl, 151,97 mg/dl, dan 122,84. Hal ini menunjukan bahwa semakin meingkatnya aktifitas enzim GPx maka terjadi penurunan kadara glukosda darah. Enzim Gpx mampu melindungi sel beta pankreas dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas, sehingga terjadi peningkatan sensitivitas insulin dan akhirnya terjadi peeningkatan skresi insulin

Jika kelompok uji dengan dosis pemberian yang tertinggi (400 mg/Kg BB tikus) dibandingkan dengan kelompok yang diberikan glibenklamid menunjukkan adanya perbaikan stres oksidatif ($p>0,05$), sehingga mampu untuk meningkatkan aktivitas antioksidan endogen yaitu enzim GPx, SOD dan katalase dengan mekanisme menyebabkan homeostasis pada pankreas berjalan baik sehingga antioksidan endogen dapat bekerja menetralisir atau menangkap radikal bebas. ketika Gpx meningkat maka GSH akan meningkat sehingga dapat memperbaiki morfologi pankreas dan senitifis insulin dan terjadi peningkatan insulin (Shakya *et al.* 2012) Hasil statistik dapat dilihat pada lampiran 23.

Hasil dari uji identifikasi kandungan kimia diketahui bahwa beberapa senyawa yang terdapat dalam ekstrak etanol daun gedi merah bersifat antioksidan. Hasil ini membuktikan bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun gedi merah terutama flavonoid dapat menangkal radikal bebas. Kondisi hiperglikemia yang terjadi pada penderita diabetes mellitus dapat menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein, dan aktivasi jalur poliol-sorbitol yang selanjutnya mempercepat pembentukan ROS (Ueno *et al.* 2002). Terbentuknya ROS tersebut menyebabkan stess oksidatif yang berperan dalam memicu terjadinya komplikasi pada penderita diabetes mellitus. Senyawa flavonoid dan fenolik dapat menurunkan jumlah ROS dengan cara memberikan atom hidrogennya sehingga flavonoid akan teroksidasi dan radikal bebas menjadi senyawa yang lebih stabil (Panjuantiningrum 2010). Mekanisme metabolisme flavonoid memiliki proses tersendiri dalam tubuh kita. Ketika masuk ke lambung, struktur dari oligomer flavonoid akan terpecah menjadi unit monomerik yang lebih kecil. Monomer flavonol akan mengalami metabolisme yang lebih luas dengan biotransformasi yang diawali dalam eritrosit dan dibawa oleh enzim-

enzim yang berasal dari hepar dan ginjal. Kemudian sesampainya pada usus halus, unit monomerik ini akan diabsorbsi dalam bentuk *Omethlated glucuronoides*, *O-methylated* dan *aglycone* yang selanjutnya akan memasuki vena porta. Dalam vena porta selanjutnya flavonoid akan dimetabolisme lagi dan diubah menjadi bentuk *O-methylated*, *sulphates*, dan *glucuronides*. *Omethlated* akan masuk ke dalam sel dan berfungsi melawan kematian apoptosis sel yang diinduksi oleh hidrogen peroksida. Kemampuan *O-methylated* dalam memproteksi sel berhubungan dengan kemampuannya mendonorkan atom hidrogen. Fakta inilah yang menghubungkan fungsi flavonoid dalam memproteksi kematian sel akibat induksi oksidan melalui mekanisme independen antioksidan (Uribe & Bektash 2008). Menurut Panche *et al.* (2016) ketika hidrogen peroksida diturunkan oleh flavonoid maka Gpx akan meningkat sehingga sekresi inulin meningkat.

Tubuh manusia dapat menghasilkan senyawa antioksidan endogen seperti SOD (*Superoxide Dismutase*), GPx (*Glutation peroxidase*) dan *catalase* yang berperan dalam melindungi tubuh dari serangan radikal bebas. Namun jumlah antioksidan endogen tersebut terbatas dengan adanya senyawa flavonoid, saponin, tanin dan alkaloid yang terkandung dalam ekstrak etanol daun gedi mampu meningkatkan aktivitas GPx karena senyawa-senyawa tersebut berperan sebagai antioksidan dan antidiabetes dimana dapat membantu penyembuhan diabetes dengan meningkatkan ketersediaan enzim antioksidan di dalam tubuh.

Saponin dapat berfungsi sebagai antidiabetes dibuktikan oleh penelitian yang dilakukan oleh Firdous *et al.* (2009) terhadap histopatologi pankreas, diketahui bahwa saponin mampu meregenerasi pankreas yang menyebabkan adanya peningkatan jumlah sel-sel β pulau Langerhans pankreas sehingga sekresi insulin meningkat. Peningkatan sekresi insulin tersebut membantu menurunkan kadar glukosa darah. Kelompok saponin yang dihasilkan legum, terutama kelompok B soyasaponin, mengandung gugus antioksidan yang melekat pada atom C²³ (Yoshiki dkk. 1998). Residu gula khas ini memungkinkan saponin untuk mengacaukan superokksida melalui pembentukan intermediate hidroperoksida, sehingga mencegah kerusakan biomolekul oleh radikal bebas.

Ketika radikal bebas menurun maka enzim Gpx akan meningkat sehingga dapat meningkatkan skresi insulin dan dapat menurunkan kadar glukosa darah.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa :

Pertama, ekstrak etanol daun gedi merah memiliki aktivitas antioksidan dalam menangkal radikal bebas DPPH dengan nilai IC_{50} 133,05 ppm.

Kedua, ekstrak etanol daun gedi merah mampu meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase pada tikus yang diinduksi STZ-Na.

Ketiga, dosis ekstrak etanol daun gedi merah yang paling kuat dalam meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase adalah dosis 400 mg/kg BB tikus.

B. Saran

Saran untuk penelitian ini adalah

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat senyawa apa saja yang terkandung dalam daun gedi merah yang mampu menghambat radikal bebas DPPH dan meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase.

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan fraksi-fraksi dari ekstrak etanol daun gedi merah.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad Sjamsul. 1986. *Kimia organik Bahan Alam*. Jakarta: karunika Jakarta Universitas terbuka.
- Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW. 1999. The myeloperoxidase of human phagocytes generates N-carboxymethyl lysine on proteins: a mechanism for producing advance glycation end products at sites of inflammation. *J Clin Invest* 104(1):103-13.
- Anonim 1993. *Pedoman pengujian dan pengembangan fitofarmaka, Penapisan Farmakologi dan Pengujian klinik*. Jakarta: Yayasan Pengembangan Obat Bahan Alam Phyto Medica.
- Anonim 2008. *MIMS Petunjuk Konsultasi*. Jakarta: PT. Info Master Lisensi.
- Antolovich, Michael, Paul DP, Emilios P, Suzanne MD, Kevin R. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 172:183-198.
- Atta et al. 2001. Bioactive natural product a potential pharmacopores, a theory of memory, pure appl. *Chem* 73:555-560
- Beckett AH, Kalsi VS, 2003. *Compell⁵⁸ I For suplementation: how specific nutrients help retard the compacation of diabetes militus*. Disampaikan dalam Symposium “compeling Need For Nutrient Therapy in The Treatment of Diabetes mellitus and The associated Complication”, Surabaya, 8 February, 2003.
- Beckman Ja, Goldfine AB, Gordin MB, Creager MA. 2001. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilatation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation* 103:1618-23.
- Bio Vision. 2012. Glutathion Peroxidase Activity Assay Kit. [Catalog #K762-100]. <http://www.biovision.com> [juli 2012].
- Burda S, Oleszek W. 2001. Antioxidant and activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:2774-2779.
- Carr A, Frei B. 1999 Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C base antioxidant and healt effects in humans. *Am J Clin Nutr* 69:1086-107
- Chen CY, Holtzman GI, Bakhit RM, 2002. High-genistin isoflavone supplementation modulate erythrocyte antioxidant enzymes and increased running endurance in rats undergoing one session of exhausting exercise-a pilot study. *Parkistan journal of nutrition* 1(1):1-7

- Chumbhale.e, et al.. *Preliminary Phytochemical And Phenolic Contens Of Stem Bark Of Abelmoschus manihot* (Linn.) Medik. India: Departemen Of Pharmacolognosi, Amrutvahini College Of Pharmacy. 2013.
- Corwin Ej. 2009. *Buku Saku Patofisiologi*. Edisi Revisi ke-3. Subekti NB, Penerjemah; Jakarta: ECG. Terjemahan dari: *handbook of pathophysiology*.
- Dalimartha S. 2008. *1001 Resep herbal*. Jakarta: Penebar Swadaya
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1979. *Farmakope Indonesia*. Edisi ke-3. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik indonesia. 1987. *Analisa obat tradisional*. Jilid II. Jakarta
- Departemen Kesehatan Republik indonesia. 1986. *Sedian galenika*. Jakarta
- Departemen Kesehatan. 1986. *Farmakope Indonesia*. Edisi ke-4. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan. 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi ke-4. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan. 1986. *Sediaan Galenik*. Edisi ke-3. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan. 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi ke-4. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan. 2009. *Pedoman Pengendalian Tikus Khusus di Rumah sakit*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dipiro JT, Talbert RI, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM. 2008. *Pharmacotherapy: A Photophysiological Approach. Seventh Edition*. McGraw-Hill. New York.
- Draelos. 2010. *Cosmetic Dermatology Products & Procedures*. United Kingdom: Willey-backwell.
- Droge W. 2007. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physial Rev* 82:47-95.
- Firdous M, Koneri R, Sarvaraidu CH, Shubhapriya KH. 2009. Antidiabetic Activity of Saponin of *Momordica Cymbalaria* In Sterptozotosin-Nicotinamide NIDDN Mice. *Journal Of Clinical and Diagnosis Research* 3: 1460-1465.

- Gandjar, Ibnu G, Abdul R. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gunawan D, Mulyani S. 2004. *Ilmu Obata lam (Farmakognosi)*. Jilid pertama. Yogyakarta: Penebar Swadaya.
- Gunawan D, Mulyani S. 2007. *Ilmu Obata lam (Farmakognosi)*. Jilid pertama. jakarta: Penebar Swadaya.
- Haffner SM. 1999 The importance of hyperglycemia in the non fasting state to the development cardiovascular state. *Endocrine Review* 19(5):583-92.
- Halliwel B, Gutteridge JMC. 1999. Free radical in biology and Medicine. New York: Oxford University press.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terbitan ke-2. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah; bandung: Institut Teknologi Bandung. Terjemah dari: phytochemical Methods.
- Harborne JB. 2006. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Kosasih P, Iwan S, penerjemah; bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Heinrich M, Barnes J, Gibbons S Williamson E. 2009. *Farmakognosi dan fitoterapi*. Jakarta: penerbit buku kedokteran. Hlm 85.
- Hernani dan rahardjo. 2005. *Tanaman Berkhasiat Antioksidan*. Jakarta: penebar swadana.
- Herowati R. 2005. Aktivitas antiinflamasi rutin dan kuercetin setelah pemakaian per oral terhadap radang kaki tikus yang di induksi karagen. *Jurnal Farmasi Indonesia* 2:35-37.
- Ikawati Z. 2008. *Pengantar Farmakologi Molekuler*. Yogyakarta: gadjah Mada University Press.
- June et al. 2003. Camparison of antioxidant activities of isovlafones form kudzu root (*puerarura labata* O). *journal food Science Institute of technologist* 68:2117-2122.
- Kemenkes. 2013. Farmakope Herbal Indnesia. Suplemen III. Edisi 1. Jakarta: Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.
- Khelifi S, Hachmini Y, Khalil A, Safi N, Abbouyi A. 2005. In vitro Antioxidant effect of *Globularia alypum* L. Hy dromethanolic extract. *Indian J Pharmacol* 37(4):227-231.

- Khomsan A. 2009. *Rahasia Sehat dengan makanan Berkhasiat*. Jakarta; Kompas Media Nusantara.
- Kowlura RA, Tang J, Kern TS. 2001. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experiment galactosemia. *Diabetes* 50:1938-42.
- Kurniawan D. 2008. Regresi linier. <http://ineddeni.wordpress.com>
- Lawrence dan Burk. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem biophys Res Commun* 71:952-958.
- Lenzen S. 2007. The mechanisms of alloxan and streptozotocin induced diabetes. *Diabetologia* 51: 216-226.
- Linder MC. 2006. *Biokimia Nutrisi dan Metabolisme*. UI Press. Jakarta: 265-278.
- Monroy ML, Mejia CF. 2013. Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the role of vitamins with antioxidant actions. Mexico Ntech 9;210-215.
- Moron UM, Cortazer IC. 2012. Protection against oxidative stress and “IGF-I deficiency conditions”. Intech 1:89-116
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal kesehatan* 7(2).
- Mustarichie R, Musfiroh I, Levita J 2011. *Metode Penelitian Tanaman Obat*. Bandung: Widya Padjajaran. Hlm 8-17.
- Nabyl. 2012. *Panduan Hidup Sehat Mencegah dan Mengatasi Diabetes Mellitus*. Yogyakarta: Aulia Publishing.
- Narayanaswamy N, Duraisamy A. 2011. Tyrosinase inhibition and anti-oxidant properties of *Muntingia calabura* extracts: in vitro studies. *International journal of pharma and bio sciences* 2.
- Nishimura CY. 1998. Aldose reductase in glucose toxicity: A potential targets for the prevention of diabetic complications. *Pharmacological reviews* 50(1):21-33.
- Niwa T, Katsuzaki T, Miyazaki S. 1997. Immunehistochemical detection of imidazolone, a novel advance glycation end product, in kidney and aortas of diabetic patients. *J Clin Invest* 99(6):1272-80.
- Nugroho AE. 2012. *Farmakologi Obat-obat Penting dalam Pembelajaran Ilmu Farmasi & Dunia Kesehatan*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar, Hlm 146-152.

- Nuttal SL, Dunne F, Kendal MJ, Martin U. 1999. Age-independent oxidative stress in elderly patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Q J Med* 92:33-8.
- Oberley L W. 1988. free radical and diabetes. *Free radic Biol Med* 5(2): 113-24.
- Oldfield MD, Bach LA, Forbes JM. 2001. Advance glycation end product cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advance glycation end products (RAGE). *J Clin Invest* 108:1853-63.
- Panovska, T.K., Kulevanova, S., Stefova., 2005, In Vitro Antioxidant Activity of Some Teucrium Species (Lamiaceae), *Acta Pharm*, 55 hal 207-214
- Parkeni. 2011. *Konsensus pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Mellitus tipe 2 di Indonesia*. Jakarta: parkeni.
- Porth CM, Matfine G. 2009 Phatophysiology: Concepts of Altered health States. 8th edition.
- Rahbani-Nobar ME, Rahimi-pour A, Adi-beig F, Mirhashemi SM. 1999. Total antioxidant capacity, superoxide dismuted and Glutathione Peroxidase in diabetic patients. *Medical journal of Islamic Academy of Sciences* 12(4):109-14.
- Redha A. 2010. Flavonoid: struktur, sifat antioksidatif dan peranannya dalam sistem biologis. *Jurnal Belian* 9:196-202.
- Robbins, Vinay K, Ramzi S, Cotran, Stanley. 2007. *Buku ajar patologi Edisi 7*. Jakarta: EGC. Hlm 723-725.
- Robertson RP, 2004. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic beta cells in diabetic. *The journal of biological Chemistry* 279:42351-42354.
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi IV. Bandung: Institut Teknologi Bandung. Hlm 281
- Rohrdanz E, Sandra O, Quynh-Hoa T, Regine K. 2002. The Phytoestrogen daidzein effects the antioxidant enzyme system rat hepatoma H4HE cells *journal of Nutrition* 132:370-375.
- Russell-Smith *et al.* 2007. Rural livelihoods and burning practices in savanna landscapes of Nusa Tenggara Timur, Eastern Indonesia. *Hum Ecol* 35:345-359
- Sacherher RA, Mc Pherson RA. 2004. *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium*. Jakarta: EGC. Hlm. 518-526.

- Sagar B, Kedare S. 2011. *J Food Sci Technol* 48(4):412-422.
- Sarker SD, Latif Z, Gray AI. 2006. *Natural Product Isolation*. Edisi ke-2. Humana press. Hlm 30-32, 340-342.
- Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy R, Biplab D. 2010. Free Radicals, Antioxidant, Disease and Phytomedicines: Current Status and Future Prospect. *International journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 2(1): 021.
- Setiawan B, Suhartono E. 2005. Stres oksidatif dan peran Antioksidan pada diabetes melitus. *Majalah kedokteran Indonesia* 55(2): 86-91.
- Setyanto AMN. 2012. Formulasi sediaan krim antioksidan dari ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) [skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia budi.
- Shakya G, Goud C, Pajaniradje S, Rajagopalan R. 2012. Protective Role of Wheatgrass on Oxidative stress In Streptozotocin Induce Type 2 Diabetic Rats. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. ISSN-0975-1491. Vol 4, Issue 3
- Shoda H, Miyata S, liu HF. 1997. Inhibitory effect of tenil setain on the Maillard reaction. *Endocrinology* 138(5):1886-92.
- Simanjuntak D, Sudaryati E. 1998. Aspek pencegahan radikal bebas melalui antioksidan. *Majalah kedokteran Indonesia* 48(1):50-4.
- Soegondo S. 2013 *Penatalaksanaan Diabetes Mellitus Terpadu*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Soesilowati S. 2003. Diabetic neuropathy: Pathogenesis and Treatment. *Acta Medica Indonesia* 35(1):27-34.
- Song Y et al. 2005 Association of dietary flavonoids with risks of type 2 diabetes and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. *Journal of the American college of nutrism* 24(5):376-384.
- Suarsana I, Utama IH, Agung I, Suartini A. 2011. Pengaruh hiperglikemia dan vitamin E pada kadar malonaldehida dan enzim antioksidan intrasel jaringan pankreas tikus. *MKB* 43(2)
- Sudarmaji S, Haryono B, Suhardi. 2010. *Prosedur Analisis untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.

- Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiadi S. 2006. *Buku Ajar Penyakit Dalam*. Jilid 3 Edisi IV. Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FKUI. Hlm 1852-1893.
- Sukandar EY, Andrayati R, Sigit JI, Adnyana IK, Setiadi AAP, Kusnandar. 2008. *ISO Farmakoterapi*. Jakarta: PT ISFI Penerbitan Hlm 26-36.
- Sunarni T. 2005. Aktivitas antioksidan penangkap radikal daun kepel (*Stelechocarpus Burahol* (BI.) Hook f. & Th.). *Jurnal Farmasi Indonesia* 2:14-15.
- Sundoyo, Ari W. 2006. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Edisi IV Jilid II. Jakarta: Pusat Penerbit Departemen Ilmu Penyakit Dalam. FKUI.
- Szkudelski T. 2012. Streptozotocin-nikotinamid induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental Biology and Medicine*. 237: 481-490.
- Tende JA, Ezekiel I, Dikko AAU, Goji ADT. 2011. Effect of ethanolic leaves extract of moringa oleifera on blood glucose levels of streptozotocin induced diabetics and normoglycemic wistar rats. *Br J Pharm toxicol* 2:1-4.
- Tjay, Tan Hoan, Raharja, Kirana. (2002), Obat-Obat Penting: *khasiat Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya*, Edisi kelima, cetakan kedua, Penerbit PT Alex Media Komputindo, Jakarta.
- 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.
- Voight R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Edisi ke-5. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- Voight R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Edisi V. Soendani NS, Penerjemah. Yogyakarta: Gajah Mada University Press. Terjemahan dari Lehrbuch der Pharmazeutischen Technology. Hlm 561-567
- Widiowati W. 2008. Potensi antioksidan sebagai antidiabetes. *Jurnal kedokteran Maranatha* 7(2).
- Winarsi H. 2007. Antioksidan alami dan Radikal Bebas. Yogyakarta: Kanisius.
- Windono *et al.* 2001. Uji perendaman radikal bebas terhadap 1,1 diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH) dari ekstrak kulit buah dan biji anggur (*vitis vinifera* L.) Probolinggo Biru dan Bali. *Artocarpus* 1.
- Youngson R. 2005. Antioksidan manfaat Vitamin C & E Bagi Kesehatan. Jakarta: Arcan.

Yustika AR, Aulanni'am, Prasetyawan S. 2013. Kadar malondialdehid (MDA) dan gambaran histopatologi pada ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) pasca induksi Cylosporine-A. Student journal 1:222:228.

L

A

M

P

I

R

A

N

Lampiran 1. Surat determinasi tanaman



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS SEBELAS MARET

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

LAB. PROGRAM STUDI BIOLOGI

Jl. Ir. Sutami 36A Kentingan Surakarta 57126 Telp. (0271) 663375 Fax (0271) 663375
<http://www.biology.mipa.uns.ac.id>, E-mail biologi@mipa.uns.ac.id

Nomor : 71/UN27.9.6.4/Lab/2018
Hasil : Hasil Determinasi Tumbuhan
Lampiran : -

Nama Pemesan : Muhammad Firdaus
NIM : 20144098A
Alamat : Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

HASIL DETERMINASI TUMBUHAN

Nama Sampel : *Abelmoschus manihot* (L.) Medik.
Familia : Malvaceae

Hasil Determinasi menurut C.A. Backer & R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr. (1963) :
1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31a-32a-33a-34a-35a-36d-37b-38b-39b-41b-42b-44b-45b-46e-50b-51b-53b-54b-56b-57b-58b-59d-72b-73b-74b-631b-632b-633a-634b-635b-636b-637b-638a-639b-640b-652d-653b-655b-656a-657b-658a-659b-660a _____ 96. Malvaceae
1b-3b-5b-13b-14b-15a-16a _____ 14. *Abelmoschus*
1b-2a-3b _____ *Abelmoschus manihot* (L.) Medik.

Deskripsi Tumbuhan :

Habitus : perdu, menahun, tumbuh tegak, tinggi 1.5-7.5 m. Akar : tunggang, bercabang-cabang, kuning muda hingga kuning keputihan. Batang : bulat, berkayu, bercabang-cabang, percabangan monopodial, permukaan batang muda sedikit berambut tetapi gundul pada batang dewasa. Daun : tunggal, tersebar, helaian daun bulat hingga bulat telur memanjang, panjang 10-60 cm, lebar 5-60 cm, pangkal berlekuk seperti jantung, tepi berbagi 5-7 taju, ujungnya membulat, berambut hingga gundul, permukaan atas hijau tua, permukaan bawah hijau muda, pertulangan menjari; taju daun berbentuk segitiga atau lanset memanjang atau bulat telur memanjang atau garis, ujungnya runcing hingga meruncing, tepi rata hingga bergerigi; tangkai daun bulat, panjang 2-60 cm, sedikit berambut hingga gundul, hijau; daun penumpu sepasang, terletak bebas di kanan kiri pangkal tangkai daun, berbentuk lanset, panjang 1-1.5 cm, hijau. Bunga : tunggal, berkelamin 2 (biseksual), berbentuk lonceng, diameter 12 cm, tumbuh di ketiak daun, tumbuh menggantung ke bawah; tangkai bunga bulat, hijau, panjang 1-5 cm, sedikit berambut hingga gundul; daun kelopak tambahan (*epicalyx*) seringkali 5, panjang 2-3 cm, lebar 0.2-1 cm, hijau, berambut; kelopak bunga berbentuk tabung, berbagi 5, tajunya bentuk lanset, berambut, warna hijau tua; daun mahkota bulat telur terbalik, panjang 3.5-8 cm, lebar 3-6 cm, tepi rata, berwarna kuning cerah dan bagian tengahnya ungu; benang sari bentuk tabung, panjang 1.5-2 cm, kepala sari hampir duduk, kuning; kepala putik berwarna ungu gelap. Buah : buah kapsul, bulat memanjang, panjang 4-5 cm, diameter 2.5-3 cm. Biji : kecil, banyak, berbentuk seperti ginjal, berambut.

Surakarta, 26 Maret 2018

Kepala Lab. Program Studi Biologi

Dr. Tetri Widiyani, M.Si.
NIP. 19711224 20003 2 001

Penanggungjawab
Determinasi Tumbuhan

Suratman, S.Si., M.Si.
NIP. 19800705 200212 1 002



Mengetahui
Dr. Ratna Setyaningsih, M.Si.
NIP. 19660714 199903 2 001

Lampiran 2. Ethical clearance

11/30/2017

Form A2



HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
Dr. Moewardi General Hospital
RSUD Dr. Moewardi



School of Medicine Sebelas Maret University
Fakultas Kedokteran Universitas sebelas Maret

ETHICAL CLEARANCE
KELAIKAN ETIK

Nomor : 1.073 / XI / HREC /2017

The Health Research Ethics Committee Dr. Moewardi General Hospital / School of Medicine Sebelas Maret
 Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Moewardi / Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret

Maret University Of Surakarta, after reviewing the proposal design, herewith to certify
 Surakarta, setelah menilai rancangan penelitian yang diusulkan, dengan ini menyatakan

That the research proposal with topic :
 Bahwa usulan penelitian dengan judul

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN GEDI MERAH (*Abelmoschus manihot* L. Medik)
 TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH DAN AKTIVITAS ENZIM GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS
 DIABETES**

Principal investigator : Muhammad firdaus
 Peneliti Utama : 20144098A

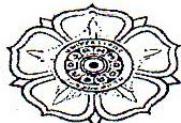
Location of research : Universitas Gadjah Mada
 Lokasi Tempat Penelitian

Is ethically approved
 Dinyatakan layak etik

Issued on : 30 Nov 2017



Lampiran 3. Surat Praktik Penelitian



UNIVERSITAS GADJAH MADA
Pusat Studi Pangan dan Gizi
 Jln. Teknika Utara, Barek, YOGYAKARTA 55281
 Telp. 0274 589242, 6492282 Web : www.cfns.ugm.ac.id
 Email : cfns@ugm.ac.id

SURAT KETERANGAN BEBAS PEMINJAMAN

Menerangkan bahwa yang tersebut di bawah ini :

Nama	: Muhammad Firdaus
Nomor Mahasiswa	: 20144098A
Jurusan	: S1 Farmasi
Fakultas	: Farmasi
Universitas	: Universitas Setia Budi
Alamat rumah	:

Tidak mempunyai pinjaman peralatan dan bon bahan di laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) Universitas Gadjah Mada.

Yogyakarta, 10 April 2018

Teknisi,
 Laboratorium Mikrobiologi

Teknisi,
 Laboratorium Kimia dan Biokimia

Teknisi,
 Laboratorium Gizi

Teknisi,
 Laboratorium Rekayasa Pangan

Mengetahui,
 Sekretaris

 Dr. Ir. Setyastuti Purwanti, SU
 NIP. 195203021979032001



Pusat Studi Pangan dan Gizi
Universitas Gadjah Mada

SERTIFIKAT

Nomor : PSPG-UGM/04/PHC/XI/2017

DIBERIKAN KEPADA

Muhammad Firdaus

sebagai
Peserta

Pada "Pelatihan Dasar Penanganan Hewan Coba"
yang diselenggarakan oleh:
Pusat Studi Pangan dan Gizi
Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta, 22 November 2017

Kepala Pusat Studi Pangan dan Gizi,



Prof. Dr. Ir. Umar Santoso, M.Sc.

Ketua Pelaksana,



Dr. Siti Helmyati, DCN., M.Kes

**Lampiran 4. Hasil presentase rendemen bobot kering terhadap bobot basah
daun gedi merah**

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Rendemen
9000	1700	18,88%

Perhitungan rendemen :

$$\% \text{ rendemen kering} = \frac{\text{Berat kering}}{\text{Berat basah}} \times 100\%$$

$$= \frac{1,7}{9} \times 100\%$$

$$= 18,88\%$$

Lampiran 5. Hasil penetapan kadar air daun gedi merah

Berat awal (gram)	Volume akhir (ml)	Kadar air (%)
20	1,5	7,5
20	1,4	7
20	1,4	7
Rata-rata		7,167±0,289

Rumus perhitungan kadar air (%) :

$$\begin{aligned} \text{Kadar air sampel 1} &= \frac{\text{volume akhir}}{\text{volume awal}} \times 100\% \\ &= \frac{1,5}{20} \times 100\% \\ &= 7,5\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar air sampel 2} &= \frac{\text{volume akhir}}{\text{volume awal}} \times 100\% \\ &= \frac{1,4}{20} \times 100\% \\ &= 7\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar air sampel 3} &= \frac{\text{volume akhir}}{\text{volume awal}} \times 100\% \\ &= \frac{1,4}{20} \times 100\% \\ &= 7\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rata-rata kadar air serbuk daun gedi merah} &= \frac{(7,5\%+7\%+7\%)}{3} \\ &= 7,167\% \end{aligned}$$

Hasil kadar air serbuk daun gedi merah memenuhi persyaratan yang ditentukan yaitu kecil dari 10% (< 10%).

Lampiran 6. Perhitungan rendemen ekstrak etanol daun gedi meah

Berat serbuk (gram)	Berat ekstrak (gram)	Rendemen (%)
1500	104,7646	6,984

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen ekstrak} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat serbuk}} \times 100\% \\
 &= \frac{104,7646}{1500} \times 100\% \\
 &= 6,984 \%
 \end{aligned}$$

Hasil rendemen ekstrak daun gedi merah yang diperoleh sebesar 6,984 %

Lampiran 7. Hasil identifikasi kandungan kimia serbuk daun gedi merah**Flavonoid**

Serbuk + 2 mL metanol + serbuk Mg 0,1 gram + HCl 5 tetes → Warna kuning pada lapisan amilalkohol (+)

Tanin

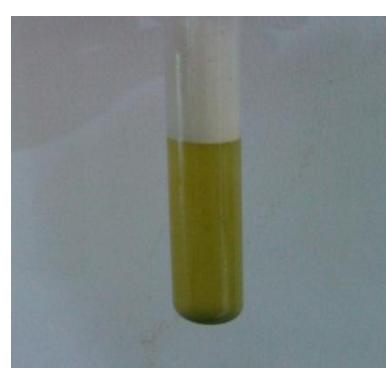
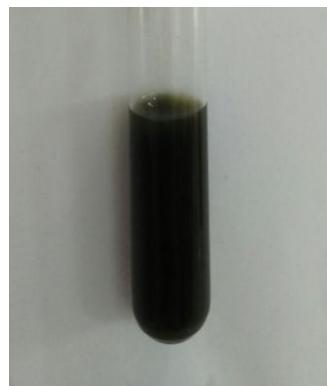
Serbuk + 20 mL air panas, disaring + FeCl₃ 5 tetes → warna hijau violet (+)

**Saponin**

Serbuk + HCl 2N 1 → tetes buih yang menetap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1 cm sampai 10 cm

Alkaloid

Serbuk + Reagen Mayer 2 tetes → endapan dan kekeruhan berwarna coklat (-)

Lampiran 8. Hasil identifikasi ekstrak etanol daun gedi merah**Flavonoid****Saponin****Tanin****Alkaloid**

Lampiran 9. Radikal bebas DPPH**Penimbangan DPPH**

$$80 \text{ ppm} = \frac{80 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{8 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

Untuk membuat larutan DPPH konsentrasi 80 ppm maka ditimbang DPPH sebanyak 8 mg.

Pembuatan larutan DPPH

DPPH yang telah ditimbang menggunakan neraca elektrik sebanyak 8 mg, dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas dalam labu takar 100 ml yang telah ditutupi dengan alumunium foil.

Lampiran 10. Penetapan panjang gelombang maksimum DPPH

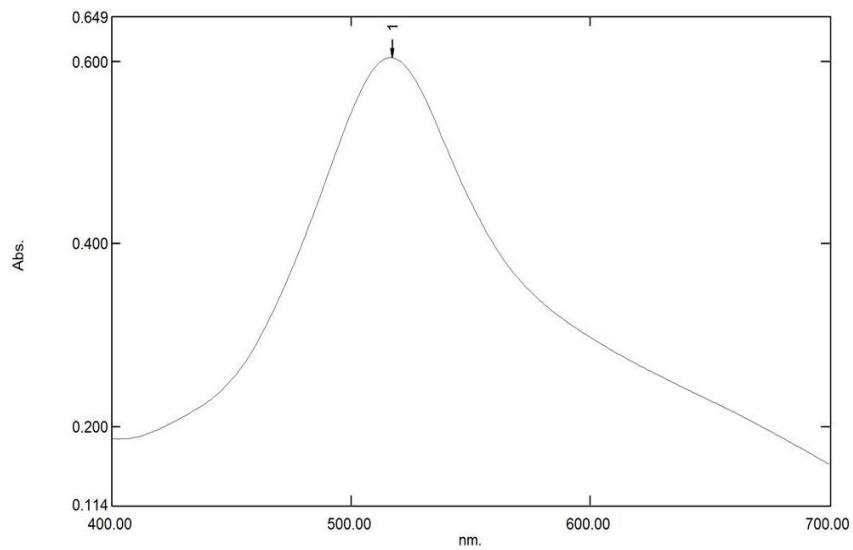
Thursday, March 29, 2018

2:12 PM

Spectrum Peak Pick Report

29-03-18 02:12:44 PM

Data Set: lamda max_141057 - RawData



Measurement Properties

Wavelength Range (nm.): 400.00 to 700.00
 Scan Speed: Medium
 Sampling Interval: 1.0
 Auto Sampling Interval: Disabled
 Scan Mode: Auto

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	●	517.00	0.604	

Instrument Properties

Instrument Type: UV-1800 Series
 Measuring Mode: Absorbance
 Slit Width: 1.0 nm
 Light Source Change Wavelength: 363.0 nm
 S/R Exchange: Normal

Attachment Properties

Attachment: None

Sample Preparation Properties

Weight:
 Volume:
 Dilution:
 Path Length:
 Additional Information:

Lampiran 11. Ekstrak etanol daun gedi merah

Penimbangan ekstrak kental

$$1000 \text{ ppm} = 1000 \text{ mg/L} = 1 \text{ mg/ml} \text{ sehingga } 1000 \text{ ppm} = \frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{100 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

Untuk membuat larutan induk ekstrak konsentrasi 1000 ppm maka ditimbang ekstrak kental sebanyak 100 mg.

Pembuatan larutan induk ekstrak

Ekstrak yang telah ditimbang menggunakan neraca elektrik sebanyak 100 mg, dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas dalam labu takar 100 ml.

Pembuatan seri konsentrasi

Larutan induk ekstrak 1000 ppm dibuat seri konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm dan 100 ppm.

Konsentrasi (ppm)	Pengenceran (ml)	Volume yang dibuat (ml)
20	1	50
40	2	50
60	3	50
80	4	50
100	5	50

Contoh perhitungan pembuatan konsentrasi 20 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 20 \text{ ppm} \times 50 \text{ ml}$$

$$V_1 = 1 \text{ ml}$$

Larutan induk ekstrak 1000 ppm dipipet sebanyak 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, dan 5 ml kemudian masing-masing dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas dalam labu takar 50 ml.

Lampiran 12. Penetapan *operating time* daun gedi merah**Kinetics Data Print Report**

29/03/2018 03:05:44 PM

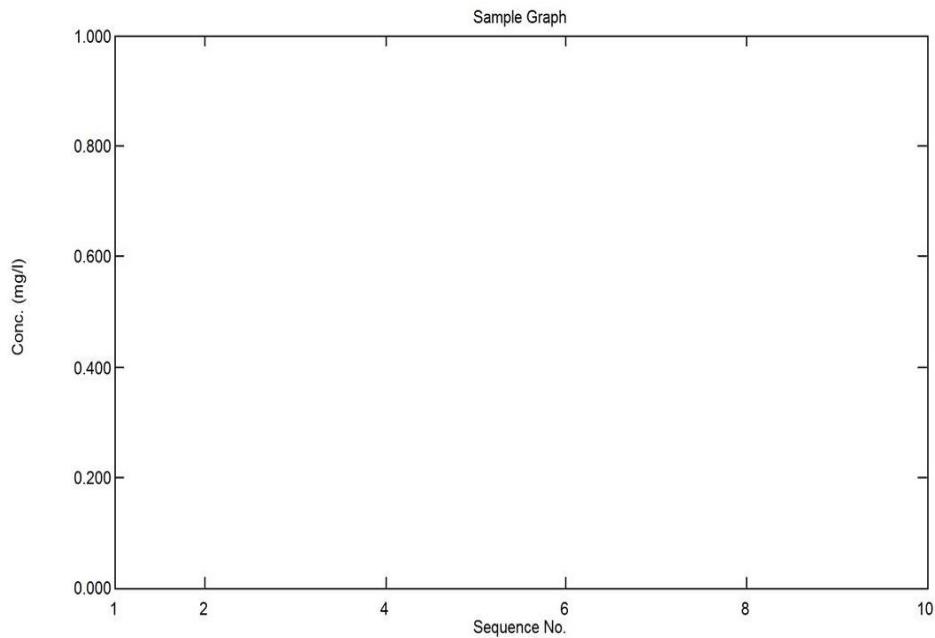
Time (Minutes)	RawData ...
1.000	0.106
2.000	0.106
3.000	0.105
4.000	0.105
5.000	0.100
6.000	0.100
7.000	0.100
8.000	0.099
9.000	0.099
10.000	0.099
11.000	0.098
12.000	0.098
13.000	0.098
14.000	0.098
15.000	0.097
16.000	0.097
17.000	0.096
18.000	0.097
19.000	0.097
20.000	0.096
21.000	0.096
22.000	0.096
23.000	0.094
24.000	0.094
25.000	0.092
26.000	0.092
27.000	0.092
28.000	0.092
29.000	0.092
30.000	0.092

Lampiran 13. Data ekstrak

Sample Table Report

29-03-18 04:25:55 PM

File Name: C:\Program Files\Shimadzu\UVProbe\Data\daus\ekstrak.pho



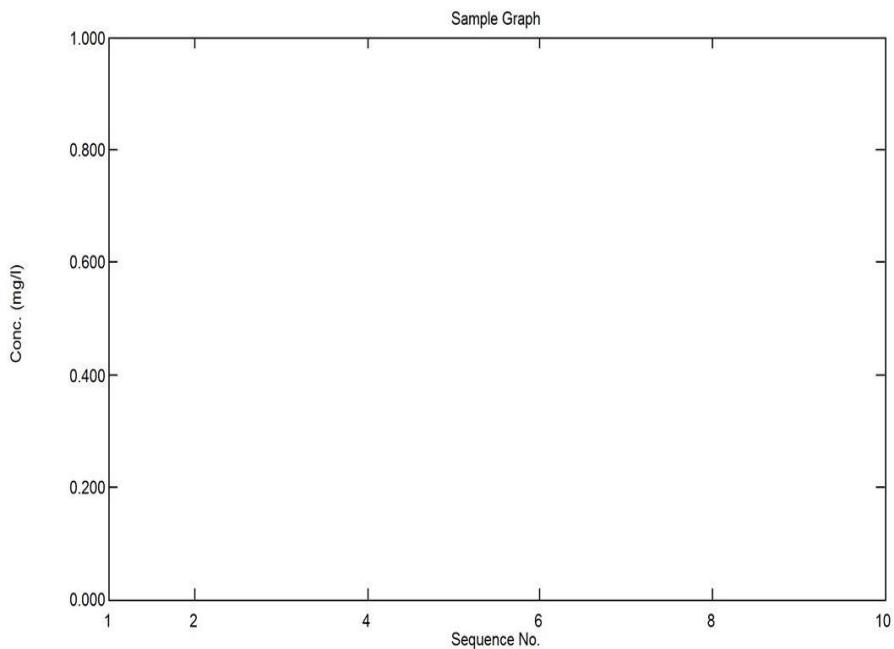
Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL517.0	Comments
1	20 ppm eks	Unk-Repeat			0.492	
2	20 ppm eks-2	Unk-Repeat			0.492	
3	20 ppm eks-3	Unk-Repeat			0.492	
4	20 ppm eks-Av	Average		*****	0.492	Avg of preceding 3 Samples
5	40 ppm eks	Unk-Repeat			0.480	
6	40 ppm eks-2	Unk-Repeat			0.480	
7	40 ppm eks-3	Unk-Repeat			0.480	
8	40 ppm eks-Av	Average		*****	0.480	Avg of preceding 3 Samples
9	60 ppm eks	Unk-Repeat			0.466	
10	60 ppm eks-2	Unk-Repeat			0.466	
11	60 ppm eks-3	Unk-Repeat			0.466	
12	60 ppm eks-Av	Average		*****	0.466	Avg of preceding 3 Samples
13	80 ppm eks	Unk-Repeat			0.420	
14	80 ppm eks-2	Unk-Repeat			0.420	
15	80 ppm eks-3	Unk-Repeat			0.420	
16	80 ppm eks-Av	Average		*****	0.420	Avg of preceding 3 Samples
17	100 ppm eks	Unk-Repeat			0.336	
18	100 ppm eks-2	Unk-Repeat			0.335	

Sample Table Report

29-03-18 04:25:55 PM

File Name: C:\Program Files\Shimadzu\UVProbe\Data\daus\lekstrak.pho



Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL517.0	Comments
19	100 ppm eks-3	Unk-Repeat			0.335	
20	100 ppm eks-	Average		*****	0.336	Avg of preceding 3 Samples
21						

Lampiran 14. Perhitungan IC₅₀ ekstrak etanol daun gedi merah

konsentrasi	Absorbansi	% Inhibisi	IC ₅₀ (ppm)
20	0,492	18.5430	
40	0,480	20.5298	
60	0,466	22.8477	133,05
80	0,420	30.4636	
100	0,335	44.5364	

Konsentrasi 20 ppm

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Inhibisi} &= \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbasi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,604 - 0,492}{0,604} \times 100\% \\
 &= 18.5430
 \end{aligned}$$

Konsentrasi 40 ppm

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Inhibisi} &= \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbasi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,604 - 0,480}{0,604} \times 100\% \\
 &= 20,5298
 \end{aligned}$$

Konsentrasi 60 ppm

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Inhibisi} &= \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbasi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,604 - 0,466}{0,604} \times 100\% \\
 &= 22.8477
 \end{aligned}$$

Konsentrasi 80 ppm

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Inhibisi} &= \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbasi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,604 - 0,420}{0,604} \times 100\% \\
 &= 30.4636
 \end{aligned}$$

Konsentrasi 100 ppm

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Inhibisi} &= \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbasi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,604 - 0,335}{0,604} \times 100\% \\
 &= 44,5364
 \end{aligned}$$

Pencarian nilai IC_{50}

$$a = 8,8079$$

$$b = 0,3096$$

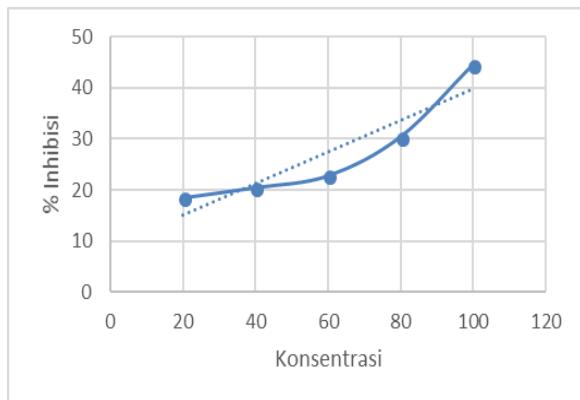
$$r = 0,9237$$

$$y = a + bx$$

$$50 = 8,8079 + 0,3096$$

$$x = (50 - (8,8079)) / 0,3096$$

$$x = 133,05 \text{ ppm}$$



Lampiran 15. Kuersetin

Penimbangan kuersetin

$$50 \text{ ppm} = 5 \text{ mg}/100\text{ml} = \frac{5 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

Pembuatan larutan induk kuersetin

Kuersetin yang telah ditimbang menggunakan neraca elektrik sebanyak 5 mg, dilarutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas dalam labu takar 50 ml.

Pembuatan seri konsentrasi

Larutan induk kuersetin 50 ppm dibuat seri konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm.

Konsentrasi (ppm)	Pengenceran (ml)	Volume yang dibuat (ml)
2	2	50
4	4	50
6	6	50
8	8	50
10	10	50

Contoh perhitungan pembuatan konsentrasi 20 ppm

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$50 \text{ ppm} \times V_1 = 2 \text{ ppm} \times 50 \text{ ml}$$

$$V_1 = 1 \text{ ml}$$

Larutan induk kuersetin 50 ppm dipipet sebanyak 2 ml, 4 ml, 6 ml, 8 ml, dan 10 ml kemudian masing-masing dilarutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas dalam labu takar 50 ml.

Lampiran 16. Penetapan *operating time* kuersetin**Kinetics Data Print Report**

29/03/2018 02:35:58 PM

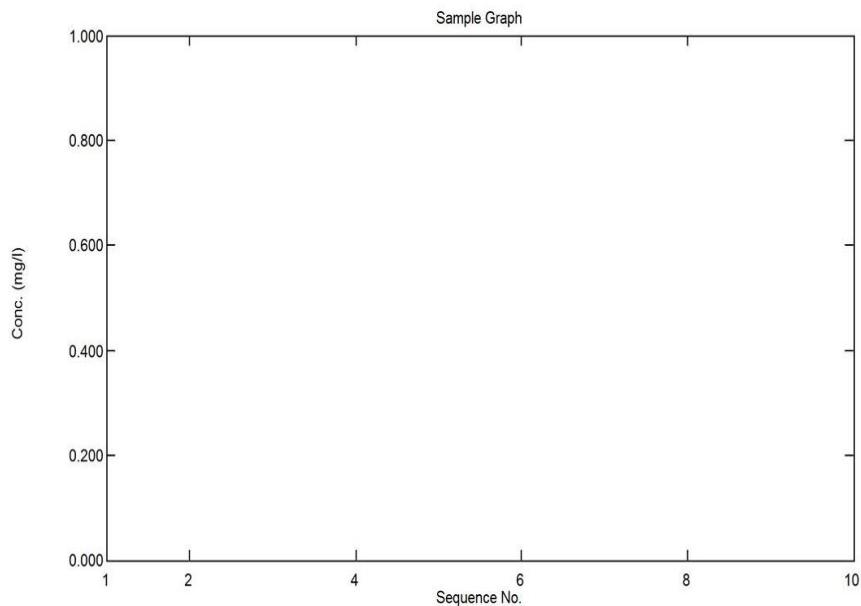
Time (Minutes)	RawData ...
1.000	0.099
2.000	0.098
3.000	0.098
4.000	0.097
5.000	0.095
6.000	0.096
7.000	0.095
8.000	0.095
9.000	0.095
10.000	0.094
11.000	0.094
12.000	0.094
13.000	0.093
14.000	0.093
15.000	0.093
16.000	0.092
17.000	0.092
18.000	0.092
19.000	0.091
20.000	0.091
21.000	0.090
22.000	0.090
23.000	0.090
24.000	0.098
25.000	0.098
26.000	0.098
27.000	0.098
28.000	0.098
29.000	0.098
30.000	0.098

Lampiran 17. Data kuersetin

Sample Table Report

29-03-18 04:35:46 PM

File Name: C:\Program Files\Shimadzu\UVProbe\Data\daus\File_180329_162802.pho



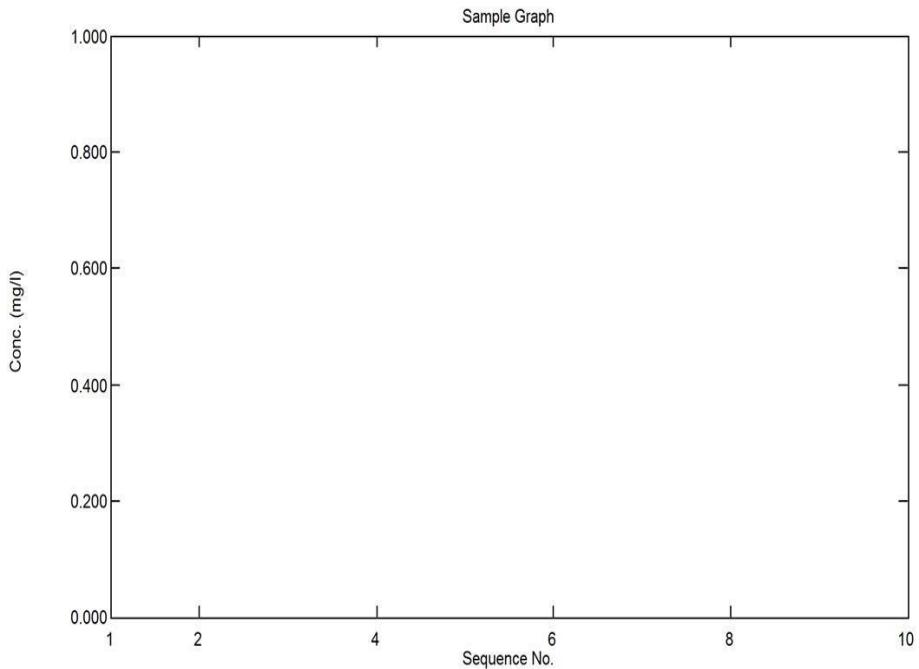
Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL517.0	Comments
1	20ppm Q	Unk-Repeat			0.459	
2	20ppm Q-2	Unk-Repeat			0.458	
3	20ppm Q-3	Unk-Repeat			0.458	
4	20ppm Q-Avg	Average		*****	0.458	Avg of preceding 3 Samples
5	40ppm Q	Unk-Repeat			0.367	
6	40ppm Q-2	Unk-Repeat			0.366	
7	40ppm Q-3	Unk-Repeat			0.366	
8	40ppm Q-Avg	Average		*****	0.366	Avg of preceding 3 Samples
9	60ppm Q	Unk-Repeat			0.286	
10	60ppm Q-2	Unk-Repeat			0.286	
11	60ppm Q-3	Unk-Repeat			0.285	
12	60ppm Q-Avg	Average		*****	0.286	Avg of preceding 3 Samples
13	80ppm Q	Unk-Repeat			0.218	
14	80ppm Q-2	Unk-Repeat			0.218	
15	80ppm Q-3	Unk-Repeat			0.218	
16	80ppm Q-Avg	Average		*****	0.218	Avg of preceding 3 Samples
17	100ppm Q	Unk-Repeat			0.202	
18	100ppm Q-2	Unk-Repeat			0.202	

Sample Table Report

29-03-18 04:35:46 PM

File Name: C:\Program Files\Shimadzu\UVProbe\Data\daus\File_180329_162802.pho



Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL517.0	Comments
19	100ppm Q-3	Unk-Repeat			0.202	
20	100ppm Q-Av	Average		*****	0.202	Avg of preceding 3 Samples
21						

Lampiran 18. Perhitungan IC₅₀ kuersetin

konsentrasi	Absorbansi	% Inhibisi	IC ₅₀ (ppm)
2	0,458	24,1722	
4	0,366	39,4040	
6	0,286	52,6490	6,121
8	0,218	63,9072	
10	0,202	66,5563	

Konsentrasi 2 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbasi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,604 - 0,4580}{0,604} \times 100\%$$

$$= 24,1722$$

Konsentrasi 4 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbasi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,604 - 0,366}{0,604} \times 100\%$$

$$= 39,4040$$

Konsentrasi 60 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbasi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,604 - 0,286}{0,604} \times 100\%$$

$$= 52,6490$$

Konsentrasi 80 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbasi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,604 - 0,218}{0,604} \times 100\%$$

$$= 66,5563$$

Konsentrasi 100 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbasi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

$$\frac{0,604 - 0,218}{0,604} \times 100\%$$

$$= 44,5364$$

Pencarian nilai IC_{50}

$$a = 16,5563$$

$$b = 5,4636$$

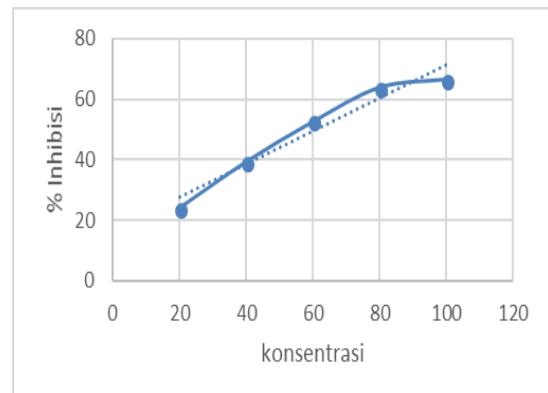
$$r = 0,9767$$

$$y = a + bx$$

$$50 = 16,5563 + 0,5463$$

$$x = (50 - 16,5563) / 5,4636$$

$$x = 6,121 \text{ ppm}$$



Lampiran 19. Hasil uji statistik *Independent sampels t-test* rata-rata nilai IC₅₀ kuersetin dan ekstrak

Descriptive Statistics					
	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
IC50_quersetin	3	61.2333	.09074	61.15	61.33
IC50_ekstrak	3	133.2233	.30022	133.05	133.57

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		IC50_quersetin	IC50_ekstrak
N		3	3
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	61.2333	133.2233
	Std. Deviation	.09074	.30022
Most Extreme Differences	Absolute	.225	.385
	Positive	.225	.385
	Negative	-.190	-.282
Kolmogorov-Smirnov Z		.390	.667
Asymp. Sig. (2-tailed)		.998	.766

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Dari data uji *One-Sample Kolmogorov-Smirnov* diperoleh IC₅₀ kuersetin dengan signifikansi = 0,998 > 0,05 (H₀ diterima) dan IC₅₀ ekstrak dengan signifikansi = 0,766 > 0,05. Disimpulkan data tersebut terdistribusi normal sehingga dapat dilakukan analisis *Independent sampels t-test*.

Group Statistics					
Kelompok		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
IC50	IC50_uersetin	3	61.2333	.09074	.05239
	IC50_ekstrak	3	133.2233	.30022	.17333

Independent Samples Test									
	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
								95% Confidence Interval of the Difference	
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
IC50	6.934	.058	-397.566	4	.000	-71.99000	.18108	-72.49275	-71.48725
Equal variances assumed									
Equal variances not assumed			-397.566	2.362	.000	-71.99000	.18108	-72.06508	-71.31492

Hasil *Lavene's Test for Equality of Variances* menunjukkan signifikansi = 0,058 > 0,05 yang berarti kedua varians adalah sama.

Hasil *t-test Equality of Means* menunjukkan signifikansi = 0,000 < 0,05 yang berarti rata-rata nilai IC₅₀ kuersetin dan ekstrak adalah berbeda secara signifikan.

Lampiran 20. Foto alat, bahan dan hasil uji aktivitas antioksidan secara *in vitro*



DPPH



Larutan DPPH 80 ppm



Kuersetin



Larutan kuersetin 50 ppm



Seri konsentrasi
kuersetin



Larutan ekstrak 1000 ppm



Seri konsentrasi ekstrak



Hasil reaksi ekstrak DPPH



Hasil reaksi
kuersetin



Spektrofotometer UV-Vis

Lampiran 21. Perhitungan dosis dan volume pemberian

1. Glibenklamid (5 mg/70 kg BB manusia)

- Setiap tablet glibenklamid mengandung 5 mg
- Konversi dosis manusia (70 Kg) ke dosis untuk hewan uji “tikus” dikali 0,018
- Dosis Glibenklamid untuk tikus (200 g) $= 5\text{mg} \times 0,018$
 $= 0,09\text{mg}/200\text{gram BB tikus}$
 $(0,45 \text{ mg/kg BB tikus})$

- tablet glibenklamid ditimbang diperoleh hasil 0,201 g = 201 mg maka dosis glibenklamid tablet untuk tikus dengan berat badan 200 g adalah:

$$\text{Dosis glibenklamid tablet} = \frac{0,9 \text{ mg}}{5 \text{ mg}} \times 201 \text{ mg}$$

$$= 3,618 \text{ mg} \sim 3,6 \text{ mg}/200 \text{ g BB tikus}$$

- suspensi glibenklamid dibuat dalam konsentrasi 0,18 dengan menimbang 180 mg tablet glibenklamid kemudian disuspensikan dengan CMC Na 0,5 % hingga volume 100 ml sampai homogen.

$$\begin{aligned} \text{glibenklamid} &= 0,18 \text{ g}/100\text{ml} \\ &= 180 \text{ mg}/100\text{ml} \\ &= 1,8 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

Maka volume pemberian untuk tikus dengan berat badan 200 g adalah:

$$\begin{aligned} \text{Volume pemberian} &= \frac{3,6 \text{ mg}}{1,8 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} \\ &= 2 \text{ ml untuk } 200 \text{ g BB tikus} \end{aligned}$$

2. CMC 0,5%

- Syarat volume maksimum larutan sediaan uji yang dapat diberikan pada tikus (200g) secara per oral (p.o.) adalah sebesar 5 ml. Pada penelitian ini digunakan volume pemberian larutan sedian uji untuk tikus secara per oral sebanyak 2 ml, maka perhitungan pembuatan CMC 0,5 %:
- Larutan stock CMC 0,5 %

$$\frac{0,5 \text{ gram}}{100 \text{ ml}} = \frac{500 \text{ mg}}{100 \text{ ml}} = 5 \text{ mg/ml}$$
- Cara pembuatan: Ditimbang 5 mg CMC, kemudian dimasukan kedalam labu takar 100 ml dan dilarutkan dengan aquadest sampai batas tertera.

3. Streptozotocin-Nicotinamid

- STZ 45 mg dilarutkan didalam 100 mmol/L dengan pH 4,5 yang merupakan pH yang stabil untuk STZ.
- NA 110 mg dilarutkan dalam normal saline 0,9% kemudian diberikan secara intraperitoneal 15 menit sebelum pemberian STZ.

4. Dosis ekstrak daun gedi merah 100 mg/kg BB tikus

$$\begin{aligned}
 \text{Faktor konversi ke tikus} &= 56 \\
 \text{Dosis tikus} &= 100 \text{ mg/Kg BB} = 20 \text{ mg/200 gram BB tikus} \\
 \text{Dosis ekstrak ke manusia} &= \text{Dosis tikus} \times \text{faktor konversi tikus ke manusia} \\
 &= (20 \text{ mg/200 gram bb tikus}) \times 56 \\
 &= 1.120 \text{ mg/ 70 g BB manusi} \\
 &= \mathbf{1,1 \text{ gram/70 g BB manusia}}
 \end{aligned}$$

Perhitungan dosis ekstrak berdasarkan berat badan dosis 100 mg

$$\begin{aligned}
 \text{Rumus perhitungan dosis ekstrak} &= \text{BB/1000} \times \text{dosis 100 mg} \\
 \text{contoh} &= 200 \text{ gram/1000} \times 100 \text{ mg} \\
 &= 20 \text{ mg/200 gram BB tikus}
 \end{aligned}$$

5. Dosis ekstrak daun gedi merah 200 mg/Kg BB tikus

$$\begin{aligned}
 \text{Dosis tikus} &= 200 \text{ mg/kg bb} = 40 \text{ mg/200 gram bb tikus} \\
 \text{Dosis ekstrak ke manusia} &= \text{Dosis tikus} \times \text{faktor konversi tikus ke manusia} \\
 &= (40 \text{ mg/200 gram bb tikus}) \times 56 \\
 &= 2240 \text{ mg/ 70 kg bb manusia} \\
 &= \mathbf{2,2 \text{ gram/70 kg bb manusia}}
 \end{aligned}$$

Perhitungan dosis ekstrak berdasarkan berat badan dosis 200 mg

$$\begin{aligned}
 \text{Rumus perhitungan dosis ekstrak} &= \text{bb/1000} \times \text{dosis 200 mg} \\
 \text{contoh} &= 200 \text{ gram/1000} \times 200 \text{ mg} \\
 &= 40 \text{ mg/200 gram bb tikus}
 \end{aligned}$$

6. Dosis ekstrak daun gedi merah 400 mg/Kg BB tikus

$$\begin{aligned}
 \text{Faktor konversi ke tikus} &= 56 \\
 \text{Dosis tikus} &= 400 \text{ mg/kg bb} = 80 \text{ mg/200 gram bb tikus} \\
 \text{Dosis ekstrak ke manusia} &= \text{Dosis tikus} \times \text{faktor konversi tikus ke manusia}
 \end{aligned}$$

$$= (80 \text{ mg}/200 \text{ gram bb tikus}) \times 56$$

$$= 4480 \text{ mg} / 70 \text{ kg bb manusia}$$

$$= \mathbf{4,5 \text{ gram} / 70 \text{ kg bb manusia}}$$

Perhitungan dosis ekstrak berdasarkan berat badan dosis 400 mg

$$\text{Rumus perhitungan dosis ekstrak} \quad = \text{bb}/1000 \times \text{dosis 400 mg}$$

$$\text{contoh} \quad = 200 \text{ gram}/1000 \times 400 \text{ mg}$$

$$= 80 \text{ mg}/200 \text{ gram bb tikus}$$

Lampiran 22. Hasil penimbangan dan hasil rata-rata penimbangan berat badan tikus

Hasil penimbangan berat badan tikus:

Kelompok	No	Berat Badan Tikus (g)				
		Hari ke-0 (T ₀)	Hari ke-5 (T ₁)	Hari ke-12 (T ₂)	Hari ke-19 (T ₃)	Hari ke-26 (T ₄)
Kontrol Normal	1	208	213	222	229	238
	2	214	220	228	235	243
	3	207	211	220	228	237
	4	215	222	229	235	242
	5	213	218	225	234	240
Kontrol Negatif CMC-Na	1	211	207	201	198	192
	2	218	213	208	205	199
	3	221	219	212	209	204
	4	212	209	204	199	195
	5	210	206	199	194	190
Kontrol (+) Glibenklamid	1	210	204	198	202	211
	2	208	207	200	207	210
	3	213	210	205	210	219
	4	221	218	214	221	225
	5	224	220	216	223	228
ekstrak uji daun gedi merah 100 mg/kg BB tikus	1	221	216	212	213	215
	2	214	210	206	209	209
	3	222	219	214	215	219
	4	218	213	209	210	213
	5	213	212	207	207	210
ekstrak uji daun gedi merah 200 mg/kg BB tikus	1	210	208	202	206	210
	2	222	218	212	218	222
	3	223	221	217	222	225
	4	218	213	209	213	218
	5	215	210	204	209	214
ekstrak uji daun gedi merah 400 mg/kg BB tikus	1	216	212	207	213	220
	2	211	208	202	205	213
	3	214	211	208	212	222
	4	220	215	211	215	223
	5	223	220	216	222	226

Rumus perhitungan dosis ekstrak etanol :

$$\text{Dosis pemberian} = \frac{\text{BB}}{1000} \times \text{Dosis ekstrak}$$

Berdasarkan hasil perhitungan menggunakan rumus tersebut maka diperoleh dosis pemberian pada tikus berdasarkan berat badannya seperti yang terlihat pada tabel di atas.

$$\frac{\text{berat badan (gram)}}{200 \text{ gram}} \times 2 \text{ ml} = \text{volume yang diberikan (ml)}$$

Lampiran 23. Hasil pengukuran aktivitas enzim GPx hati tikus

Kelompok	Kode Hewan	Absorban si	Aktivitas GPx (U/mg)	Rata-rata aktivitas GPx
Kontrol normal	K.1	0,094	72,54	
	K.2	0,093	71,77	
	K.3	0,090	69,45	71,92
	K.4	0,097	74,86	
	K.5	0,092	71,00	
Kontrol negatif	DM.1	0,025	19,29	
	DM.2	0,027	20,84	
	DM.3	0,028	21,61	20,06
	DM.4	0,026	20,06	
	DM.5	0,024	18,52	
Kontrol pembanding	Gliben.1	0,085	65,59	
	Gliben.2	0,087	67,14	
	Gliben.3	0,082	63,28	64,67
	Gliben.4	0,086	66,37	
	Gliben.5	0,079	60,96	
Dosis ekstrak I	(100)1	0,035	27,01	
	(100)2	0,038	29,32	
	(100)3	0,034	26,24	28,40
	(100)4	0,040	30,87	
	(100)5	0,037	28,55	
Dosis ekstrak II	(200)1	0,050	38,59	
	(200)2	0,049	37,81	
	(200)3	0,052	40,13	39,82
	(200)4	0,051	9,36	
	(200)5	0,056	43,22	
Dosis ekstrak III	(400)1	0,088	67,91	
	(400)2	0,079	60,96	
	(400)3	0,080	61,74	62,05
	(400)4	0,077	59,42	
	(400)5	0,078	60,19	

Contoh perhitungan :

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar GPx} &= \frac{\text{Absorbansi} \times \text{Vt} \times 2 \times 1000 \times 1/\text{mg protein}}{6,22 \times \text{Vs}} \\
 &= \frac{(0,094 \times 1,2 \times 2 \times 1000 \times 1)}{(6,22 \times 0,2)} \times 10 = 72,54 \text{ U/mg}
 \end{aligned}$$

Keterangan :

- Dosis glibenklamid : 0,45 mg/Kg BB tikus
 Dosis Streptozotocin : 45 mg/Kg BB tikus
 Dosis nikotinamid : 110 mg/Kg BB tikus
 Dosis ekstrak I : 100 mg/Kg BB tikus
 Dosis ekstrak II : 200 mg/Kg BB tikus
 Dosis ekstrak III : 400 mg/Kg BB tikus

Lampiran 24. Hasil statistik

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kelompok normal	.179	5	.200*	.984	5	.954
kelompok negatif	.137	5	.200*	.986	5	.966
kontrol pembanding	.221	5	.200*	.914	5	.492
dosis ekstrak 1	.174	5	.200*	.974	5	.899
dosis ekstrak 2	.241	5	.200*	.904	5	.430
dosis ekstrak 3	.179	5	.200*	.984	5	.954

a. Lilliefors Significance Correction

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

Descriptives

aktifitas_gpx

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kelompok normal	5	71.9240	1.99986	.89436	69.4408	74.4072	69.45	74.86
kelompok negatif	5	20.0640	1.22222	.54659	18.5464	21.5816	18.52	21.61
kelompok pembanding	5	64.6680	2.52653	1.12990	61.5309	67.8051	60.96	67.14
dosis ekstrak 1	5	28.3980	1.84170	.82363	26.1112	30.6848	26.24	30.87
dosis ekstrak 2	5	39.8220	2.08690	.93329	37.2308	42.4132	37.81	43.22
dosis ekstrak 3	5	62.0440	3.39117	1.51658	57.8333	66.2547	59.42	67.91
Total	30	47.8200	19.92943	3.63860	40.3782	55.2618	18.52	74.86

Test of Homogeneity of Variances

aktifitas_gpx

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.753	5	24	.592

ANOVA

aktifitas_gpx

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11393.789	5	2278.758	439.297	.000
Within Groups	124.495	24	5.187		
Total	11518.283	29			

Multiple Comparisons

aktifitas_gpx
Tukey HSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kelompok normal	kelompok negatif	51.86000	1.44046	.000	47.4062	56.3138
	kelompok pembanding	7.25600	1.44046	.000	2.8022	11.7098
	dosis ekstrak 1	43.52600	1.44046	.000	39.0722	47.9798
	dosis ekstrak 2	32.10200	1.44046	.000	27.6482	36.5558
	dosis ekstrak 3	9.88000	1.44046	.000	5.4262	14.3338
kelompok negatif	kelompok normal	-51.86000	1.44046	.000	-56.3138	-47.4062
	kelompok pembanding	-44.60400	1.44046	.000	-49.0578	-40.1502
	dosis ekstrak 1	-8.33400	1.44046	.000	-12.7878	-3.8802
	dosis ekstrak 2	-19.75800	1.44046	.000	-24.2118	-15.3042
	dosis ekstrak 3	-41.98000	1.44046	.000	-46.4338	-37.5262
kelompok pembanding	kelompok normal	-7.25600	1.44046	.000	-11.7098	-2.8022
	kelompok negatif	44.60400	1.44046	.000	40.1502	49.0578
	dosis ekstrak 1	36.27000	1.44046	.000	31.8162	40.7238
	dosis ekstrak 2	24.84600	1.44046	.000	20.3922	29.2998
	dosis ekstrak 3	2.62400	1.44046	.471	-1.8298	7.0778
dosis ekstrak 1	kelompok normal	-43.52600	1.44046	.000	-47.9798	-39.0722
	kelompok negatif	8.33400	1.44046	.000	3.8802	12.7878
	kelompok pembanding	-36.27000	1.44046	.000	-40.7238	-31.8162
	dosis ekstrak 2	-11.42400	1.44046	.000	-15.8778	-6.9702
	dosis ekstrak 3	-33.64600	1.44046	.000	-38.0998	-29.1922
dosis ekstrak 2	kelompok normal	-32.10200	1.44046	.000	-36.5558	-27.6482
	kelompok negatif	19.75800	1.44046	.000	15.3042	24.2118
	kelompok pembanding	-24.84600	1.44046	.000	-29.2998	-20.3922
	dosis ekstrak 1	11.42400	1.44046	.000	6.9702	15.8778
	dosis ekstrak 3	-22.22200	1.44046	.000	-26.6758	-17.7682
dosis ekstrak 3	kelompok normal	-9.88000	1.44046	.000	-14.3338	-5.4262
	kelompok negatif	41.98000	1.44046	.000	37.5262	46.4338
	kelompok pembanding	-2.62400	1.44046	.471	-7.0778	1.8298
	dosis ekstrak 1	33.64600	1.44046	.000	29.1922	38.0998
	dosis ekstrak 2	22.22200	1.44046	.000	17.7682	26.6758

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

Lampiran 25. Foto tanaman gedi merah**Foto Tanaman Daun Gedi merah****Foto tanaman daun gedi merah kering****Foto serbuk daun gedi merah****Foto esktrak daun gedi merah**

Lampiran 26. Foto hewan percobaan, proses pembedahan, ginjal tikus**Foto kandang tikus****Foto tikus percobaan****Foto organ dalam formalin****Foto pembedahan tikus**