

**AKTIVITAS ANTIDIABETES KOMBINASI EKSTRAK ETANOL DAUN
Piper crocatum DAN EKSTRAK ETANOL BUAH *Phaleria macrocarpa*
PADA TIKUS DIINDUKSI STREPTOZOTOSIN-NIKOTINAMID
TERHADAP EKSPRESI GLUKOSA TRANSPORTER-2**

TESIS

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
derajat Sarjana Strata-2
Program Pascasarjana Ilmu Farmasi
Minat Sains Farmasi*



Oleh :

Teodhora
SBF071410092

**PROGRAM PASCASARJANA ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2016**

AKTIVITAS ANTIDIABETES KOMBINASI EKSTRAK ETANOL DAUN
Piper crocatum DAN EKSTRAK ETANOL BUAH *Phaleria macrocarpa*
PADA TIKUS DIINDUKSI STREPTOZOTO SIN-NIKOTINAMID
TERHADAP EKSPRESI GLUKOSA TRANSPORTER-2

TESIS

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
derajat Sarjana Strata-2
Program Pascasarjana Ilmu Farmasi
Minat Sains Farmasi*



Oleh :

Teodhoru
SBF071410092

PROGRAM PASCASARJANA ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2016

HALAMAN PENGESAHAN
PENGESAHAN TESIS

Berjudul
**AKTIVITAS ANTIDIABETES KOMBINASI EKSTRAK ETANOL DAUN
Piper crocatum DAN EKSTRAK ETANOL BUAH *Phaleria macrocarpa*
PADA TIKUS DIINDUKSI STREPTOZOTOSIN-NIKOTINAMID
TERHADAP EKSPRESI GLUKOSA TRANSPORTER-2**

Oleh:
Teodhora
SBF071410092

Dipertahankan di hadapan Dewan Penguji Tesis
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada Tanggal: 23 Januari 2016

Mengetahui,
Program Pascasarjana
Universitas Setia Budi
Dekan,



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

Pembimbing Utama,

Prof. Agung Endro Nugroho., M.Si., Ph.D., Apt

Pembimbing Pendamping,

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

Penguji:

1. Dr. Arief Nurrochmad, M.Si., Apt
2. Prof. Dr. Edlatti Sasmito, SE., Apt
3. Dr. Gunawan Pamudji Widodo, M.Si., Apt
4. Prof. Agung Endro Nugroho., M.Si., Ph.D., Apt

1.

2.

3.

4.

DAFTAR ISI

Halaman	
HALAMAN JUDUL.....	i
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	4
C. Tujuan Penelitian.....	4
D. Kegunaan Penelitian.....	4
E. Keaslian Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
A. Tanaman Sirih Merah.....	7
1. Sistematika Tanaman.....	7
2. Nama Daerah.....	7
3. Kandungan Kimia.....	7
4. Morfologi.....	8
5. Khasiat.....	9
6. Keamanan.....	9
B. Tanaman Mahkota Dewa.....	10
1. Sistematika Tanaman.....	10
2. Nama Daerah.....	10
3. Kandungan Kimia.....	10
4. Morfologi.....	11
5. Khasiat.....	12
6. Keamanan.....	12
C. Diabetes Mellitus.....	13
1. Definisi Diabetes Mellitus.....	13
2. Klasifikasi Diabetes Mellitus.....	13
2.1 Diabetes Mellitus Tipe 1.....	14
2.2 Diabetes Mellitus Tipe 2.....	14
2.3 Diabetes Mellitus Gestasional.....	15
2.4 Diabetes Mellitus Tipe lain.....	15
3. Patofisiologi Diabetes Mellitus.....	16
3.1 Diabetes Mellitus Tipe 1.....	16
3.2 Diabetes Mellitus Tipe 2.....	17
4. Komplikasi Diabetes Mellitus.....	17
4.1 Komplikasi Akut.....	17

4.2	Komplikasi Kronis	18
5.	Terapi Diabetes Mellitus	18
5.1	Pemicu Sekresi Insulin	18
5.2	Penambah Sensitivitas Insulin	19
5.3	Penghambat Glukoneogenesis	19
5.4	Penghambat Glukosidase Alfa	20
D.	Pankreas	20
1.	Definisi Pankreas	20
1.1	Sekresi Insulin	21
1.2	Sekresi Glukagon	23
1.3	Sekresi Somatostatin	24
1.4	Pankreas Polipeptida	24
E.	Glukosa	25
1.	Definisi Glukosa	25
2.	Metabolisme Glukosa	25
3.	Glukosa Transporter	26
F.	Metode Uji Aktivitas Antidiabetes	30
1.	Induksi Streptozotosin-Nikotinamid	30
2.	Metode Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah	33
3.1	Metode Folin	33
3.2	Metode Samogyi-Nelson	33
3.3	Metode Ortho – tholuidin	33
3.4	Metode Glukosa oksidase/peroksidase	33
G.	Imunohistokimia	35
1.	Definisi Imunohistokimia	35
2.	Pewarnaan Berdasar Konsep Immunologi	35
2.1	Pewarnaan imunoperoksidase	36
2.2	Avidin Biotin Peroxidase Complex (ABC)	36
H.	Tikus Putih	37
I.	Ekstrak, Simplisia, dan Ekstraksi	38
1.	Definisi	38
2.	Metode Ekstraksi	40
2.1	Ekstraksi Dingin	40
2.2	Ekstraksi Panas	40
2.3	Pelarut	41
J.	Landasan Teori	42
K.	Hipotesis	42
BAB III METODE PENELITIAN		45
A.	Populasi dan Sampel	45
B.	Variabel Penelitian	45
1.	Identifikasi variabel utama	45
2.	Klasifikasi operasional variabel utama	46

	3. Definisi operasional variabel utama.....	46
C.	Alat dan Bahan.....	47
	1. Alat.....	47
	2. Bahan.....	48
	3. Hewan Percobaan.....	48
D.	Jalannya Penelitian.....	48
	1. Identifikasi Tanaman.....	48
	2. Pembuatan Serbuk.....	49
	3. Pembuatan Ekstrak.....	49
	4. Pengujian KLT.....	50
	4.1 Identifikasi Flavonoid.....	50
	4.2 Identifikasi Saponin.....	51
	4.3 Identifikasi Alkaloid.....	51
	4.4 Identifikasi Tanin.....	51
	5. Penetapan Kadar Total Flavonoid.....	51
	6. Pembuatan Larutan Streptozotosin-Nikotinamid.....	52
	7. Pembuatan Suspensi Na-CMC.....	52
	8. Penentuan Dosis Pembanding.....	52
	9. Pengujian Efek Antidiabetes.....	52
	10. Analisa Kadar Gukosa Darah Tikus.....	54
	11. Preparasi dan Pewarnaan.....	55
	12. Analisis Data.....	55
BAB IV	HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	61
	1. Identifikasi Daun Sirih Merah dan Buah Mahkota Dewa.....	61
	2. Pengambilan Bahan.....	61
	3. Hasil Pembuatan Serbuk.....	62
	4. Hasil Pembuatan Ekstrak Etanol.....	62
	5. Hasil Identifikasi Kandungan Kimia.....	63
	5.1 Profil kromatografi lapis tipis buah mahkota dewa.....	64
	5.2 Profil kromatografi lapis tipis daun sirih merah.....	66
	5.3 Identifikasi penetapan kadar flavonoid total.....	69
	6. Pengujian Tikus DM Tipe II Induksi STZ-NA.....	72
	6.1 Hasil peningkatan kadar glukosa darah tikus setelah induksi.....	72
	6.2 Hasil penurunan kadar glukosa darah tikus.....	74
	6.3 Hasil pengamatan imunohistokimia.....	80
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN.....	88
	A. Kesimpulan.....	88
	B. Saran.....	88
BAB IV	RINGKASAN.....	89
	DAFTAR PUSTAKA.....	92
	LAMPIRAN.....	100

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 1. Tanaman sirih merah	8
Gambar 2. Buah mahkota dewa	10
Gambar 3. Susunan sel dalam pulau Langerhans.....	20
Gambar 4. Sekresi insulin oleh rangsangan glukosa	22
Gambar 5. Jalur utama metabolisme karbohidrat	25
Gambar 6. Struktur kimia streptozotosin	29
Gambar 7. Skema ekstraksi daun sirih merah	55
Gambar 8. Skema ekstraksi daging buah mahkota dewa	56
Gambar 9. Skema induksi dan pemberian sediaan.....	57
Gambar 10. Skema proses preparasi jaringan	58
Gambar 11. Skema proses imunohistokimia.....	60
Gambar 12. Profil kromatografi lapis tipis identifikasi alkaloid.....	64
Gambar 13. Profil kromatografi lapis tipis identifikasi flavonoid	65
Gambar 14. Profil kromatografi lapis tipis identifikasi saponin	66
Gambar 15. Profil kromatografi lapis tipis identifikasi tanin	66
Gambar 16. Profil kromatografi lapis tipis identifikasi alkaloid.....	67
Gambar 17. Profil kromatografi lapis tipis identifikasi flavonoid	68
Gambar 18. Profil kromatografi lapis tipis identifikasi saponin	68
Gambar 19. Profil kromatografi lapis tipis identifikasi tanin	69
Gambar 20. Kurva kalibrasi larutan standar kuarsetin.....	70
Gambar 21. Profil peningkatan glukosa darah setelah induksi STZ-NA.....	73
Gambar 22. Profil penurunan kadar glukosa darah.....	75
Gambar 23. Luas AUCtotal kelompok perlakuan.....	78
Gambar 24. Hasil pewarnaan dengan teknik imunohistokimia	80
Gambar 25. Hasil persentase berdasarkan rata-rata densitas	83

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 1. Karakteristik struktur dan fungsional anggota individual GLUT	28
Tabel 2. Konsentrasi dosis pada tikus induksi STZ-NA	31
Tabel 3. Pengelompokkan Hewan Percobaan	51
Tabel 4. Hasil penetapan susut pengeringan	62
Tabel 5. Hasil rendemen ekstrak	63
Tabel 6. Hasil pengukuran absorbansi standar	70
Tabel 7 Hasil kadar flavonoid total	71
Tabel 8. Persentase penurunan kadar glukosa darah pada tikus	75
Tabel 9. Luas AUC rata-rata kadar glukosa darah tikus	78
Tabel 10. Persentase jumlah GLUT2	82

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Surat keterangan hasil identifikasi.....	100
Lampiran 2. Surat keterangan penelitian dari PAU	
Lampiran 3. Surat keterangan penelitian dari fakultas kedokteran hewan	
Lampiran 4. Surat keterangan <i>Ethical Clirens</i>	
Lampiran 5. Tikus putih, prosedur preparasi dan pewarnaan	
Lampiran 6. Perhitungan penetapan susut pengeringan menggunakan <i>moisture balance</i>	
Lampiran 7. Perhitungan rendemen ekstrak daun sirih merah dan buah mahkota dewa	
Lampiran 8. Identifikasi senyawa ekstrak etanol buah mahkota dewa	
Lampiran 9. Identifikasi senyawa ekstrak etanol ekstrak etanol daun sirih merah	
Lampiran 10. Perhitungan penetapan kadar flavonoid	
Lampiran 11. Perhitungan dosis pemberian berdasarkan berat badan	
Lampiran 12. Data hasil pengukuran kadar glukosa darah	
Lampiran 13. Prosedur preparasi dan pewarnaan organ pankreas dan hati tikus	
Lampiran 14. Hasil pewarnaan secara HE dan <i>Immunohistochemistry</i> (IHC)	
Lampiran 15. Hasil perhitungan jumlah ekspresi protein GLUT2	
Lampiran 16. Analisis Statistik.....	

INTISARI

TEODHORA, 2015. AKTIVITAS ANTIDIABETES KOMBINASI EKSTRAK ETANOL DAUN *Piper crocatum* DAN EKSTRAK ETANOL BUAH *Phaleria macrocarpa* PADA TIKUS DIINDUKSI STREPTOZOTOSIN-NIKOTINAMID TERHADAP EKSPRESI GLUKOSA TRANSPORTER-2, TESIS, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Sirih merah (*Piper crocatum*) dan mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) merupakan tanaman yang dapat digunakan untuk mengatasi penyakit diabetes mellitus tipe II. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antidiabetes kombinasi ekstrak etanol daun sirih merah dan ekstrak etanol buah mahkota dewa serta mengetahui aktivitas peningkatan ekspresi GLUT-2 di sel β pankreas dan dan penurunan ekspresi GLUT2 di jaringan hati tikus yang diinduksi streptozotosin-nikotinamid.

Penelitian dilakukan menggunakan hewan uji tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang digunakan dibagi menjadi 5 kelompok uji. Kelompok 1: kontrol normal; kelompok 2: kontrol negatif (Na-CMC); kelompok 3: kontrol positif (glibenklamid 5 mg/kg BB); kelompok 4 dan 5 adalah kelompok kombinasi : ekstrak etanol kelompok dosis 50:100 dan 100:200 mg/kg BB. Hewan uji dibuat diabetes mellitus dengan induksi streptozotosin 50 mg/kg BB dan nikotinamid 110 mg/kg BB secara intraperitoneal. Penetapan kada glukosa puasa menggunakan reagen kit. Pengamatan ekspresi GLUT-2 pada sel β pankreas dan jaringan hati menggunakan teknik imunohistokimia. Aktivitas antidiabetes menggunakan 3 parameter, yaitu: (1) pengujian kadar glukosa darah puasa, (2) pengamatan ekspresi protein GLUT-2 pada sel β pankreas (3) pengamatan ekspresi protein GLUT-2 di jaringan hati.

Hasil menunjukkan bahwa ekstrak sirih merah dosis 50 mg/kg BB dan ekstrak mahkota dewa 100 mg/kg BB (kombinasi I) dalam waktu 14 hari telah memberikan persentase daya hipoglikemik sebesar 24,32 \pm 2,07 dan dengan dosis tersebut telah menunjukkan aktivitas peningkatan ekspresi protein GLUT-2 di sel β pankreas sebesar 43,16 % dan penurunan ekspresi GLUT2 di jaringan hati sebesar 71,07 % terhadap tikus yang dikondisikan DM tipe II akibat induksi streptozotosin-nikotinamid.

Kata kunci : Piper crocatum, Phaleria macrocarpa, streptozotosin, nikotinamid, ekspresi protein GLUT2

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Diabetes mellitus (DM) merupakan salah satu kondisi penyakit yang terjadi pada berbagai jenis usia dan diketahui dapat menyebabkan komplikasi yang serius. Pada tahun 1985 sekitar 30 juta orang diseluruh bagian dunia diprediksi mengalami diabetes dan tahun 2000 meningkat menjadi lebih dari 150 juta. Indonesia berada di peringkat ke empat tertinggi di dunia setelah India, Cina, dan Amerika Serikat, dan diperkirakan pada tahun 2025 meningkat menjadi 380 juta. *American Diabetes Association* (ADA) mengklasifikasikan DM ke dalam empat kelas yaitu, DM tipe 1 ditandai dengan terjadinya kerusakan pada sel β pankreas yang mutlak menyebabkan kekurangan zat insulin atau defisiensi insulin, DM tipe 2 ditandai dengan terjadinya kerusakan pada sekresi insulin sehingga menyebabkan resistensi insulin, DM gestasional dan DM karena penyebab lain (Dean, 2008; Cefalu, 2015).

Keluhan yang dirasakan pada penderita diabetes mudah diketahui dengan keluhan khas yaitu poliuria, polidipsia, polifagia dan beberapa keluhan umum lainnya. Pemeriksaan perlu dilakukan meliputi kadar glukosa plasma sewaktu (≥ 200 mg/dl atau 11,1 mmol/L), kadar glukosa plasma puasa (≥ 126 mg/dl atau 7 mmol/L), dan kadar glukosa plasma 2 jam pada TTGO menggunakan beban glukosa setara dengan 75 g glukosa anhidrat dilarutkan dalam air (≥ 200 mg/dl) (Amin, 2011).

GLUT-2 merupakan GLUT afinitas rendah yang ditemukan di usus, hati, ginjal, dan sel β pankreas. Sel β pankreas memiliki jumlah GLUT-2 lebih banyak dibandingkan sel-sel tubuh lainnya. GLUT-2 di pankreas berfungsi menangkap sinyal apabila terjadi peningkatan kadar glukosa dalam tubuh, sehingga memicu sel β pankreas dapat menghasilkan insulin. Streptozotisin (STZ) adalah senyawa glukosamin yang memiliki efek toksik karena kerjanya selektif di sel β pankreas dan berperan dalam menginduksi diabetes melalui peran GLUT-2, sehingga tubuh akan mengalami metabolisme yang akan menghasilkan nitrit oksida. Namun, kehadiran nikotinamid (NA) dapat meringankan toksisitas STZ dan dapat mencegah penipisan di sel β pankreas (Szkudelski, 2001; Tahara, 2007).

Terapi DM terdiri dari terapi nonfarmakologi dan farmakologi. Apabila dengan terapi nonfarmakologi belum mampu mencapai sasaran terapi maka perlu dilanjutkan dengan terapi farmakologi yang terdiri dari obat antidiabetes oral dan bentuk injeksi. Penderita diabetes selama hidupnya perlu mengkonsumsi obat-obatan diabetik, namun pengobatan secara terus-menerus akan menimbulkan rasa tidak nyaman pada penderita, selain itu biaya yang dibutuhkan cukup tinggi karena biaya tersebut akan semakin bertambah secara terus-menerus dalam jangka waktu yang tidak terbatas. Oleh karena itu, diperlukan alternatif pengobatan dari bahan alam yang lebih mudah didapatkan oleh masyarakat dan dianggap lebih aman sehingga diharapkan dapat mengurangi ketidaknyamanan serta meminimalkan biaya pengobatan. Di masyarakat dikenal banyak tumbuhan yang berkhasiat sebagai obat tradisional untuk mengobati DM, di antaranya adalah daun sirih merah dan buah mahkota dewa.

Ekstrak daun sirih merah dosis 50 mg/kg BB dan 100 mg/kg BB menunjukkan penambahan berat badan pada tikus yang diinduksi aloksan karena dianggap telah mampu menekan peningkatan kadar glukosa darah dengan cara mengaktifkan sel β pankreas untuk memproduksi insulin. Hal ini disebabkan jumlah flavonoid memiliki efek yang sebanding dengan glibenklamid pada dosis 1 ml/kg BB. Kombinasi ekstrak etanol daun mimba 100 mg/kg BB dan daun sirih merah 105 mg/kg BB memberikan efek sinergis dibandingkan dengan ekstrak tunggal (Dewi *et al.*, 2014; Dharmayudha *et al.*, 2014; Kunju, 2012).

Ekstrak etanol buah mahkota dewa dosis 110 mg/kg BB sudah dapat menurunkan kadar gula darah sebanding dengan gliklazid 1,4 mg/kg BB. Ekstrak buah mahkota dewa dosis 125 mg cenderung menurunkan kadar glukosa darah pada sukarelawan sehat dan dosis 62,5 mg memberikan efek antioksidan terbesar (Handayani, 2009; Widowati, 2003).

Berdasarkan penelitian sebelumnya, hal ini dapat menjadi acuan karena diketahui kedua tanaman tersebut memiliki kandungan kimia di dalamnya yang berpotensi sebagai antidiabetes. Penggunaan kedua tanaman tersebut sebagai antidiabetes, telah menjadi pertimbangan lebih lanjut untuk mencoba menjadikan kedua tanaman tersebut sebagai kombinasi herbal yang diharapkan dapat meningkatkan efek antidiabetes. Pada penelitian ini digunakan tikus putih yang diinduksi STZ-NA secara intraperitoneal. Adapun dua parameter yang akan dilakukan pengujian yaitu penurunan glukosa darah dan jumlah GLUT-2 di sel β pankreas dan di jaringan hati dengan menggunakan antibodi antiGLUT-2.

B. Rumusan Masalah

1. Apakah kombinasi ekstrak etanol daun sirih merah dan ekstrak etanol buah mahkota dewa mempunyai aktivitas antidiabetes pada tikus diinduksi streptozotosin-nikotinamid.
2. Apakah kombinasi ekstrak etanol daun sirih merah dan ekstrak etanol buah mahkota dewa mempunyai aktivitas meningkatkan dan menurunkan jumlah GLUT-2 di sel β pankreas dan di jaringan hati pada tikus yang diinduksi streptozotosin-nikotinamid.

C. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui aktivitas antidiabetes dari kombinasi ekstrak etanol daun sirih merah dan ekstrak etanol buah mahkota dewa pada tikus yang diinduksi streptozotosin-nikotinamid.
2. Mengetahui aktivitas peningkatan dan penurunan jumlah GLUT-2 di sel β pankreas dan di jaringan hati dari kombinasi ekstrak etanol daun sirih merah dan ekstrak etanol buah mahkota dewa pada tikus yang diinduksi streptozotosin-nikotinamid.

D. Kegunaan Penelitian

Secara medis telah banyak Obat Antidiabetes Oral yang beredar di pasaran. Namun pemakaian jangka panjang menimbulkan efek samping yang tidak dapat diabaikan begitu saja dan biaya yang dihabiskan semakin bertambah. Obat tradisional berasal dari bahan alam semakin berkembang dan banyak digunakan

oleh masyarakat luas. Penelitian ini diharapkan dapat mendukung pemanfaatan alternatif dari bahan alam yang efektif serta aman saat digunakan dan dapat memberikan kontribusi pada dunia kesehatan tentang pemanfaatan tanaman tradisional sebagai terapi penunjang dalam menurunkan glukosa darah serta diharapkan dapat menjadi sumbangan yang berarti dalam ilmu pengetahuan dan dunia farmasi mengenai upaya pengembangan obat tradisional.

E. Keaslian Penelitian

Penelitian mengenai aktivitas antidiabetes kombinasi ekstrak etanol daun sirih merah dan ekstrak buah mahkota dewa pada tikus diinduksi streptozotocin-nikotinamid ini belum pernah dilakukan oleh peneliti lain. Namun peneliti menemukan beberapa penelitian yang membuktikan khasiat dan mendukung penelitian ini yaitu sebagai berikut :

Ekstrak etanol 30% daun sirih merah dengan konsentrasi 200.000 ppm berpotensi sebagai aktivator enzim glukosa oksidase. Infusa daun sirih merah secara topikal dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 40% memiliki efek penyembuhan luka pada tikus yang dibuat diabetes. Konsentrasi infusa daun sirih merah 40% memiliki pengaruh lebih baik terhadap peningkatan persentase penyembuhan. Rebusan sirih merah dosis 20 g/kg BB memiliki aktivitas antihyperglikemia seperti halnya dengan obat oral antidiabetes pembanding (Daonil®), dan lebih memperlihatkan adanya perbaikan kelenjar eksokrin pankreas, sedangkan perbaikan kelenjar endokrin pankreas lebih baik pada rebusan daun sirih merah dosis 0,322 g/kg BB (100 x dosis daonil). Ekstrak etanol daun sirih merah mampu menurunkan kadar gula darah dan

dapat memperbaiki risiko simptom kehilangan bobot badan, bahkan pada dosis 200 mg/kg BB dapat meningkatkan lebih besar dibanding normal/base line dan dapat mencegah kerusakan oksidatif pulau langerhans pankreas yang diakibatkan agen penginduksi diabetes aloksan (Agustanti, 2008; Mun'im *et al.*, 2010; Salim, 2006; Permata, 2006).

Ekstrak alkaloid buah mahkota dewa memiliki aktivitas inhibisi terbesar terhadap α -glukosidase sebesar 36.80%. Hasil fraksinasi dengan kromatografi kolom menghasilkan lima fraksi dengan fraksi teraktif fraksi ke-5 yang memiliki aktivitas inhibisi terhadap α -glukosidase sebesar 87.29%. Ekstrak etanol buah mahkota dewa bersumber dari KSH dengan konsentrasi 4.5 mg/ml menunjukkan efek insulinotropik tertinggi, dengan sel BRIN-BD11 dapat mensekresi insulin 0.506 $\mu\text{g}/1/3 \times 10^5$ sel atau sekitar 100% dibandingkan dengan kontrol negatif. Efek insulinotropik fase cepat pada KRB-3 menunjukkan peningkatan sekresi insulin seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak. Ekstrak metanol buah mahkota dewa dan akar bosa dengan konsentrasi masing-masing 1% b/v dapat menghambat aktivitas α -glukosidase sebesar 40.95 dan 99.34% (Samson, 2010; Arfianti, 2008; Rohimah, 2008).

Sampai saat ini penelitian tentang antidiabetes yang dihubungkan dengan penurunan kadar glukosa darah sudah banyak dilakukan. Perbedaan pada penelitian ini dengan penelitian-penelitian lain adalah dilakukan pengamatan jumlah GLUT-2 di sel β pankreas dan jaringan hati tikus yang diinduksi streptozotoin-nikotinamid.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav)

1. Sistematika Tanaman

Berdasarkan taksonomi tumbuhan, sirih merah diklasifikasikan sebagai berikut : (Tjitrosoepomo, 2005).

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Piperales
Genus	: Piper
Spesies	: <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav

2. Nama Daerah

Sirih pait (Maluku), tali pait (Maluku), gumi momadi (Ternate) (Heyne, 1987). Guan shang hu jiao (cina), ornamental pepper (inggris) (Mardiana, 2004). Sirih talan (Maluku), jahe sunti (Jawa), sereh, sireh, canbei, ceureuh, sedah, ganjang, bolu, ani-ani, amu atau reman (Sudewo, 2008).

3. Kandungan Kimia Tanaman

Kandungan kimia daun sirih merah yaitu senyawa flavonoid dan polifenol (Yulinta, 2013). Kandungan kimia alkaloid, flavonoid, tannin dan saponin serta peptida (Ivorra, *et al.*, 1989; Arambpewela, 2005). Kandungan kimia alkaloid dan

flavonoid (Sang, 2000). Kandungan kimia flavonoid jenis flavon dan flavonol (Neldawati, 2013). Kandungan kimia alkaloid, flavonoid, tanin (Agustanti, 2008). Kandungan kimia alkaloid, flavonoid, tanin (Safithri, 2008).

4. Morfologi Tanaman



Gambar 1. Tanaman sirih merah

Tanaman sirih merah merupakan tumbuhan merambat dari famili Piperaceae. Daun bertangkai dengan bagian atas meruncing, bertepi rata, permukaan mengkilap, dan tidak berbulu. Panjang daun mencapai 15-20 cm. Daun bagian atas berwarna hijau bercorak putih keabuan. Daun bagian bawah berwarna merah hati cerah. Daun berlendir, terasa sangat pahit dan beraroma khas sirih. Bunga majemuk berbentuk bulir terdapat daun pelindung \pm 1mm berbentuk bulat panjang. Bulir jantan panjangnya sekitar 1,5-6 cm, dimana terdapat kepala putik tiga sampai lima buah yang berwarna putih dan kehijauan. Buah berbentuk bulat berwarna hijau keabu-abuan. Akar tunggang, bulat berwarna coklat kekuningan. Sirih merah menyukai tempat teduh, berhawa sejuk dengan sinar matahari 60-75%, tumbuh subur dan baik pada daerah pengunungan sedangkan pertumbuhan pada daerah

panas dan sinar matahari langsung, batang akan cepat mengering, warna merah daun akan cepat pudar (Sudewo, 2008).

5. Khasiat Tanaman

Di masyarakat daun sirih merah mempunyai berbagai macam khasiat, yaitu mengobati diabetes mellitus, jantung koroner, radang prostat, tuberkulosis, hiperurisemia, kanker payudara dan kanker rahim, ambeien, penyakit ginjal, hepatitis (Sudewo, 2008). Berdasarkan penelitian, diketahui bahwa sirih merah mempunyai aktivitas sebagai antibakteri (Juliantina, 2009), antiproliferatif (Wicaksono, 2009), antioksidan (Suratmo, 2010), antihiperlikemia (Safithri, 2008), antiinflamasi (Arbianti, *et al*, 2008) dan penyembuhan luka diabetes (Astuti, 2010; Fimani, 2010).

6. Keamanan

Ekstrak daun sirih merah tidak mempengaruhi aktivitas SGPT dan SGOT penderita diabetes mellitus dan ekstrak tersebut bersifat tidak toksik terhadap organ hati. Pada dosis 0, 5, 10, maupun 20 g/kg BB pada semua dosis rebusan daun sirih merah tidak bersifat toksik, tidak ada perbedaan signifikan dari histologi hati dan ginjal, kadar kreatinin, SGPT dan SGOT. Ekstrak air daun sirih merah tidak hepatotoksik, nefrotoksik, dan hematoksik. Ekstrak daun sirih merah dosis 50 mg/kg BB dan 100 mg/kg BB pada tikus induksi aloksan tidak toksik terhadap ginjal dan menunjukkan tidak terjadinya perubahan patologi terhadap mikroskopis ginjal dan dapat menghentikan atau menghambat kerusakan oksidatif pada sel β pankreas (Kendran *et al.*, 2013; Safithri *et al.*, 2012a; Safithri *et al.*, 2012b; Yulinta *et al.*, 2013).

B. Tanaman Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl)

1. Sistematika Tanaman

Berdasarkan taksonomi tumbuhan, mahkota dewa diklasifikasikan sebagai berikut (Dyah dan Firman, 2007).

Divisi : Spermathophyta
Subdivisi : Angiospermae
Kelas : Discotyledoneae
Bangsa : Thymelaeales
Suku : Thymelaeaceae
Marga : Phaleria
Spesies : *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, *Phaleria papuana* Warb var. Wichnanni (Val) Back.

2. Nama Daerah

Makuto dewo, makuto rojo atau makuto ratu (jawa tengah), buah simalakama (jawa barat), raja obat (banten), pau (cina) (Dyah dan Firman, 2007).

3. Kandungan Kimia

Kandungan kimia buah mahkota dewa yaitu alkaloid, saponin, flavonoid, dan polifenol (Harmanto, 2001). Kandungan kimia saponin dan flavonoid (Sumastuti, 2005). Kandungan kimia flavonoid jenis flavanon dan flavonol (Rohyami, 2007). Kandungan kimia saponin, tanin (Meiyanti, 2006). Kandungan kimia flavonoid (kuarsetin), alkaloid (Arjadi, 2010). Kandungan kimia alkaloid, saponin, flavonoid (Sulistyoningrum, 2013). Kandungan kimia tanin, terpenoid, flavonoid (Ali, 2012). Kandungan kimia alkaloid, flavonoid, saponin, dan polifenol (Edward, 2009).

4. Morfologi Tanaman



Gambar 2. Buah mahkota dewa

Tanaman asli Indonesia ini termasuk ke dalam jenis tanaman perdu yang dapat tumbuh subur dengan ketinggian 10-1200 m di atas permukaan laut. Tinggi pohonnya bisa mencapai 6 m apabila dibiarkan tumbuh tidak terawat, namun umumnya pohon ini tumbuh tegak dengan tinggi 1-2,5 m. Mahkota dewa bisa berumur sampai puluhan tahun. Tingkat produktivitasnya mampu dipertahankan sampai usia 10-20 tahun. Batang dari tanaman mahkota dewa berbentuk bulat. Permukaan batang kasar terdiri dari batang dan kayu. Batang kayu berwarna putih dan kulit batang berwarna coklat kehijauan. Batang biasanya memiliki banyak cabang dan bergetah. Bunga mahkota dewa termasuk jenis bunga majemuk, berwarna putih dan berbau harum. Bunga berukuran kecil seperti bunga cengkeh yang tumbuh di sekitar batang atau ketiak daun. Mahkota dewa berbunga sepanjang tahun dan tidak mengenal musim. Bunga biasanya banyak muncul pada saat musim penghujan. Biji mahkota dewa berbentuk bulat lonjong dengan diameter sekitar 1 cm, bagian dalam berwarna putih. Akar mahkota dewa termasuk jenis akar tunggang. Pertumbuhan akar bisa mencapai panjang 100 cm yang menyebar ke

samping sesuai ukuran panjang sekeliling lingkaran tajuk daun. Daun mahkota dewa berwarna hijau, permukaan licin dan tidak berbulu. Daun yang sudah tua berwarna lebih gelap dibandingkan daun yang masih muda. Helaian daun berbentuk lanset atau lonjong. Ujung dan pangkal daun runcing dengan tepi rata. Panjang daun sekitar 7-10 cm dan lebar 3-5 cm. Pertulangan daun menyirip. Daun tanaman mahkota dewa termasuk jenis daun tunggal (Dyah dan Firman, 2007).

5. Khasiat

Di masyarakat buah mahkota dewa mempunyai berbagai macam khasiat, yaitu antihistamin (Siswono, 2001), antihipoglikemik (Primsa, 2002), leukimia (Lisdawati, 2002), antihipertensi, batu ginjal, asam urat (Sumastuti, 2005).

6. Keamanan

Ekstrak buah mahkota dewa dosis maksimal 5000 mg/kg BB tidak toksik. Uji toksisitas akut pada mencit didapatkan bahwa dosis letal (LD 50) infus buah MD adalah 67,04 mg/10 g bb mencit pada pemberian secara ip, LD 50 ekstrak etanol 70% buah MD pemberian secara ip pada mencit adalah 36,53 mg/10g bb. Kedua nilai ini jika diekstrapolasikan dengan cara Paget & Barnes kepada penggunaan oral pada tikus menurut kategori Gleason berada dalam kategori *practically non toxic*. Uji toksisitas subkronis pada tikus didapatkan bahwa pemberian ekstrak mahkota dewa secara oral sampai dosis 330 mg/200 g BB adalah aman (Azad, 2014; Widowati 2004, 2005; Paget, 1964).

C. Diabetes Mellitus

1. Definisi Diabetes Mellitus (DM)

Diabetes melitus merupakan penyakit kronis yang terjadi ketika pankreas tidak memproduksi insulin dengan cukup atau ketika tubuh tidak dapat secara efektif menggunakan insulin yang dihasilkan. Insulin merupakan hormon yang mengatur kadar gula darah. Meningkatnya kadar gula darah atau hiperglikemia merupakan efek umum dari diabetes yang tidak terkontrol dari waktu ke waktu dan dapat menyebabkan kerusakan serius pada banyak sistem tubuh terutama sistem saraf dan pembuluh darah (WHO, 2009).

2. Klasifikasi Diabetes Mellitus

Klasifikasi Etiologi Diabetes Mellitus

- I. Diabetes tipe 1 (Destruksi sel, umumnya mengarah kepada defisiensi insulin absolut)
 1. *Immune mediated*
 2. Idiopathik
 - II. Diabetes tipe 2, (diabetes dari predominan resistensi insulin dengan defisiensi insulin relatif hingga predominan defek sekresi dengan resistensi insulin)
 - III. Tipe lain
 1. Defek genetik dari fungsi sel beta
 2. Defek genetik kerja insulin
 3. Penyakit eksokrin pankreas
 4. Endokrinopati
 5. Imbas obat atau zat kimia
 6. Infeksi
 7. Jenis tidak umum dari diabetes yang diperantarai imun
 8. Sindrom genetik yang kadang berhubungan dengan DM
 - IV. Diabetes Mellitus gestasional
-

2.1 Diabetes Mellitus Tipe 1 (*Insulin Dependent Diabetes Mellitus/IDDM*).

Diabetes tipe ini merupakan diabetes yang jarang, diperkirakan kurang dari 5-10% dari keseluruhan populasi penderita diabetes (Depkes RI, 2005). Diabetes tipe 1 ini

lebih umum terjadi pada usia anak-anak dan masa remaja. (Dipiro, 2005; Porte 1996). Pada DM tipe 1, terjadi gangguan produksi insulin akibat kerusakan sel β pankreas di pulau Langerhans melalui reaksi autoimun. Kerusakan ini terjadi karena faktor lingkungan seperti infeksi virus., zat-zat kimia dan faktor genetik (Porte dan Sherwin, 1998). Selain defisiensi insulin, fungsi sel-sel α kelenjar pankreas pada penderita DM tipe 1 juga menjadi tidak normal. Pada penderita DM tipe 1 ditemukan sekresi glukagon yang berlebihan oleh sel-sel α pankreas di pulau Langerhans. Secara normal, hiperglikemia akan menurunkan sekresi glukagon, namun pada penderita DM tipe 1 hal ini tidak terjadi, sekresi glukagon tetap tinggi walaupun dalam keadaan hiperglikemia. Hal ini memperparah kondisi hiperglikemia. Salah satu manifestasi dari keadaan ini adalah cepatnya penderita DM tipe 1 mengalami ketoasidosis diabetik apabila tidak mendapat terapi insulin (Depkes RI, 2005).

2.2 Diabetes Melitus Tipe 2 (*Noninsulin Dependent Diabetes Melitus*).

Diabetes tipe ini merupakan tipe diabetes yang lebih umum, lebih banyak penderitanya dibandingkan dengan DM tipe 1. Etiologi DM tipe 2 merupakan multifaktor yang belum sepenuhnya terungkap dengan jelas. Faktor genetik dan pengaruh lingkungan cukup besar dalam menyebabkan terjadinya DM tipe 2, antara lain obesitas, diet tinggi lemak dan rendah serat, serta kurang gerak badan. Penderita DM tipe 2 yang berada pada tahap awal umumnya dapat dideteksi jumlah insulin yang cukup dalam darahnya, disamping kadar glukosa yang juga tinggi. DM tipe 2 bukan disebabkan oleh kurangnya sekresi insulin, tetapi karena sel-sel sasaran insulin gagal atau tak mampu merespon insulin secara normal. Keadaan ini

disebut sebagai “Resistensi Insulin”. Selain resistensi insulin, pada penderita DM tipe 2 dapat juga timbul gangguan sekresi insulin dan produksi glukosa hepatic yang berlebihan. Namun demikian, tidak terjadi pengrusakkan sel-sel β Langerhans secara otoimun sebagaimana yang terjadi pada DM tipe 1. Dengan demikian defisiensi fungsi insulin pada penderita DM tipe 2 hanya bersifat relatif, tidak absolut. Oleh sebab itu dalam penanganan, umumnya tidak memerlukan terapi pemberian insulin (Depkes RI, 2005).

2.3 Diabetes Melitus Gestasional (DMG). Diabetes tipe ini merupakan keadaan diabetes atau intoleransi glukosa yang timbul selama masa kehamilan, dan biasanya berlangsung hanya sementara atau temporer (Depkes RI, 2005). Pasien dengan DMG terdeteksi adanya intoleransi glukosa selama kehamilan GDM terjadi kurang lebih 2% dari wanita hamil dan berhubungan dengan meningkatnya morbiditas dan mortalitas perinatal (Porte dan Sherwin, 1998).

2.4 Diabetes Melitus tipe lain. Diabetes tipe ini berhubungan dengan kondisi lain atau sindrom tertentu. Diabetes menjadi efek sekunder dari penyakit pankreas, penyakit endokrin seperti akromegali, sindrom *Cushing*, feokromositoma, glukagonoma, somatostatinoma. Diabetes tipe lain juga dapat terjadi akibat pemberian hormon-hormon yang dapat menyebabkan hiperglikemia dan penggunaan obat-obat tertentu seperti obat antihipertensi, diuretik tiazid, agen simpatomimetik, dan lain-lain (Porte dan Sherwin, 1998).

3. Patofisiologi Diabetes Melitus

3.1 Diabetes Melitus Tipe 1. Penghancuran autoimun dari sel β pankreas, menyebabkan defisiensi sekresi insulin menghasilkan gangguan metabolik yang

berhubungan dengan DM tipe 1. Selain hilangnya sekresi insulin, fungsi sel α pankreas juga tidak normal dan ada sekresi glukagon yang berlebihan pada pasien DM tipe 1. Biasanya, hiperglikemia menyebabkan berkurangnya sekresi glukagon. Namun, pada DM tipe 1, sekresi glukagon tidak ditekan oleh hiperglikemia. Resultan tidak tepat dalam peningkatan kadar glukagon akan memperburuk cacat metabolik akibat defisiensi insulin. Contoh yang paling menonjol dari gangguan metabolik ini adalah bahwa penderita DM tipe 1 dengan cepat mengembangkan diabetik ketoasidosis sebab tidak adanya pemberian insulin. Meskipun kekurangan insulin adalah cacat utama dalam DM tipe 1, terdapat juga cacat dalam administrasi insulin. Ada beberapa mekanisme biokimia yang menjelaskan penurunan respon jaringan terhadap insulin.

Kekurangan insulin menyebabkan lipolisis yang tidak terkendali dan peningkatan kadar asam lemak bebas dalam plasma, yang menekan metabolisme glukosa pada jaringan perifer seperti otot rangka. Hal ini mengganggu pemanfaatan glukosa dan menyebabkan kekurangan insulin sehingga akan menurunkan ekspresi dari beberapa gen yang diperlukan pada jaringan target untuk merespon secara normal terhadap insulin seperti glukokinase di hati dan transporter glukosa (GLUT-4) dalam jaringan adiposa. Adapun gangguan metabolik utama yaitu kekurangan insulin pada DM tipe 1 adalah metabolisme glukosa, lipid dan protein (Raju dan Raju, 2010).

3.2 Diabetes Melitus tipe 2. Penderita DM tipe 2 memiliki tingkat yang terdeteksi dalam peredaran insulin. Tidak seperti DM tipe 1, atas dasar toleransi glukosa oral menguji unsur-unsur penting dari DM tipe 2 dapat dibagi menjadi

empat kelompok yang berbeda yaitu penderita dengan toleransi glukosa normal, diabetes kimia atau toleransi glukosa terganggu, diabetes dengan hiperglikemia puasa minimal (glukosa plasma puasa ≤ 140 mg/dl), diabetes yang berkaitan dengan hiperglikemia puasa terbuka (glukosa plasma puasa ≥ 140 mg/dl).

Penderita dengan gangguan toleransi glukosa memiliki hiperglikemia meskipun mempunyai tingkat tertinggi insulin plasma, menunjukkan bahwa mereka tahan terhadap aksi insulin. Dalam perkembangan dari gangguan toleransi glukosa pada diabetes mellitus, tingkat penurunan insulin menunjukkan bahwa pasien dengan DM tipe 2 mengalami penurunan sekresi insulin. Resistensi insulin adalah penyebab utama dari DM tipe 2, namun beberapa peneliti berpendapat bahwa kekurangan insulin adalah penyebab utama karena tingkat moderat resistensi insulin tidak cukup untuk menyebabkan DM tipe 2 (Raju dan Raju, 2010).

4. Komplikasi Diabetes Melitus

4.1 Komplikasi Akut. Komplikasi akut yaitu hipoglikemia merupakan keadaan gawat darurat yang dapat terjadi pada pasien DM dalam perjalanan penyakitnya. Ketoasidosis diabetik suatu keadaan gawat darurat DM dimana kadar glukosa darah meningkat tinggi disertai dengan peningkatan keasaman darah akibat timbunan benda keton dan kekurangan cairan. Keadaan ini disebabkan defisiensi insulin berat dan akut. Tanda khasnya adalah kesadaran menurun disertai dehidrasi berat. Komplikasi akut ini memerlukan penanganan yang cepat dan tepat karena angka kematiannya tinggi.

4.2 Komplikasi Kronis. Komplikasi kronis terjadi jika kadar glukosa darah tetap tinggi dalam jangka waktu tertentu. Komplikasi kronis dibagi menjadi dua

yaitu makrovaskuler dan mikrovaskuler. Komplikasi mikrovaskuler terutama terjadi pada penderita diabetes tipe 1. Komplikasi-komplikasi mikrovaskuler, antara lain retinopati, nefropati, dan neuropati. Kondisi ini disebabkan Hiperglikemia yang persisten dan pembentukan protein yang terglukasi (termasuk HbA1c) menyebabkan dinding pembuluh darah menjadi makin lemah dan rapuh dan terjadi penyumbatan pada pembuluh-pembuluh darah kecil. Komplikasi makroangiopati yang terjadi yaitu penyakit jantung koroner, penyakit pembuluh darah otak dan penyakit pembuluh darah perifer, komplikasi ini lebih sering terjadi pada penderita DM tipe 2. Komplikasi makrovaskular merupakan faktor yang memperburuk prognosis pasien DM dan penyebab kematian tersering (Depkes RI, 2005).

5. Terapi Diabetes Melitus

5.1 Pemicu Sekresi Insulin. Sulfonilurea, obat golongan ini mempunyai efek utama meningkatkan sekresi insulin oleh sel beta pankreas, dan merupakan pilihan utama untuk pasien dengan berat badan normal dan kurang, namun masih oleh diberikan kepada pasien dengan berat badan lebih. Untuk menghindari hipoglikemia berkepanjangan pada berbagai keadaan seperti orang tua, gangguan faal ginjal dan hati, kurang nutrisi serta penyakit kardiovaskular, tidak dianjurkan penggunaan sulfonilurea kerja panjang.

Glinid, obat yang cara kerjanya sama dengan sulfonilurea, dengan penekanan pada meningkatkan sekresi insulin fase pertama. Golongan ini terdiri dari 2 macam obat yaitu : Repaglinid (Derivat asam benzoat) dan Nateglinid (Derivat fenilalanin).

Obat ini diabsorpsi dengan cepat setelah pemberian secara oral dan diekskresi secara cepat melalui hati.

5.2 Penambah Sensitivitas Insulin. Tiazolidindion (rosiglitazon dan pioglitazon) berikatan pada *Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma* (PPAR- γ), suatu reseptor inti di sel otot dan sel lemak. Golongan ini mempunyai efek menurunkan resistensi insulin dengan meningkatkan jumlah protein pengangkut glukosa, sehingga meningkatkan ambilan glukosa di perifer. Tiazolidindion di kontraindikasikan pada pasien dengan gagal jantung kelas I-IV karena dapat memperberat edema/retensi cairan dan juga pada gangguan faal hati. Pada pasien yang menggunakan tiazolidindion perlu dilakukan pemantauan faal hati secara berkala.

6.3 Penghambat Glukoneogenesis. Metformin mempunyai efek utama mengurangi produksi glukosa hati (glukoneogenesis), disamping juga memperbaiki ambilan glukosa perifer. Terutama dipakai pada penyandang diabetes gemuk. Metformin dikontraindikasikan pada pasien dengan gangguan fungsi ginjal (serum kreatinin $\geq 1,5$ mg/dL) dan hati, serta pasien-pasien dengan kecenderungan hipoksemia (misalnya penyakit serebrovaskular, sepsis, renjatan, gagal jantung). Metformin dapat memberikan efek samping mual. Untuk mengurangi keluhan tersebut dapat diberikan pada saat atau sesudah makan.

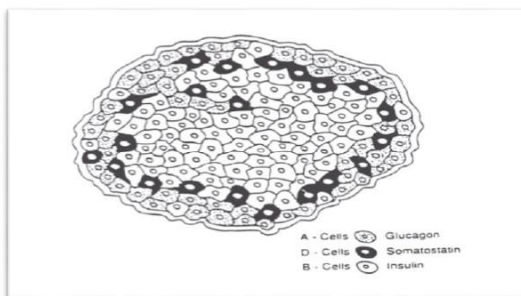
6.4 Penghambat Alfa Glukosidase. Akarbosa bekerja dengan mengurangi absorpsi glukosa di usus halus, sehingga mempunyai efek menurunkan kadar glukosa darah sesudah makan. Akarbosa tidak menimbulkan efek samping

hipoglikemia. Efek samping yang paling sering ditemukan ialah kembung dan flatulens (PERKENI, 2011).

D. Pankreas

1. Definisi Pankreas

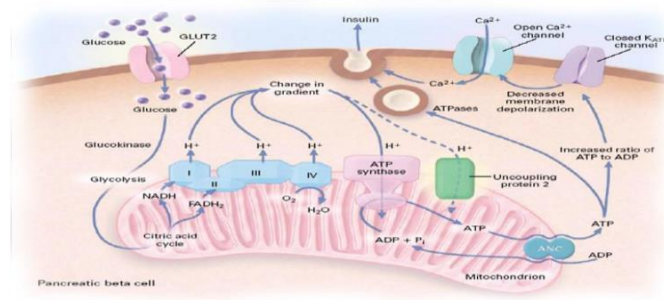
Pankreas merupakan organ pada sistem pencernaan. Pankreas manusia memiliki sekitar satu juta pulau Langerhans, dengan konsentrasi terbesar ditemukan di bagian ekor dari pada kepala dan badan pankreas. Pulau sangat vaskularisasi mengikuti arteri pankreas dan bermuara ke vena porta yang memberikan seluruh sekresi hormon pankreas ke hati. Pulau Langerhans di persarafi oleh saraf otonom pada sistem parasimpatis (saraf nervus vagus) dan simpatik (saraf splanknik tengah) pada serat-serat atau dekat sel sekretori. Pulau Langerhans terdiri dari : sel α berperan dalam mensekresi hormon glukagon, sel β berperan dalam mensekresi hormon insulin, sel delta berperan dalam mensekresi hormon somatostatin, dan sel F (atau PP) berperan dalam mensekresi polipeptida (Kitabchi, 2009).



Gambar 3. Susunan sel dalam pulau Langerhans (Kitabchi, 2009)

1.1 Sekresi Insulin. Sekresi insulin oleh sel β tergantung oleh 3 faktor utama yaitu, kadar glukosa darah, *ATP-sensitive K channels* dan *Voltage-sensitive*

Calcium Channels sel β pankreas. Mekanisme kerja ketiga faktor ini sebagai berikut : Pada keadaan puasa saat kadar glukosa turun, *ATP-sensitive K channels* di membran sel beta akan terbuka sehingga ion kalium akan meinggalkan sel β (K-efflux), dengan demikian mempertahankan potensial membran dalam keadaan hiperpolar sehingga *Ca-channels* tertutup, akibatnya kalsium tidak dapat masuk ke dalam sel β sehingga perangsangan sel β untuk mensekresi insulin menurun (Howell, 1997; White, 1994). Sebaliknya pada keadaan setelah makan, kadar glukosa darah yang meningkat akan ditangkap oleh sel β melalui glukosa transporter 2 (GLUT-2) dan dibawa ke dalam sel. Di dalam sel, glukosa akan mengalami fosforilase menjadi glukosa-6 fosfat (G6P) dengan bantuan enzim penting, yaitu glukokinase. Glukosa 6 fosfat kemudian akan mengalami glikolisis dan akhirnya akan menjadi asam piruvat. Dalam proses glikolisis ini akan dihasilkan 6-8 ATP. Penambahan ATP akan meningkatkan rasio ATP/ADP dan ini akan menutup terowongan kalium. Dengan demikian kalium akan tertumpuk dalam sel dan terjadilah depolarisasi membran sel, sehingga membuka terowongan kalsium dan kalsium akan masuk ke dalam sel. Dengan meningkatnya kalsium intrasel, akan terjadi translokasi granul insulin ke membran dan insulin akan dilepaskan ke dalam darah (Masharani, 2001; Howell, 1997).



Gambar 4 Sekresi insulin oleh rangsangan glukosa (Howell, 1997)

Mengingat GLUT-2 mempunyai sifat mengangkut glukosa ke dalam sel tanpa batas, agaknya enzim glukokinase bekerja sebagai “pembatas” agar fosforilasi berjalan seimbang sesuai kebutuhan, dengan demikian peristiwa depolarisasi dapat diatur dan pelepasan insulin dari sel β ke dalam darah disesuaikan dengan kebutuhan. Oleh karena itu enzim glukokinase disebut sebagai glukosa sensor karena bertindak sebagai sensor terhadap glukosa (Howell, 1997).

Sekresi insulin pada orang non diabetes meliputi 2 fase yaitu fase dini (fase 1) atau *early peak* yang terjadi dalam 3-10 menit pertama setelah makan. Insulin yang disekresi pada fase ini adalah insulin yang disimpan dalam sel β (siap pakai), dan fase lanjut (fase 2) adalah sekresi insulin dimulai 20 menit setelah stimulasi glukosa. Pada fase 1, pemberian glukosa akan meningkatkan sekresi insulin untuk mencegah kenaikan kadar glukosa darah, dan kenaikan glukosa darah selanjutnya akan merangsang fase 2 untuk meningkatkan produksi insulin. Makin tinggi kadar glukosa darah sesudah makan makin banyak pula insulin yang dibutuhkan, akan tetapi kemampuan ini hanya terbatas pada kadar glukosa darah dalam batas normal.

Pada DM tipe 2, sekresi insulin di fase 1 tidak dapat menurunkan glukosa darah sehingga merangsang fase 2 untuk menghasilkan insulin lebih banyak, tetapi sudah tidak mampu meningkatkan sekresi insulin sebagaimana pada orang normal. Gangguan sekresi sel β menyebabkan sekresi insulin pada fase 1 tertekan, kadar insulin dalam darah turun menyebabkan produksi glukosa oleh hati meningkat, sehingga kadar glukosa darah puasa meningkat. Secara berangsur-angsur kemampuan fase 2 untuk menghasilkan insulin akan menurun. Dengan demikian perjalanan DM tipe 2, dimulai dengan gangguan fase 1 yang menyebabkan hiperglikemi dan selanjutnya gangguan fase 2 dimana tidak terjadi hiperinsulinemi akan tetapi gangguan sel β (Masharani, 2001).

1.2 Sekresi Glukagon. Glukagon merupakan hormon yang dihasilkan oleh sel-sel α pada pulau-pulau Langerhans pankreas. Sekresi dirangsang oleh keadaan hipoglikemia. Pada saat mencapai hati (lewat vena porta), hormon glukagon menimbulkan glikogenolisis dengan mengaktifkan enzim fosforilase. Sebagian besar glukagon endogen (dan insulin) dibersihkan dari sirkulasi darah oleh hati. Glukagon juga meningkatkan glukoneogenesis dari asam amino dan laktat (Stryer, 2000; Suyono, 2005).

1.3 Sekresi Somatostatin. Somatostatin merupakan hormon yang dihasilkan oleh sel-sel δ pada pulau Langerhans pankreas yang merupakan *tetradecapeptide* siklik, dengan berat molekul 1640, Somatostatin berasal dari prekursor yang lebih besar yang disebut prosomatostatin. Antara tepi luar inti sel α dan sel β terdapat sel δ yang mengandung somastostatin yang terdiri dari sekitar 10% dari total sel. Ketiga jenis sel berada dalam kontak dengan satu sama lain melalui *gapjunction*.

Glukagon adalah stimulan yang kuat dari sekresi insulin dan somatostatin. Di sisi lain, somatostatin menghambat baik insulin dan sekresi glukagon. Somatostatin, dalam hubungannya dengan insulin, menghambat sekresi glukagon dan mengurangi hiperglikemia postprandial sekitar 50%. Selain menghambat sekresi insulin dan glukagon dan dirangsang oleh hampir semua *secretagogues* insulin, tindakan somatostatin dalam beberapa cara lain. Ini termasuk perpanjangan waktu pengosongan lambung, mengurangi asam gastrin dan sekresi gastrin, mengurangi sekresi eksokrin pankreas, penurunan aliran darah splanchnik dan menahan gerakan nutrisi dari saluran usus ke dalam sirkulasi. Kalsium penting untuk sekresi optimal somatostatin (Kitabchi, 2009).

1.4 Pankreas Polipeptida (PP). PP merupakan asam amino peptida 36 dengan berat molekul 4200. Hal ini disintesis dan disekresikan oleh sel-sel F (atau sel PP). Tingkat PP meningkat dengan konsumsi makanan campuran, tetapi tidak IV infus glukosa atau trigliserida. Meskipun peran fisiologis peptida ini tidak diketahui, itu meningkat pada tumor endokrin pankreas seperti glucagonoma, vipoma dan pada semua pasien dengan tumor sel pankreas F. PP juga meningkat pada usia tua, penyalahgunaan alkohol, diare dan penyakit ginjal kronis. PP meningkat sekitar sepuluh kali lipat pada tumor pankreas (Kitabchi, 2009).

E. Glukosa

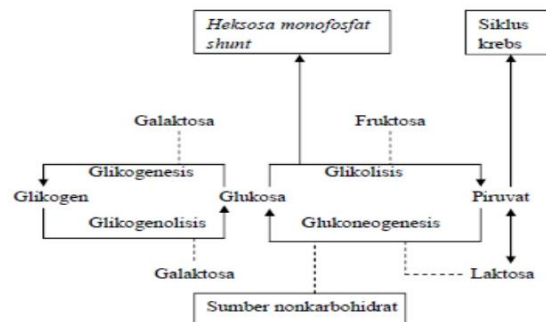
1. Definisi Glukosa

Glukosa adalah suatu monosakarida aldeheksosa yang terdapat dalam bentuk D-glukosa pada buah dan tanaman lain dan dalam darah hewan normal, juga

dalam bentuk terikat dengan glukosida, disakarida, oligosakarida, dan polisakarida. Glukosa merupakan produk akhir metabolisme karbohidrat (Dorland, 2002).

2. Metabolisme Glukosa

Karbohidrat yang telah mengalami proses pencernaan akan terpecah menjadi senyawa-senyawa sederhana sehingga dapat diserap oleh usus halus yaitu glukosa, fruktosa dan galaktosa. Glukosa dan galaktosa diserap ke dalam interior sel dan masuk ke dalam darah melalui mekanisme transpor aktif sekunder yang bergantung pada Na^+ dan energi, sedangkan fruktosa diserap ke dalam darah melalui mekanisme difusi terfasilitasi pasif (Sherwood, 2001). Selain itu, glukosa berperan sebagai pusat metabolisme karbohidrat (Rofles *et al*, 2006).



Gambar 5 Jalur utama metabolisme karbohidrat (Gropper *et al.*, 2005)

Kelebihan glukosa akan diubah menjadi glikogen dan akan disimpan di dalam hati dan otot yang akan digunakan bila diperlukan. Jika kadarnya masuk berlebih akan diubah menjadi lemak di hati kemudian dibawa ke sel-sel lemak (Almatsier, 2001). Glukosa dalam darah dibentuk melalui proses pencernaan, glukoneogenesis, dan glikogenolisis. Glukoneogenesis adalah proses pembentukan glukosa dari zat non karbohidrat, yaitu beberapa asam amino, laktat, gliserol (produk katabolisme

gliserol), dan piruvat. Glikogeneolisis adalah proses pencernaan glikogen menjadi glukosa. Reaksi ini terutama dipengaruhi oleh hormon glukagon dan katekolamin (Gropper *et al.*, 2005).

3. Glukosa Transporter

Glukosa transporter (GLUT) merupakan senyawa asam amino yang terdapat di dalam berbagai sel yang berperan dalam proses metabolisme glukosa. Fungsinya sebagai “kendaraan” pengangkut glukosa masuk dari luar ke dalam sel jaringan tubuh dan mempercepat penurunan rasio plasmanya, dengan mengalihkan glukosa tersebut ke dalam sel target, umumnya berupa sel pada jaringan adiposa atau otot lurik dan otot jantung. GLUT terkodekan oleh sekelompok gen yang salah satu gen tersebut adalah IRGT (*Insulin regulatable glucose transporter*). Insulin menyebabkan GLUT yang semula berada di dalam sitoplasma sel pada jaringan otot dan jaringan adiposa namun tidak pada hati maupun otak bergerak keluar dan terekspresi di permukaan membran sel, kemudian GLUT akan berfungsi sebagai portal yang memindahkan glukosa darah ke dalam sel secara difusi. Setiap isoform GLUT mempunyai peran yang berbeda-beda dalam metabolisme glukosa sesuai dengan pola dari ekspresi jaringan, kinerja dan kondisi fisiologis. Glukosa transporter terbagi menjadi 3 kelas yaitu kelas I, kelas II, dan kelas III.

Kelas I fasilitatif transporter mengandung GLUT 1-4 dan secara komprehensif ditandai dengan struktur, fungsi dan distribusi jaringan. GLUT-1 diekspresikan terutama di otak (seperti penghambat darah di otak) dan eritrosit. Tingkat moderat ekspresi juga diamati dalam jaringan adiposa, otot dan hati. GLUT-2 diekspresikan terutama di sel β pankreas, hati dan ginjal. Dalam sel β ,

GLUT-2 berperan dalam mekanisme penginderaan glukosa, sementara dalam hati diekspresikan pada membran sinusoidal hepatosit dan memungkinkan transportasi glukosa secara dua arah di bawah kendali hormon. GLUT-2 juga diekspresikan pada permukaan basolateral dari ginjal proksimal tubulus dan enterosit, dimana ia merupakan bagian dari transeuler yang jalur untuk transporter glukosa dan fruktosa. GLUT-3 memiliki afinitas tinggi untuk glukosa dan ini konsisten dengan kehadirannya di jaringan mana permintaan untuk glukosa sebagai bahan bakar yang cukup, khususnya di otak. Glukosa transporter insulin-responsif pada GLUT-4 diekspresikan dalam hati, otot skelet dan jaringan adiposa di mana berperan untuk pengurangan kenaikan postprandial kadar glukosa plasma dan juga diekspresikan di otak. Insulin bertindak dengan merangsang translokasi pada GLUT-4 mengandung vesikel dari intraseluler untuk membran plasma mengakibatkan peningkatan 10-20 kali lipat dalam transportasi glukosa.

Kelas II fasilitatif transporter yang dipimpin oleh transporter fruktosa GLUT-5, GLUT-7, GLUT-9 dan GLUT-11. GLUT-5 diekspresikan pada usus kecil, testis dan ginjal. GLUT-7 dikenal sebagai gen yang tidak berkarakter untuk itu diidentifikasi berdasarkan luas komposisi gen berdasarkan homologi dan telah dipetakan ke kromosom 1 namun tempat ekspresi saat ini tidak diketahui. Ekspresi GLUT-9 jelas dalam hati dan ginjal. Dua varian tersebut telah dijelaskan untuk GLUT-11, melalui ekson 2 yang menghasilkan bentuk panjang dan pendek dari protein yang terdiri dari 503 dan 493 residu asam amino. Kedua varian melalui jaringan secara spesifik. Glukosa transportasi afinitas rendah ditunjukkan oleh

bentuk pendek dari GLUT-11 dan bersaing dengan transporter fruktosa yang diekspresikan terutama di jantung dan otot rangka.

Kelas III fasilitatif transporter terdiri lima anggota: GLUT-6, GLUT-8, GLUT-10, GLUT-12 dan HMIT. Salah satu fitur dari kelas ini adalah lokasi karakteristik glikosilasi. Lokasi glikosilasi ini terbukti secara fungsional penting bagi GLUT-1. GLUT-6 diekspresikan dalam limpa, leukosit dan otak sedangkan GLUT-8 diekspresikan di testis, otak dan jaringan adiposa. GLUT-10 juga telah dilaporkan diekspresikan dalam hati dan pankreas. Transportasi glukosa fungsional telah dibuktikan untuk GLUT-6, GLUT-8 dan GLUT-10. Namun, HMIT telah terbukti diekspresikan terutama di otak (Wood dan Trayhurn, 2003).

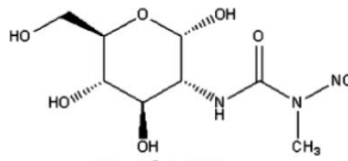
Tabel 1. Karakteristik struktur dan fungsional anggota individual GLUT

Jenis	Nama sebelum	Tempat Kerja	Tingkat sensitif	Karakter fungsional	Berada di dalam otot rangka	Berada didalam jaringan adipose
GLUT 1	-	Eritrosit, otak, dan dimana-mana	Tidak	Glukosa	Ya	Ya
GLUT 2	-	Hati, pankreas, Ginjal dan usus	Tidak	Glukosa (Afinitas Rendah), fruktosa	Tidak	Tidak
GLUT 3	-	Otak	Tidak	Glukosa (Afinitas tinggi)	Tidak	Ya
GLUT 4	-	Jantung, otot	Ya	Glukosa (Afinitas tinggi)	Ya	Ya
GLUT 5	-	Usus, testis, ginjal	Tidak	Fruktosa, glukosa (Afinitas sangat lemah)	Ya	Ya
GLUT 6	GLUT 9	Otak, limpa, leukosit	Tidak	Glukosa	Tidak	Tidak terdeterminasi
GLUT 7	-	Tidak terdeterminasi	Tidak terdeterminasi	Tidak terdeterminasi	Tidak terdeterminasi	Ya
GLUT 8	GLUT XI	Testis, otak dan jaringan lainnya	Tidak	Glukosa	Ya	Tidak terdeterminasi
GLUT 9	GLUT X	Hati, ginjal	Tidak terdeterminasi	Tidak terdeterminasi	Tidak	Tidak terdeterminasi
GLUT 10	-	Hati, pankreas	Tidak	glukosa	Ya	Tidak
GLUT 11	GLUT 10	Jantung, Otot	Tidak	Glukosa (Afinitas rendah)	Ya	Ya
GLUT 12	GLUT 8	Jantung, prostat, otot, usus kecil, otak	Ya	Tidak terdeterminasi	Ya	Ya

F. Metode Uji Aktivitas Antidiabetes

1. Induksi Streptozotosin-Nikotinamid

Streptozotosin (STZ) merupakan senyawa campuran glukosamin-nitrosourea. Nama kimiawi senyawa ini adalah 2-deoksi-3-3 metil nitrosoureido D-glukopiranososa ($C_8H_{15}N_3O_7$).



Gambar 6 Struktur kimia streptozotosin ($C_8H_{15}N_3O_7$)

Induksi percobaan diabetes menggunakan streptozotosin sangat mudah untuk dilakukan. Penyuntikan streptozotosin menyebabkan degradasi pulau langerhans sel β pankreas (Abeeleh *et al.*, 2009).

Streptozotosin secara selektif terakumulasi di dalam sel β pankreas melalui transporter glukosa GLUT-2 yang infinitasnya rendah, yang ada di dalam membran darah (Lenzen, 2008). Mekanisme dari streptozotosin adalah terjadinya perpindahan gugus metil dari streptozotosin menuju molekul DNA, sehingga menyebabkan rantai DNA pada sel β pankreas terputus. Dalam upaya untuk memperbaiki DNA, 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 menghambat sintesis proinsulin dan menginduksi terjadinya keadaan hiperglikemia. Streptozotosin menghambat sekresi insulin dan menyebabkan DM tipe 1 (Lenzen, 2008).

Secara klinis, gejala dari diabetes pada tikus akan terlihat jelas dalam 2-4 hari setelah penyuntikan secara intraperitoneal dengan dosis tunggal (Abeeleh *et al.*, 2009). Streptozotosin juga mengaktivasi spesies oksigen reaktif seperti superoksida ($O_2^{\cdot-}$), radikal hidroksil (OH) dan hidrogen peroksida (H_2O_2) (Li, 2001). Sitotoksisitas induksi streptozotosin dapat diringankan dengan nikotinamid, komponen nikotinamida adenin dinukleotida (NAD) akan menghambat aktivitas sintesis poli (ADP-ribosa) dan mencegah penipisan NAD di sel β pankreas. Tikus diabetes yang diinduksi streptozotosin sebelum diberikan nikotinamid menunjukkan hiperglikemia moderat terkait dengan hilangnya sekresi insulin di fase awal postprandial, serta perkiraan penurunan 50% kadar insulin di pankreas. Selain itu, beberapa sekretagog insulin memungkinkan tikus tersebut mengalami toleransi glukosa yang membaik tanpa mengembangkan resistensi insulin (Tahara, 2014).

Streptozotosin diperoleh dari *Streptomyces achromogenes*. Bahan ini dapat digunakan dalam menginduksi hewan percobaan baik DM tipe 1 maupun tipe 2. Dosis intravena yang digunakan untuk menginduksi DM tipe 1 adalah 40-60 mg/kg, sedangkan dosis intraperitoneal adalah lebih dari 40 mg/kg BB. STZ juga dapat diberikan secara berulang, untuk menginduksi DM tipe 1 yang diperantarai aktivasi sistem imun. Dosis intraperitoneal atau intravena yang digunakan untuk menginduksi DM tipe 2 adalah 100 mg/kg BB pada tikus yang berumur 2 hari kelahiran, pada 8-10 minggu tikus tersebut mengalami gangguan respon terhadap glukosa dan sensitivitas sel β terhadap glukosa. Dalam hal ini sel α dan δ tidak dipengaruhi secara signifikan oleh pemberian streptozotosin pada neonatal tersebut

sehingga tidak membawa dampak pada perubahan glukagon dan somatostatin. Patofisiologis tersebut identik pada DM tipe II (Bonner-Weir *et al.*, 1981; Levy *et al.*, 1984; Weir *et al.*, 1981; Szkudelski, 2001).

Tabel 2. Konsentrasi dosis pada tikus induksi STZ-NA (Szkudelski, 2012)

Dosis STZ	Dosis NA	Berat Badan/Usia	Waktu Diabetes
65 mg, iv	100 mg	220-230 g (10 minggu)	4 minggu
	180 mg		
	230 mg		
	350 mg		
65 mg, iv	230 mg	220-230 g (10 minggu)	3 minggu
60 mg, iv	290 mg	2-3 bulan	3-5 minggu
60 mg, iv	270 mg	220-230 g	2 minggu
65 mg, iv	260 mg	220-240 g (10 minggu)	23 hari
60 mg, iv	270 mg	2-3 bulan	5-8 minggu
80 mg, ip	230 mg	200-250 g	4 minggu
50 mg, iv	180 mg (30 menit)	2 bulan	8 minggu
50 mg, iv	180 mg (30 menit)	2 bulan	4 minggu
			8 minggu
65 mg, ip	110 mg	180-200 g	45 hari
60 mg, ip	120 mg	250-280 g	21 hari
60 mg, iv	120 mg	8-10 minggu	2 minggu
60 mg, iv	200 mg	250-300 g	4 minggu
60 mg, iv	210 mg	2-3 bulan	2 minggu
45 mg, ip	110 mg	200-220 g	30 hari
65 mg, ip	230 mg	200-250 g	5 hari
50 mg, ip	110 mg	160-180 g (12 jam)	37 hari
45 mg, ip	110 mg	180-220 g	45 hari
45 mg, ip	110 mg	180-220 g	45 jam
45 mg, ip	110 mg	180-220 g	48 hari
50 mg, ip	110 mg	160-180 g 6 minggu (12 jam)	37 hari
45 mg, ip	110 mg	180-200 g (6 minggu)	45 hari
60 mg, ip	146 mg	200-225 g	24 jam
	292 mg		
	439 mg (45 menit)		
65 mg, ip	60 mg	150-200 g	23 hari
45 mg, ip	110 mg	200-220 g	45 hari

2. Metode Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah

3.1 Metode Folin. Prinsip dari pemeriksaan ini adalah filtrat darah bebas protein dipanaskan dengan larutan CuSO₄ alkali. Endapan CuO yang dibentuk glukosa akan larut dengan penambahan larutan fosfat molibdat. Larutan ini dibandingkan secara kolorimetri dengan larutan standart glukosa (Pusdiknakes, 1985).

3.2 Metode Samogyi-Nelson. Prinsip dari pemeriksaan ini adalah filtrat mereduksi Cu dalam larutan alkali panas dan Cu direduksi kembali oleh arseno molibdat membentuk warna ungu kompleks (Pusdiknakes, 1985).

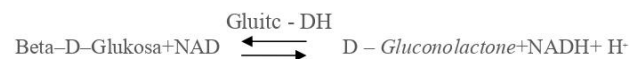
3.3 Ortho – tholuidin. Prinsipnya adalah dimana glukosa akan bereaksi dengan ortho-tholuidin dalam asam acetat panas membentuk senyawa berwarna hijau. Warna yang terbentuk diukur serapannya pada panjang gelombang 625 nm. (Pusdiknakes, 1985).

3.4 Glukosa oksidase/peroksidase. Glukosa oksidase adalah suatu enzim bakteri yang merangsang oksidasi dengan menghasilkan H₂O₂. Dengan adanya enzim peroksidase oksigen dari peroksid ini dialihkan ke *acceptor* tertentu

menghasilkan suatu ikatan berwarna. Metode-metode pemeriksaan glukosa oksidasi/peroksidasi :

1. Gluc – DH.

Prinsip : Glukosa dehidrogenasi mengkatalisasi oksidase dari glukosa sesuai persamaan sebagai berikut :



Jumlah NADH yang terbentuk sebanding dengan konsentrasi glukosa. Apabila glukosa di dalam urin atau liquor yang harus diukur, maka dianjurkan menggunakan metode ini, karena lebih spesifik.

2. GOD – PAP.

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



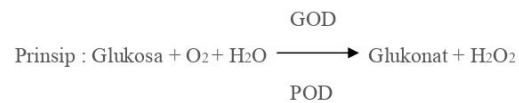
Hidrogen peroksida yang terbentuk dalam reaksi ini bereaksi dengan 4 – aminoantipyrin (*4-Hydroxybenzoic acid*). Dengan adanya peroksidase (POD) dan membentuk N- (4-antipyryl) – P- *benzoquinone imine*. Jumlah zat warna yang terbentuk sebanding dengan konsentrasi glukosa.

3. Gluco quant (Heksokinase/ G6 – DH)

Prinsip : Glukosa + ATP $\xrightarrow{\text{G6P - DH}}$ G – 6 – P + ADP



4. GOD period (Test combination)



Presipitasi ringan yang terlihat pada larutan deproteinisasi tidak akan mempengaruhi hasil pemeriksaan (Pusdiknakes, 1985).

G. Imunohistokimia

1. Definisi Imunohistokimia

Pemeriksaan imunopatologik sangat potensial untuk memeriksa antigen secara lokal di jaringan, pemeriksaan demikian selanjutnya disebut pemeriksaan Imunohistokimia, sedangkan pemeriksaan antigen lokal di sel selanjutnya disebut sebagai pemeriksaan imunositokimia. Kedua pemeriksaan ini mempunyai kemampuan yang tinggi untuk memisah, seleksi dan bersifat spesifik, bila dibandingkan dengan pemeriksaan lain. Pemeriksaan imunohistokimia untuk mendeteksi adanya antigen toksoplasma mempunyai nilai sensitifitas 65,4% dan spesifisitas 94,1%. Hal ini disebabkan pada pemeriksaan ini berdasar pada ikatan spesifik antigen-antibodi, karena itu pemeriksaan ini banyak dimanfaatkan untuk meningkatkan kualitas diagnosis, memantau dan evaluasi hasil pengobatan serta memeriksa petanda yang bernilai sebagai prognostikator.

2. Pewarnaan berdasar konsep Immunologi

Pewarnaan sediaan jaringan yang berdasar pada prinsip imunologi, adalah semua pewarnaan yang berdasarkan kekhususan ikatana antigen dengan antibodinya. Agar ikatan ini dapat dilihat dengan mikroskop, maka antibodi yang digunakan untuk memeriksa diberi label. Secara garis besar terdapat dua tipe prosedur, yang satu berdasarkan pada penggunaan molekul penanda floresen, dan yang lain berdasar pada enzim yang menghasilkan produk reaksi yang visibel. Pemberian label imunofluoresen adalah bahwa suatu molekul penanda fluoresen dieksitasi pada suatu panjang gelombang dan kemudian memancarkan cahaya pada panjang gelombang yang berbeda. Fluorokrom yang paling banyak digunakan adalah *flouresein*, *rhodamine* dan *Texax red*. Enzim yang digunakan secara paling

luas dalam prosedur ini adalah horseradish peroksidase. Molekul ini kecil (berat molekulnya kira-kira 40 kDa) dibandingkan molekul antibodi, relatif mudah dan murah untuk dipurifikasi, dan stabil secara enzimatik. Ini dapat dideteksi oleh sejumlah reaksi sitokimia yang berbeda dan menghasilkan produk reaksi yang tidak larut dengan lokasi yang berbatas tegas, tetapi substrat yang paling sering digunakan mengandung *diaminobenzidine* (DAB) dan hidrogen peroksida. Pewarnaan sediaan tergantung dari substrat yang digunakan. Imunoperoxidase umumnya 3,3 *Diaminobenzidine* (DAB). DAB merupakan bahan yang karsinogenik, yang bila diberi enzim peroksidase, substrat tersebut berwarna coklat. Warna coklat tersebut yang dijadikan label untuk mengetahui adanya antigen yang diperiksa. Ada beberapa cara teknik pemeriksaan di antaranya :

2.1 Pewarnaan imunoperoxidase. Berdasarkan pada ikatan antigen dan antibodi, maka pemeriksaan ini dapat dibagi lagi menjadi dua, yaitu pewarnaan *imunoperoxidase* langsung dan pewarnaan *imunoperoxidase* tidak langsung.

2.2 Avidin Biotin Peroxidase Complex (ABC). Pada teknik pewarnaan *Avidin Biotin Peroxidase Complex* memerlukan antibodi yang di label dengan biotin, sebagai antibodi primer pada teknik langsung, dan sebagai antibodi sekunder pada metode tidak langsung. Antibodi yang di label dengan biotin ini akan tampak melalui tiga cara yaitu diberi label dengan avidin, bersama penampilan avidin sebagai *a bridge with biotinylated enzyme*, bersama *avidin-biotin peroxidase complex* (ABC).

Pemeriksaan dengan teknik avidin biotin berdasar pada empat prinsip utama, yaitu : Afinitas yang luar biasa antara molekul avidin dan biotin yang berikatan satu

dengan yang lainnya sedemikian erat sebagai ikatan kompleks yang permanen. Reaksi antara avidin dan biotin merupakan ikatan nonkovalen yang merupakan ikatan yang sangat cepat dan kuat, kemungkinan pelabelan biotin pada molekul besar, seperti enzim antibodi melalui reaksi kimia tunggal, kemungkinan pelabelan avidin pada berbagai petanda seperti enzim, metal berat dan fluochrom, kemungkinan penggunaan avidin sebagai jembatan antara dua molekul berlabel biotin yang berbeda, seperti antibodi dan peroksidase (Umayah, 1999; Putra, 1993; Tjahyono, 2000; DP Stites, 1997).

H. Tikus Putih

Sistematika Tikus Putih jantan galur Wistar (Sharp, 1998).

Regnum : Animalia
Filum : Chordata
Kelas : Mammalia
Ordo : Rodentia
Famili : Muridae
Subfamili : Murinae
Genus : Rattus
Spesies : *Rattus norvegicus* L.

Rattus norvegicus merupakan salah satu spesies tikus yang paling sering digunakan dalam penelitian karena beberapa kelebihan antara lain mudah dipelihara dalam populasi yang besar dapat berkembang biak dengan pesat, dan memiliki ukuran yang lebih besar dari mencit sehingga untuk beberapa percobaan tikus lebih

menguntungkan. Tikus juga memperlihatkan masa hamil yang singkat (21-31 hari), jumlah anak yang cukup banyak (6-12 ekor), dan dapat hidup sampai 4 tahun.

Seekor tikus dewasa membutuhkan 15 g makanan dan 20-45 ml air per 100 g berat badan per hari. Suhu kandang yang dibutuhkan tikus 18-27°C dan kelembaban relatif 40-70%. Terdapat berbagai galur tikus putih antara lain : Long-Evans, Sprague-Dawley, dan Wistar. Tikus putih (*Rattus norvegicus* L) galur Wistar mempunyai ciri-ciri : warna tubuh putih, mata berwarna merah, ukuran kepala dan ekor lebih pendek dari badannya; galur Sprague-Dawley mempunyai ciri-ciri : warna tubuh putih, mata berwarna merah, ukuran kepala yang kecil, dan ekor lebih panjang dari badannya, sedangkan galur Long-Evans ditandai dengan warna hitam di bagian kepala, dan tubuh bagian depan (Malole, 1989)

I. Ekstrak, Simplisia dan Ekstraksi

1. Definisi

Ekstrak merupakan sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai (Depkes RI, 2000). Simplisia merupakan bahan yang digunakan untuk obat dan belum mengalami perubahan proses apapun, dan kecuali dinyatakan lain umumnya berupa bahan yang telah dikeringkan. Berdasarkan hal itu maka simplisia dibagi menjadi tiga golongan, yaitu simplisia nabati, hewani, dan pelikan/mineral (Gunawan, 2004). Simplisia nabati ditemukan berupa tanaman utuh bagian tanaman, eksudat tanaman, atau gabungan antara ketiganya. Simplisia hewani ditemukan berupa hewan utuh atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan

belum berupa bahan kimia murni. Simplisia pelikan (mineral) ditemukan berupa bahan pelikan atau mineral yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa bahan kimia murni.

Ekstrak dikelompokkan atas dasar sifatnya, ekstrak encer merupakan sediaan yang memiliki konsistensi semacam madu dan dapat dituang. Ekstrak kental merupakan sediaan yang liat dalam keadaan dingin dan tidak dapat dituang. Kandungan airnya berjumlah sampai 30%. Tingginya kandungan air menyebabkan ketidakstabilan sediaan obat karena cemaran bakteri. Ekstrak kering merupakan sediaan yang memiliki konsistensi kering dan mudah dituang, sebaiknya memiliki kandungan lembab tidak lebih dari 5%. Ekstrak cair merupakan ekstrak yang dibuat sedemikianya sehingga 1 bagian simplisia sesuai dengan 2 bagian ekstrak cair (Voight, 1995).

Ekstraksi merupakan kegiatan penarikan kandungan kimia yang terdapat pada simplisia. Karena di dalam simplisia mengandung senyawa aktif yang berbeda-beda dan mempunyai struktur kimia yang berbeda-beda, sehingga metode di dalam penarikan senyawa aktif di dalam simplisia harus memperhatikan faktor seperti udara, suhu, cahaya, logam berat. Proses ekstraksi dapat melalui tahap pembuatan serbuk, pembasahan, penyarian, dan pemekatan (Depkes RI, 2000).

2. Metode ekstraksi

2.1 Ekstraksi Dingin. Maserasi dilakukan dengan cara memasukkan 10 bagian simplisia dengan derajat yang cocok ke dalam wadah, kemudian dituang dengan penyari 75 bagian, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari, terlindung dari cahaya sambil diaduk sekali-kali setiap hari lalu diperas dan ampasnya di maserasi

kembali dengan cairan penyari. Penyarian diakhiri setelah pelarut tidak berwarna lagi, lalu dipindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan pada tempat yang tidak bercahaya setelah dua hari endapan dipisahkan. Perkolasi adalah cara penyarian yang dilakukan dengan cara dibasahkan 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok, menggunakan 2,5 bagian sampai 5 bagian cairan penyari dimasukkan dalam bejana tertutup sekurang-kurangnya 3 jam. Massa dipindahkan sedikit demi sedikit ke dalam perkolator, ditambahkan cairan penyari. Perkolator ditutup dibiarkan selama 24 jam, kemudian kran dibuka dengan kecepatan 1 ml permenit, sehingga simplisia tetap terendam. Filtrat dipindahkan ke dalam bejana, ditutup dan dibiarkan selama 2 hari pada tempat terlindung dari cahaya (Harborne, 1987).

2.2 Ekstraksi Panas. Refluks dilakukan dengan cara dimana bahan yang akan diekstraksi direndam dengan cairan penyari dalam labu alas bulat yang dilengkapi dengan alat pendingin tegak, lalu dipanaskan sampai mendidih. Cairan penyari akan menguap, uap tersebut akan diembunkan dengan pendingin tegak dan akan kembali menyari zat aktif dalam simplisia tersebut, demikian seterusnya. Ekstraksi ini biasanya dilakukan 3 kali dan setiap kali diekstraksi selama 4 jam. Soxhletasi dilakukan dengan cara cairan penyari dipanaskan sampai mendidih. Uap penyari akan naik melalui pipa samping, kemudian diembunkan lagi oleh pendingin tegak. Cairan penyari turun untuk menyari zat aktif dalam simplisia. Cairan penyari mencapai sifon, maka seluruh cairan akan turun ke labu alas bulat dan terjadi proses sirkulasi sampai zat aktif dalam simplisia tersari seluruhnya dengan ditandai jernihnya cairan yang lewat pada tabung sifon (Harborne, 1987).

Digesti adalah maserasi dengan pengadukan kontinu pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan yaitu pada temperatur 40-50°C. Dekok adalah

infus pada waktu yang lebih lama selama 30 menit dengan suhu $\geq 30^{\circ}\text{C}$ dan temperatur sampai titik didih air. Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air mendidih, temperatur terukur $96-98^{\circ}\text{C}$ selama waktu tertentu (15-20 menit). Penyulingan uap air dapat dilakukan dengan menyari serbuk simplisia yang mengandung komponen kimia yang mempunyai titik didih tinggi pada tekanan udara normal karena pada pemanasan biasanya terjadi kerusakan zat aktif. Mencegah hal ini maka penyari dilakukan dengan penyulingan (Depkes RI, 2000).

3 Pelarut

Pelarut merupakan cairan yang digunakan untuk ekstraksi. Pemilihan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi dari bahan obat tertentu berdasarkan daya larut yang aktif, zat yang tidak aktif serta zat yang tidak diinginkan tergantung preparat yang digunakan (Ansel, 1989). Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kumarin, flavonoid, antrakuinon, steroid, dan klorofil, lemak, tanin, dan saponin hanya sedikit larut. Etanol digunakan sebagai cairan penyari karena lebih selektif, netral, tidak beracun, absorpsinya baik, etanol 20% ke atas tidak mudah tumbuh kapang dan jamur, etanol dapat bercampur dengan air, panas yang diperlukan lebih sedikit (Depkes RI, 1986).

J. Landasan Teori

Diabetes melitus merupakan penyakit kronis yang terjadi ketika pankreas tidak memproduksi insulin dengan cukup atau ketika tubuh tidak dapat secara efektif menggunakan insulin yang dihasilkan. Insulin merupakan hormon yang

mengatur kadar gula darah (WHO, 2009). Pankreas merupakan organ pada sistem pencernaan. Pulau Langerhans terdiri dari sel α berfungsi mensekresi hormon glukagon, sel β berfungsi mensekresi hormon insulin, sel δ berfungsi mensekresi hormon somatostatin, dan sel F atau PP berfungsi mensekresi polipeptida (Kitabchi, 2009).

Kelebihan glukosa akan diubah menjadi glikogen yang akan disimpan di dalam hati dan otot dan digunakan bila diperlukan. Jika kadarnya masuk berlebih akan diubah menjadi lemak di hati kemudian dibawa ke sel-sel lemak (Almatsier, 2001). Glukosa dalam darah dibentuk melalui proses pencernaan, glukoneogenesis, dan glikogenolisis. Glukoneogenesis adalah proses pembentukan glukosa dari zat non karbohidrat, yaitu beberapa asam amino, laktat, gliserol (produk katabolisme gliserol), dan piruvat. Glikogeneolisis adalah proses pencernaan glikogen menjadi glukosa (Gropper *et al*, 2005).

Di masyarakat dikenal banyak tumbuhan yang berkhasiat sebagai obat tradisional untuk mengobati DM, di antaranya adalah daun sirih merah dan buah mahkota dewa. Metode penyarian yang digunakan adalah ekstraksi secara dingin yaitu maserasi. Pelarut yang digunakan yaitu etanol 96%. Ekstrak etanol dipekatkan menggunakan evaporator untuk mendapatkan ekstrak kental. Ekstrak pekat yang diperoleh dibuat dalam bentuk sediaan uji yaitu konsentrasi dalam ekstrak kombinasi. Dosis intraperitoneal digunakan untuk menginduksi DM tipe 2 adalah 65 mg/kg BB streptozotosin dan 230 mg/kg BB nikotinamid pada tikus yang berumur 2-3 bulan. Kombinasi ekstrak daun sirih merah dan buah mahkota dewa dosis 50 mg/kg BB : 100 mg/kg BB dan 100 mg/kg BB : 200 mg/kg BB. Sebagai

pembandingan dalam menurunkan kadar glukosa darah digunakan glibenklamid. Dosis diperoleh berdasarkan penelitian sebelumnya, dosis digunakan untuk pengujian aktivitas antidiabetes dengan metode enzimatik (GOD-PAP) dan metode diabetes induksi streptozotosin-nikotinamid. Metode diabetes induksi streptozotosin-nikotinamid dilakukan terhadap tikus putih untuk menguji aktivitas kombinasi dosis sediaan uji dalam menurunkan kadar glukosa darah.

Kadar glukosa ditentukan secara enzimatik, misalnya dengan glukosa oksidase suatu enzim bakteri yang merangsang oksidasi dengan menghasilkan H_2O_2 . Dengan adanya enzim peroksidase oksigen dari peroksid ini dialihkan ke *acceptor* tertentu menghasilkan suatu ikatan berwarna (Pusdiknakes, 1985). Streptozotosin secara selektif terakumulasi di dalam sel β pankreas melalui transporter glukosa GLUT2 yang infinitasnya rendah, yang ada di dalam membran darah (Lenzen, 2008). Dalam sel β , GLUT-2 berperan dalam mekanisme penginderaan glukosa, sementara dalam hati dinyatakan pada membran sinusoidal hepatosit dan memungkinkan transportasi glukosa secara dua arah di bawah kendali hormon (Wood dan Trayhum, 2003). Induksi streptozotosin akan menyebabkan degradasi pulau langerhans di sel β pankreas (Abeeleh *et al.*, 2009). Dengan menipisnya energi yang disimpan pada sel menyebabkan kematian pada sel β , sehingga menghambat sintesis proinsulin dan menginduksi terjadinya keadaan hiperglikemia. Sitotoksitas induksi streptozotosin dapat diringankan dengan nikotinamid, komponen nikotinamida adenin dinukleotida (NAD) akan menghambat aktivitas sintesis poli (ADP-ribosa) dan mencegah penipisan NAD di sel β pankreas (Tahara, 2014).

Penelitian dilakukan untuk menguji aktivitas kombinasi dari kedua tumbuhan terhadap penurunan kadar glukosa darah tikus dan aktivitas glukosa transporter (GLUT-2) di sel β pankreas dan jaringan hati tikus putih. Dilakukan dengan analisis metode imunohistokimia menggunakan antiGLUT-2 sebagai antibodi. Pengamatan aktivitas GLUT-2 ditandai dengan peningkatan aktivitas GLUT-2 di sel β pankreas dan penurunan aktivitas GLUT-2 di jaringan hati.

K. Hipotesis

1. Kombinasi ekstrak etanol daun sirih merah dan ekstrak etanol buah mahkota dewa mempunyai aktivitas antidiabetes pada tikus diinduksi streptozotosin-nikotinamid.
2. Kombinasi ekstrak etanol daun sirih merah dan ekstrak etanol buah mahkota dewa mempunyai aktivitas meningkatkan dan menurunkan jumlah GLUT-2 di sel β pankreas dan di jaringan hati pada tikus yang diinduksi streptozotosin-nikotinamid.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah keseluruhan objek penelitian atau objek yang diteliti (Notoatmojo, 2002). Populasi pada penelitian ini adalah daun sirih merah dan buah mahkota dewa dari kelompok Tani ngudi mulyo Pengembangan dan Budidaya Tanaman Obat, Jawa Tengah di Kecamatan Tempuran, Kabupaten Magelang pada bulan April 2015.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang dianggap mewakili seluruh populasi dalam penelitian (Notoatmojo, 2002). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih merah dan buah mahkota dewa yang diperoleh dari Jawa Tengah di Kecamatan Tempuran, Kabupaten Magelang pada bulan April 2015.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah aktivitas kombinasi ekstrak etanol daun sirih merah dan ekstrak etanol buah mahkota dewa.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah kadar glukosa darah tikus putih jantan galur wistar (*Rattus novergicus*) dan jumlah protein GLUT-2 di sel β

pankreas pulau Langerhans dan jaringan hati tikus dengan berbagai kelompok uji.

2. Klasifikasi Operasional Variabel Utama

Variabel utama dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah aktivitas kombinasi ekstrak etanol daun sirih merah dan ekstrak etanol buah mahkota dewa.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian, variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar glukosa darah dan jumlah protein GLUT-2 di sel β pankreas pulau Langerhans dan jaringan hati tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*).

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung selain variabel bebas, yaitu kondisi pengukur atau peneliti, laboratorium dan kondisi fisik dari hewan uji yang meliputi berat badan, usia, lingkungan tempat hidup, jenis kelamin, dan galur, antibodi antiGLUT-2, suhu inkubasi, lama perlakuan, reaksi enzimatik dan instrumentasi.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun sirih merah dan buah mahkota dewa diperoleh dari Kelompok Tani Ngudi Mulyo Pengembangan dan Budidaya Tanaman Obat, Jawa Tengah di Kecamatan Tempuran, Kabupaten Magelang.

Kedua, serbuk daun sirih merah dan buah mahkota dewa yang dikeringkan, kemudian di giling di mesin penggiling sampai menjadi serbuk dan

diayak dengan ayakan No. 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun sirih merah dan buah mahkota dewa adalah ekstrak yang dihasilkan dari metode ekstraksi maserasi menggunakan etanol 96% sebagai cairan penyari lalu dipekatkan di evaporator hingga diperoleh ekstrak kental.

Keempat, hewan uji dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang berumur 6-8 minggu dengan berat badan kurang lebih 200 g.

Kelima, kadar glukosa darah adalah dari kadar glukosa darah tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang ditentukan dengan menggunakan metode enzimatik.

Keenam, jumlah GLUT-2 di sel β pankreas dan hati tikus yang teramati pada preparat imunohistokimia melalui pengamatan di mikroskop.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah wadah maserasi, *beaker glass*, kain flannel, ayakan mesh 40, aluminium foil, corong gelas, oven, kolorimeter, labu takar 50 ml, pipet hematokrit, batang pengaduk, alat bedah, *lancet*, alat timbang, *Sterling-Bidwell*, mikroskop olympus CX-21, mikrotom, *Inverted microscope*, evaporator, pinset, pipet tetes, kertas timbang, kertas saring, vial, kandang tikus, cutter, spuit, jarum suntik dan alat gelas.

2. Bahan

Bahan uji yang digunakan adalah daun sirih merah dan buah mahkota dewa yang diperoleh dari Jawa Tengah di Kecamatan Tempuran, Kabupaten Magelang yang telah dinyatakan bebas dari hama dan telah melalui prosedur pemanenan yang tepat, menggunakan bahan penyari yaitu etanol 96, 90, dan 70%, silika gel 60 F254, heksan, aquadest, etil asetat, asam formiat, quarsetin, quinin, saponin, asam galat, dietilamin, kloroform, metanol, serbuk Mg, amil alkohol, glibenklamid, streptozotisin, nikotinamid, *reagen Liberman Bouchard*, *reagen Dragendroff*, *reagen Glucose Oksidase Phenol Aminoantipyrine*, toluene, sitroborat, reaksi FeCl₃, normal saline 0,9%, kloroform, asam sulfat pekat, aluminium klorida, asam klorida, Na-CMC, buffer sitrat, formalin, larutan *phospat buffer saline* (PBS), *dakopen*, *diaminobenzin* (DAB), pelarut *xylene*, alkohol absolut, antibodi antiGLUT-2, antibodi sekunder.

3. Hewan Percobaan

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) sebanyak 25 ekor yang berumur 6-8 minggu dengan bobot badan berkisar antara 169-200 g. Hewan percobaan secara acak dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok berjumlah 5 ekor tikus.

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi Tanaman

Tahap awal penelitian ini mencakup pengadaan dan penyiapan bahan uji kemudian melakukan determinasi untuk menetapkan kebenaran bahan uji sehingga

dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan adalah sampel daun sirih merah dan buah mahkota dewa dan dibuktikan di unit Laboratorium Farmakognosi, Bagian Biologi Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

2. Pembuatan Serbuk Daun Sirih Merah dan Buah Mahkota Dewa

Pengelolaan bahan mencakup sortasi basah, pencucian, pengecilan ukuran, pengeringan dan sortasi kering. Setelah tahap sortasi kering simplisia digiling dengan mesin penggiling dan diayak dengan ayakan mesh 40, kemudian disimpan dalam tempat kering dan tertutup rapat.

3. Pembuatan Ekstrak Etanol Sirih Merah dan Buah Mahkota Dewa

Daun sirih merah dan buah mahkota dewa kering yang telah diserbukkan secara terpisah masing-masing ditimbang sebanyak 1 kg kemudian dimasukan dalam wadah maserasi, ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 10 L. Wadah tersebut diaduk dan ditutup segera, kemudian disimpan dalam ruangan yang terhindar dari sinar matahari, didiamkan selama 3-5 hari dan sesekali digojog. Setelah 3-5 hari maserat disaring dengan kain flanel, filtrat hasil maserasi kemudian di tampung dalam bejana tertutup dan di pekatkan dengan menggunakan evaporator.

4. Pengujian Kromatografi Lapis Tipis

4.1 Identifikasi Flavonoid. Fase diam yang digunakan yaitu silika gel 60 F254 dan fase gerak yang digunakan yaitu heksan : etilasetat : asamformiat (6:4:0,2). Perbandingan yang digunakan adalah kuarsetin sebanyak 10 mg/1 ml etanol. Penampakan noda dapat dilihat di UV 254 nm, 366 nm dan deteksi sinar tampak menggunakan sitroborat.

4.2 Identifikasi Saponin. Fase diam yang digunakan yaitu silika gel 60 F254 dan fase gerak yang digunakan yaitu kloroform: metanol : air (64:50:1). Perbandingan yang digunakan adalah saponin 10 mg/1 ml etanol. Penampakan noda dapat dilihat di UV 254 nm, 366 nm dan deteksi sinar tampak menggunakan reagen *Liberman Bouchard*.

4.3 Identifikasi Alkaloid. Fase diam yang digunakan yaitu silika gel 60 F254 dan fase gerak yang digunakan yaitu toluen : etilasetat : dietilamin (7:2:1). Perbandingan yang digunakan adalah quinin 10 mg/1 ml etanol. Penampakan noda dapat dilihat di UV 254 nm, 366 nm dan deteksi sinar tampak menggunakan reagen *Dragendorff*.

4.4 Identifikasi Tanin. Fase diam yang digunakan yaitu silika gel 60 F254 dan fase gerak yang digunakan yaitu etilasetat : asam formiat : toluene : air (6:1,5:3:0,5). Perbandingan yang digunakan adalah asam galat 10 mg/1 ml etanol. Penampakan noda dapat dilihat di UV 254 nm, 366 nm dan deteksi sinar tampak menggunakan reaksi FeCl_3 .

5. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Larutan uji untuk ekstrak ditimbang seksama kurang lebih 0.2 gram ekstrak, masukkan ke dalam labu erlenmeyer. Tambahkan 25 mL etanol p.a., diaduk selama 30 menit dengan pengaduk magnetik. Saring ke dalam labu terukur 25 mL. Tambahkan etanol p.a. melalui penyaring sampai tanda. Larutan perbandingan ditimbang seksama kurang lebih 10 mg perbandingan, dimasukkan ke dalam labu terukur 25 mL. Dilarutkan dan ditambahkan etanol p.a. sampai tanda. Dibuat pengenceran secara kuantitatif jika perlu bertahap hingga kadar 25, 50, 75 dan 100 $\mu\text{g/mL}$. Pengukuran pipet secara terpisah 0.5 mL larutan uji dan enceran larutan

pembanding, tambahkan pada masing-masing 1.5 mL etanol p.a., 0.1 mL aluminium klorida 10%, 0.1 mL natrium asetat 1M dan 2.8 mL air suling. Dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Diukur serapan pada panjang gelombang 415 nm. Dilakukan pengukuran blangko dengan cara yang sama, tanpa penambahan aluminium klorida. Dibuat kurva kalibrasi dan hitung kadar larutan uji dengan menggunakan kurva regresi linear pembanding.

6. Pembuatan Larutan Streptozotisin-Nikotinamid

Perhitungan dosis STZ 55 mg/kgBB dan dosis NA 110 mg/kgBB terhadap tikus putih dengan kisaran berat antara 169-204 g yang telah dipuasakan semalam. Preparasi STZ (sigma Aldrich) dilarutkan dalam buffer sitrat 0,1 M pH 4,5 dan NA dilarutkan dalam normal saline 0,9%.

7. Pembuatan Suspensi Na CMC 1%

Larutan koloid Na-CMC 1% dibuat dengan melarutkan 1 g Na-CMC sedikit demi sedikit ke dalam 50 ml air suling panas sambil diaduk hingga homogen. Volume dicukupkan hingga 100 ml dengan air suling.

8. Penentuan Dosis Pembanding

Dosis Glibenkamid dihitung dari dosis lazim yang dikonversikan ke dalam tikus. Faktor konversi manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus untuk berat badan 200 g adalah 0,018.

Dosis terapi glibenkamid untuk manusia yaitu 5 mg/kg BB, sehingga dikonversikan ke berat badan tikus 200 g adalah $5 \times 0,018 = 0,00045$ g (0,45 mg/KgBB). Tablet Glibenklamid digerus dan dimasukkan ke dalam lumpang dan ditambahkan larutan koloid Na-CMC 1% b/v sedikit demi sedikit sambil digerus

sampai homogen, dimasukkan dalam labu ukur 100 ml kemudian dicukupkan volumenya dengan larutan koloid Na-CMC 1%.

9. Pengujian Efek Antidiabetes

Pengerjaan pengujian efek antidiabetes dilakukan di Pasca Antar Universitas (PAU), Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Pengujian pada tikus dibagi atas 3 kelompok perlakuan kontrol dan 2 kelompok perlakuan dosis ekstrak. Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor tikus. Tikus diaklimasi selama 1 minggu, sebelum perlakuan selama 8 jam kelompok perlakuan tidak diberi makan namun tetap diberi minum. Berat badan ditimbang dan diukur kadar glukosa darah puasa pada hari ke-1 sebagai kadar glukosa darah awal dengan menggunakan pereaksi GOD-PAP. Streptozotisin diinjeksikan sekali sebanyak 55 mg/kgBB, namun 15 menit sebelumnya terlebih dahulu diinjeksikan nikotinamid 110 mg/kg BB secara intraperitoneal pada hari ke-1. Setelah lima hari (pada hari ke-5), kadar glukosa darah dan berat badan tikus kembali diukur. Adapun perlakuan yang diberikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengelompokan hewan percobaan

Kelompok	Jumlah tikus (ekor)	Perlakuan
I (Kontrol normal)	5	Larutan suspensi Na-CMC 1%
II (Kontrol positif)	5	Tikus diinduksi STZ 55 mg/kg BB-NA 110 mg/kg BB (I.P), diberi Glibenklamid 0,45 mg/kg BB tikus(P.O)
III (Kontrol negatif)	5	Tikus diinduksi STZ 55 mg/kg BB-NA 110 mg/kg BB (I.P), diberi Na-CMC 1% (P.O)
IV (Kombinasi I)	5	Tikus diinduksi STZ 55 mg/kg BB-NA 110 mg/kg BB (I.P),diberi Kombinasi ekstrak etanol daun sirih merah 50 mg/kg BB-ekstrak etanol daging buah mahkota dewa 100 mg/kg BB (P.O)
V (Kombinasi II)	5	Tikus diinduksi STZ 55 mg/kg BB-NA 110 mg/kg BB (I.P), diberi Kombinasi ekstrak etanol daun sirih merah 100 mg/kg BB-ekstrak etanol buah mahkota dewa 200 mg/kg BB (P.O)

Tikus yang mempunyai kadar glukosa darah tinggi (Hiperglikemik) digunakan dalam penelitian. Selanjutnya pada kelompok II sampai V diberikan perlakuan terapi berupa Na-CMC, Glibenklamid, dan sediaan kombinasi ekstrak etanol daun sirih merah dan buah mahkota dewa selama 14 hari dengan durasi pemberian sekali sehari. Selanjutnya pengukuran kadar glukosa darah diukur pada hari ke-12 (T_1) dan hari ke-19 (T_2) setelah perlakuan induksi STZ-NA. Setiap kali melakukan pengambilan darah, tikus terlebih dahulu dipuasakan selama 8 jam. Tikus selanjutnya dibedah dan dilakukan pengamatan secara imunohistokimia untuk mengamati jumlah protein GLUT-2 di sel β pankreas dan jaringan hati dengan menggunakan antibodi antiGLUT-2.

10. Analisa Kadar Glukosa Darah Tikus

Pengambilan darah dilakukan melalui vena retroorbital dengan pipet hematokrit. Untuk pengukuran kadar glukosa darah dengan GOD-PAP menggunakan metode enzimatik yang umumnya menggunakan kerja enzim *glucose oksidase* atau *heksokinase* yang bereaksi dengan glukosa, tetapi tidak pada gula lain seperti fruktosa, galaktosa dan pada bahan pereduksi.

Prinsip kerjanya adalah glukosa dioksidasi oleh enzim *glukooksidase* (GOD) menghasilkan asam glukonat dan H_2O_2 . Selanjutnya H_2O_2 direaksikan dengan 4-aminoantipirin dan fenol dengan bantuan enzim peroksida menghasilkan chinonime yang berwarna kemerahan dan H_2O_2 , reaksi ini dikatalisis oleh enzim *peroksidase* (POD). Chinonimine yang terbentuk ekuivalen dengan glukosa sehingga warna yang terukur pada produk chinonimine akan sebanding dengan kadar glukosa.

Cara pengambilan darah melalui sinus orbita mata. Gula darah puasa yang diambil lewat mata dimasukkan ke dalam wadah lalu disentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit, terbentuk dua lapisan serum dan plasma sel darah merah. Lapisan serum dipipet 10 μ l, dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan reagen kit sebanyak 1000 μ l, dikocok lalu diinkubasi selama 20 menit pada suhu 20-25°C kemudian warna yang terbentuk dibaca dengan kolorimeter pada panjang gelombang 500 nm. Larutan blanko digunakan sebagai titik nol dengan rumus :

$$\text{Kadar Glukosa (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi standar}} \times \text{konsentrasi standar (100 mg/dL)}$$

11. Preparasi dan Pewarnaan di Sel β Pankreas dan Jaringan Hati Tikus

Pengerjaan imunohistokimia, fotomikroskopi dan kuantifikasi dilakukan di Laboratorium Histologi dan Biologi Sel, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Adapun prosedur *Immunohistochemistry* (IHC), fotomikroskopi dan kuantifikasi protein GLUT-2 dilakukan dengan empat tahapan yaitu (1) preparasi *slide* sampel sel β pankreas dan jaringan hati tikus, (2) melihat struktur anatomi sel yang akan diamati, (3) optimasi pengenceran dan *operating time* antibodi antiGLUT-2, dan (4) *Immunohistochemistry* (IHC) terhadap sampel, fotomikroskopi dan kuantifikasi protein GLUT-2.

E. Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini merupakan data yang bersifat kuantitatif dan semi kuantitatif. Data kuantitatif berupa kadar glukosa darah sedangkan data semi kuantitatif berupa data hasil kuantifikasi luas dan intensitas daerah protein GLUT-2.

1. Data Kuantitatif

Nilai kadar glukosa darah dihitung persen daya penurunan (hipoglikemik).

Rumus yang digunakan adalah sebagai berikut :

$$\text{Daya hipoglikemik} = \frac{\text{Kadar glukosa Tawal} - \text{Kadar glukosa (T1 atau t2)}}{\text{Kadar glukosa Tawal} - \text{kadar glukosa T0}} \times 100\%$$

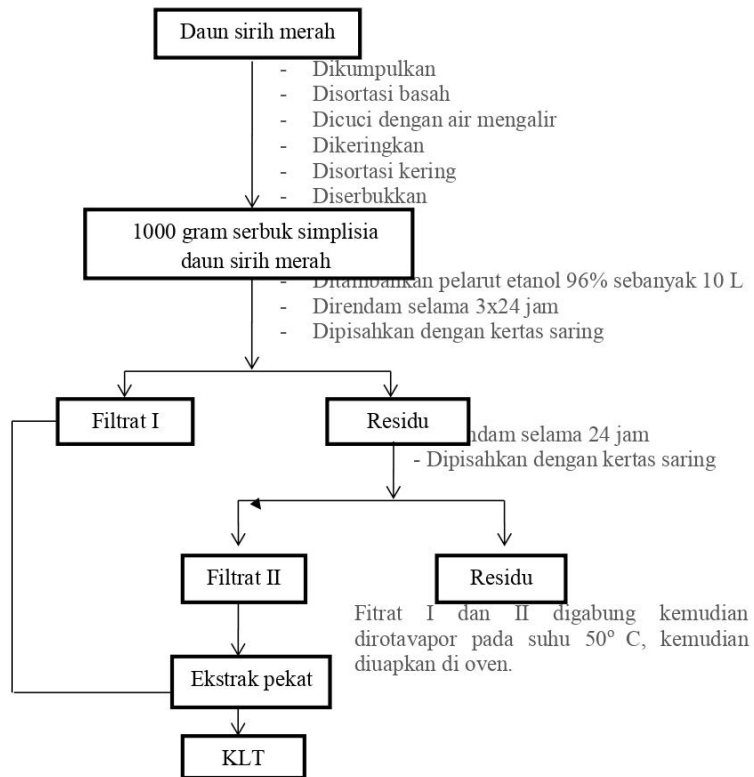
Keterangan : Daya hipoglikemik dalam % ; Hari ke-0 (T₀); kadar glukosa darah tikus hari ke-0 sebelum perlakuan dengan induksi STZ-NA; hari ke-5 (T_{awal}) ; kadar glukosa tikus saat sudah mengalami DM; hari ke-12 dan 19 (T₁ dan T₂ ; kadar glukosa darah tikus setelah pemberian sediaan uji selama 14 hari.

Nilai % hipoglikemik tiap kelompok (n=5), kemudian dibuat rata-rata ± SEM dan disajikan dalam bentuk profil grafik. Hasil tersebut diuji secara statistik dengan menggunakan *one-way* ANOVA dengan taraf kepercayaan 95%.

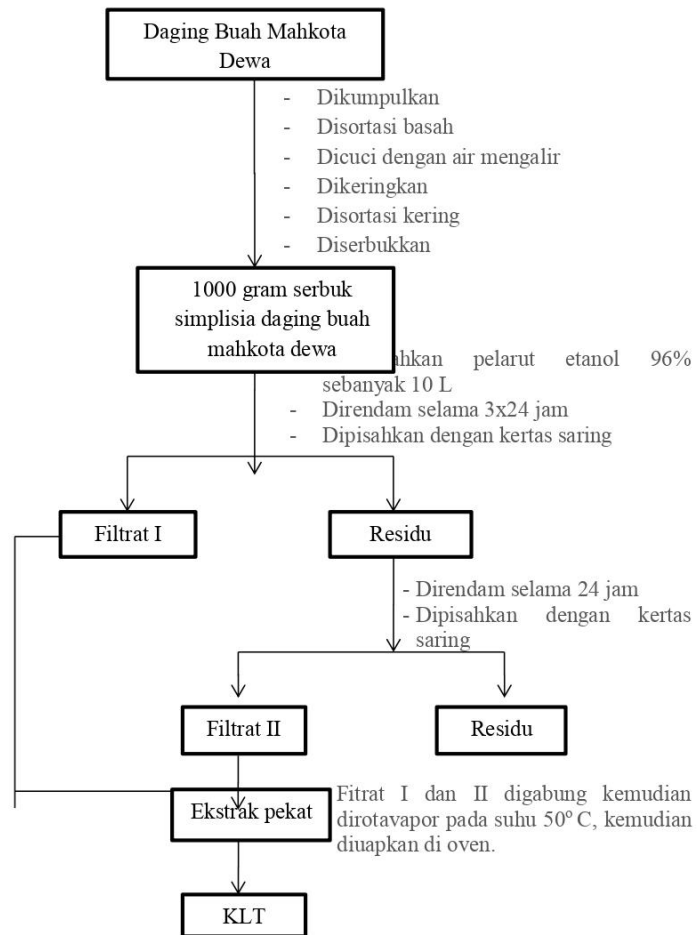
2. Data Semikuantitatif

Analisis data semikuantitatif meliputi jumlah GLUT2 di sel β pankreas dan jaringan hati. Hasil imunohistokimia preparat sel β pankreas dan jaringan hati menggunakan antibodi primer antiGLUT-2 yang akan menghasilkan warna, dan luas serta intensitasnya akan diukur untuk mengetahui banyaknya protein GLUT-2 yang bereaksi dengan antibodi antiGLUT2.

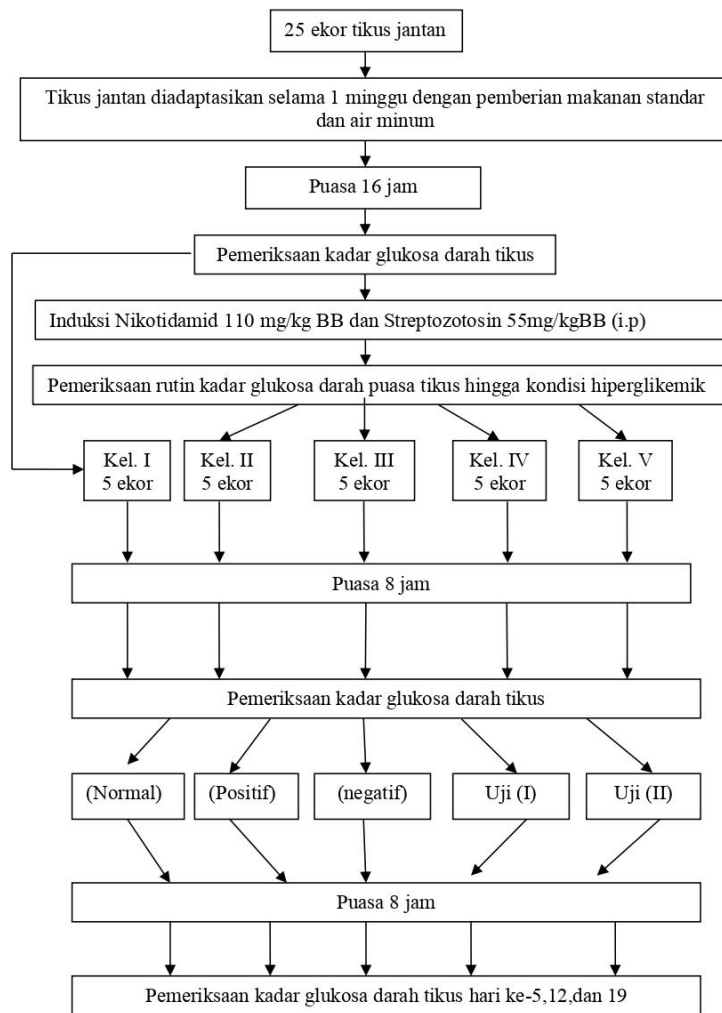
Pemeriksaan jumlah protein GLUT-2 dilakukan terhadap GLUT-2 dalam sel β pankreas dan jaringan hati tikus yang telah dilakukan pewarnaan secara imunohistokimia. Proses menentukan nilai luas dan intensitas protein GLUT-2 pada sel β pankreas dan jaringan hati tikus menggunakan bantuan program *MacBiophotonics Image J*. Data semikuantitatif yang diperoleh selanjutnya dilakukan perhitungan rata-rata untuk mendapatkan nilai dalam bentuk persentase.



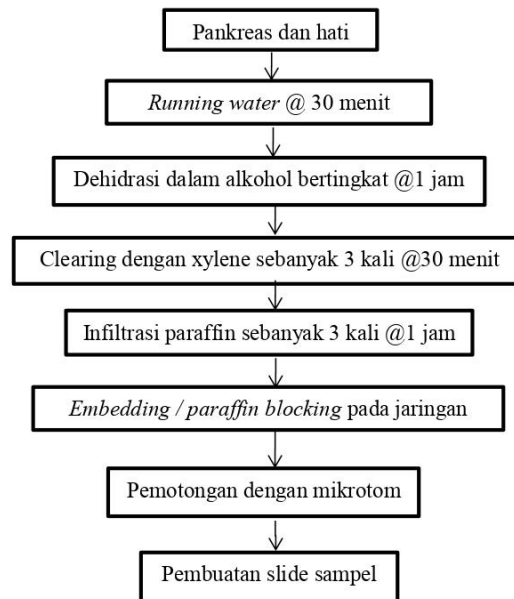
Gambar 7 Skema ekstraksi daun sirih merah



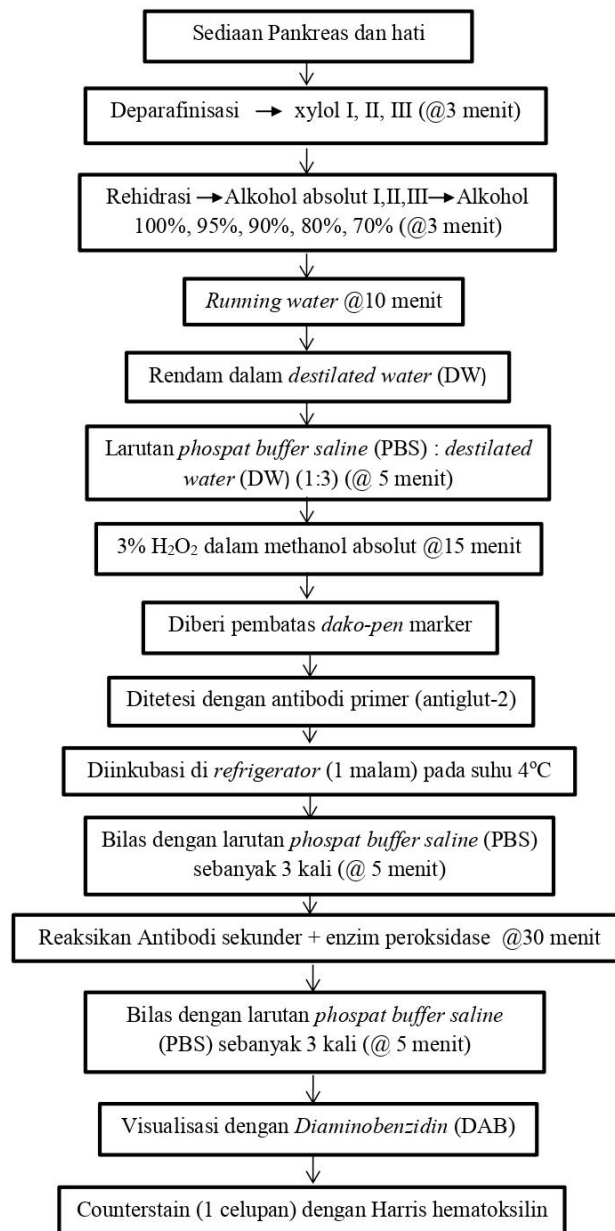
Gambar 8 Skema ekstraksi daging buah mahkota dewa

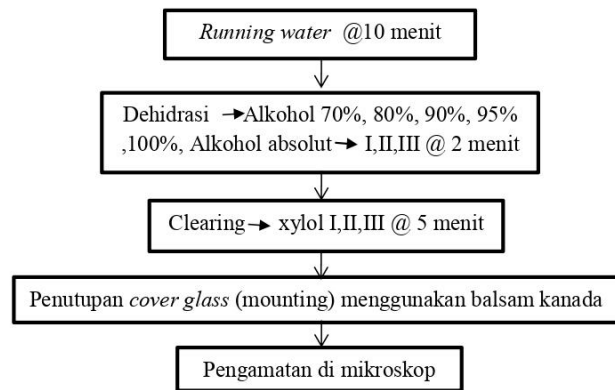


Gambar 9 Skema induksi dan pemberian sediaan



Gambar 10 Skema proses preparasi jaringan





Gambar 11 Skema proses imunohistokimia

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Identifikasi Daun Sirih Merah dan Buah Mahkota Dewa

Tanaman yang digunakan pada penelitian ini sebagai bahan uji berupa daun sirih merah dan buah mahkota dewa yang telah diidentifikasi di unit Laboratorium Biologi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Identifikasi bertujuan untuk mencocokkan ciri morfologis yang ada pada tanaman dan mengetahui kebenaran tanaman yang akan diteliti. Berdasarkan hasil identifikasi dapat dipastikan bahwa sampel yang digunakan oleh peneliti benar daun sirih merah dan buah mahkota dewa. Hasil identifikasi tersebut dapat dilihat pada Lampiran 1.

2. Pengambilan Bahan

Sampel daun sirih merah dan buah mahkota dewa diambil dari Jawa Tengah di Kecamatan Tempuran, Kabupaten Magelang. Kedua simplisia tersebut merupakan dua tanaman yang secara empiris digunakan oleh masyarakat untuk mengobati berbagai penyakit dan terbukti dari beberapa penelitian diketahui dapat digunakan sebagai antidiabetes. Pengambilan simplisia dinyatakan bebas dari hama dan telah melalui prosedur pemanenan yang tepat serta dalam kondisi yang baik.

3. Hasil Pembuatan Serbuk Daun Sirih Merah dan Buah Mahkota Dewa

Pada penelitian ini, pembuatan serbuk daun sirih merah dan buah mahkota dewa berawal dari berat masing-masing simplisia sebanyak 5 kg menghasilkan 1 kg serbuk halus daun sirih merah dan buah mahkota dewa. Serbuk simplisia yang diperoleh selanjutnya disimpan dalam wadah tertutup rapat. Hasil penetapan susut

pengeringan serbuk daun sirih merah dan serbuk buah mahkota dewa dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun sirih merah dan serbuk buah mahkota dewa

No	Penimbangan (g)	Susut pengeringan %	
		Daun Sirih Merah	Buah Mahkota Dewa
1.	2	5,0	7,0
2.	2	8,5	6,5
3.	2	4,0	6,0
Rata-rata		5,8±2,3	6,5±0,5

Hasil menunjukkan rata-rata susut pengeringan pada serbuk daun sirih merah adalah 5,8 % dan rata-rata susut pengeringan serbuk buah mahkota dewa adalah 6,5%. Hasil perhitungan susut pengeringan serbuk daun sirih merah dan serbuk buah mahkota dewa dapat dilihat pada Lampiran 6.

4. Hasil Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah dan Buah Mahkota Dewa

Pada penelitian ini, sediaan ekstrak pekat akan digunakan sebagai bahan uji yang akan diteliti sebagai antidiabetes. Metode ekstraksi yang digunakan untuk memperoleh ekstrak kental yaitu metode maserasi dan etanol 96% digunakan sebagai pelarut. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan evaporator pada suhu 50°C untuk menguapkan pelarut sehingga didapat ekstrak cair. Ekstrak pekat kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 50°C untuk memastikan bahwa bahan uji bebas dari kandungan etanol. Pengeringan dengan menggunakan oven dipilih karena suhu dan kecepatan proses pengeringan dapat diatur, tidak dipengaruhi oleh cuaca, sanitasi dan higienis dapat dikendalikan. Suhu yang digunakan yaitu 50°C, karena meminimalisir kerusakan komponen bioaktif yang terdapat pada ekstrak.

Pada penelitian ini metode maserasi digunakan untuk menghindari rusaknya atau hilangnya senyawa yang tidak tahan oleh panas. Kelebihan metode maserasi ini di antaranya relatif sederhana yaitu tidak memerlukan peralatan yang rumit, mudah dilakukan, dan murah. Kekurangan metode ini adalah penggunaan waktu yang relatif lebih lama yaitu 3-5 hari. Etanol 96% digunakan sebagai pelarut, karena etanol merupakan salah satu pelarut yang diperbolehkan untuk mengekstrak tumbuhan yang akan digunakan sebagai obat. Hasil rendemen ekstrak etanol daun sirih merah dan ekstrak etanol buah mahkota dewa dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil rendemen ekstrak daun sirih merah dan buah mahkota dewa

Bobot sampel (g)	Rendemen ekstrak %	
	Daun Sirih Merah	Buah Mahkota Dewa
750	4,180	3,763

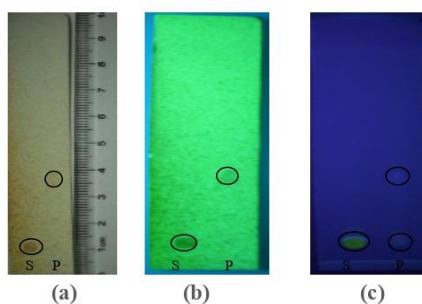
Hasil rendemen ekstrak etanol daun sirih merah yang diperoleh adalah 4,180 % dan rendemen ekstrak etanol buah mahkota dewa adalah 3,763%. Hasil perhitungan rendemen ekstrak etanol daun sirih merah dan ekstrak etanol buah mahkota dewa dapat dilihat pada Lampiran 7.

5. Hasil Identifikasi Kromatografi Lapis Tipis Daun Sirih Merah dan Buah Mahkota Dewa

Pada penelitian ini, kromatografi lapis tipis dipilih untuk mengidentifikasi keberadaan suatu senyawa metabolit sekunder dari ekstrak daun sirih merah dan ekstrak buah mahkota dewa, dimana senyawa tersebut diharapkan dapat berperan sebagai antidiabetes. Adsorben yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄.

5.1 Profil kromatografi lapis tipis buah mahkota dewa. Proses identifikasi menggunakan KLT dengan pelarut pengembang yang digunakan toluen : etil asetat: dietilamin (7:2:1). Tujuan dipilihnya tiga pelarut tersebut karena masing-masing

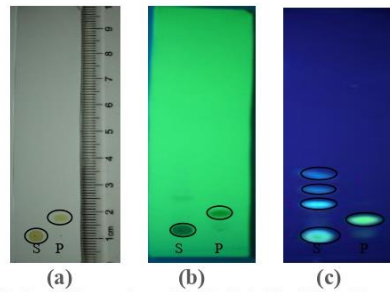
pelarut memiliki kepolaran yang berbeda sehingga senyawa-senyawa dengan kepolaran yang berbeda diharapkan dapat terpisahkan dengan eluen tersebut. Identifikasi alkaloid dilakukan dengan pembandingan kuinin karena senyawa ini merupakan golongan dari alkaloid. Hasil dilihat setelah plat disemprot dengan pereaksi dragendrof untuk menampakkan bercak atau noda. Bercak berwarna hijau muda dapat dilihat di sinar UV 366 pada Gambar 12. Bercak berwarna hijau muda ini menandakan adanya senyawa golongan alkaloid pada buah mahkota dewa.



Gambar 12 Profil kromatografi lapis tipis identifikasi alkaloid

Keterangan : (a) alkaloid di bawah sinar tampak. (b) alkaloid di bawah uv 254. (c) alkaloid di bawah uv 366. Fasediam : Silika Gel 60 F₂₅₄. Fase gerak: Toluene : etilasetat : dietilamin (7:2:1). Pembandingan: kuinin 10 mg/1ml etanol. Deteksi: Dragendorff

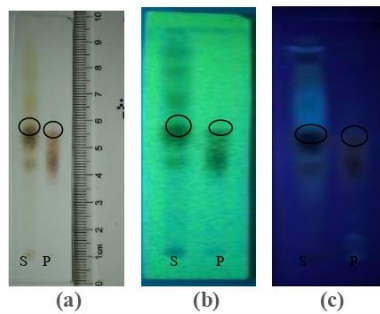
Pelarut pengembang yang digunakan heksan: etil asetat: asam formiat (6:4:0,2). Identifikasi flavonoid dilakukan dengan pembandingan kuarsetin karena senyawa ini merupakan golongan dari flavonoid. Hasil dilihat setelah plat disemprot dengan pereaksi sitroborat untuk menampakkan bercak atau noda. Bercak atau noda warna kuning-kehijauan dapat dilihat di sinar UV 366 pada Gambar 13. Bercak berwarna kuning ini menandakan adanya senyawa golongan flavonoid pada buah mahkota dewa namun jenis flavonoid pada ekstrak diperkirakan berbeda dengan kuarsetin.



Gambar 13. Profil kromatografi lapis tipis identifikasi flavonoid

Keterangan : (a) flavonoid di bawah sinar tampak. (b) flavonoid di uv 254. (c) flavonoid di uv 366. Fase diam : Silika Gel 60 F₂₅₄. Fase gerak:heksan:etil asetat:asam formiat (6:4:0,2). Perbandingan: kuarsetin 10 mg/1 ml etanol. Deteksi : Sitroborat

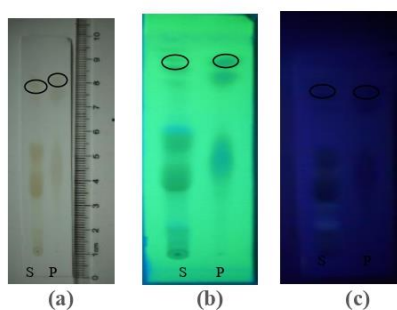
Pelarut pengembang yang digunakan metanol : air dengan perbandingan (64:50:1). Hasil dilihat setelah plat disemprot dengan pereaksi Liebermann Bourchat untuk menampakkan bercak atau noda. Bercak atau noda warna kuning-kecoklatan dapat dilihat di sinar tampak dan biru tua di sinar UV 366 pada Gambar 14. Bercak berwarna kuning-kecoklatan dan biru tua ini menandakan adanya senyawa golongan saponin pada buah mahkota dewa.



Gambar 14 Profil kromatografi lapis tipis identifikasi saponin

Keterangan : (a) saponin di bawah sinar tampak. (b) saponin di uv 254. (c) saponin di uv 366. Fase diam: Silika Gel 60 F₂₅₄. Fase gerak : Kloroform : metanol : air (64:50:1). Perbandingan : saponin 10 mg/1 ml etanol. Deteksi: Liebermann Bourchat

Pelarut pengembang yang digunakan etil asetat : asam formiat : toluene : air (6:1,5:3:0,5). Hasil dilihat setelah plat disemprot dengan pereaksi FeCl_3 untuk menampakkan bercak atau noda. Bercak atau noda warna biru-kehijauan dapat dilihat di sinar UV 254 pada Gambar 15. Bercak berwarna biru-kehijauan ini menandakan adanya senyawa golongan tanin pada buah mahkota dewa.

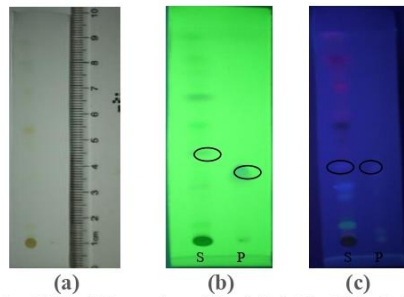


Gambar 15 Profil kromatografi lapis tipis identifikasi tanin

Keterangan : (a) tanin di bawah sinar tampak. (b) tanin di uv 254. (c) tanin di uv 366. Fase diam : Silika Gel 60 F₂₅₄. Fase gerak : etil asetat : asam formiat : toluene : air (6:1,5:3:0,5). Perbandingan : tanin 10 mg/1 mL etanol. Deteksi : FeCl_3

5.2 Profil kromatografi lapis tipis daun sirih merah. Proses identifikasi

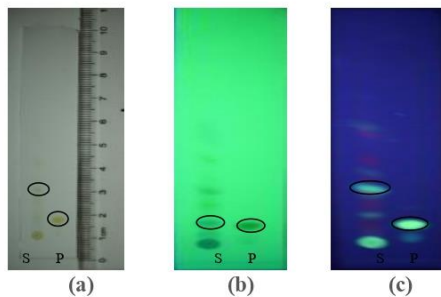
menggunakan KLT dengan Pelarut pengembang yang digunakan toluene : etil asetat : dietilamin (7:2:1). Identifikasi alkaloid dilakukan dengan perbandingan kuinin karena senyawa ini merupakan golongan dari alkaloid. Hasil dilihat setelah plat disemprot dengan pereaksi dragendrof untuk menampakkan bercak atau noda. Bercak berwarna hijau muda hingga jingga dapat dilihat di sinar UV 366 pada Gambar 16. Bercak berwarna hijau muda hingga jingga ini menandakan adanya senyawa golongan alkaloid pada daun sirih merah.



Gambar 16 Profil kromatografi lapis tipis identifikasi alkaloid

Keterangan : (a) alkaloid di bawah sinar tampak. (b) alkaloid di uv 254. (c) alkaloid di uv 366. Fase diam : Silika Gel 60 F₂₅₄. Fase gerak : Toluene : etilasetat : dietilamin (7:2:1). Pembanding : kuinin 10 mg/1ml etanol. Deteksi : Dragendorff

Pelarat pengembang yang digunakan heksan: etil asetat: asam formiat (6:4:0,2). Identifikasi flavonoid dilakukan dengan pembanding kuarsetin karena senyawa ini merupakan golongan dari flavonoid. Hasil dilihat setelah plat disemprot dengan pereaksi sitroborat untuk menampakkan bercak atau noda. Bercak atau noda warna hijau-kekuningan dapat dilihat di sinar UV 254 pada Gambar 17. Bercak berwarna hijau-kekuningan ini menandakan adanya senyawa golongan flavonoid pada daun sirih merah dan jenis flavonoid pada ekstrak diperkirakan sejenis dengan kuarsetin.

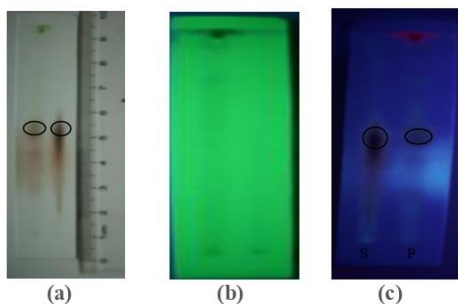


Gambar 17 Profil kromatografi lapis tipis identifikasi flavonoid

Keterangan : (a) flavonoid sebelum spy di uv 366. (b) flavonoid setelah spy di uv 254. (c) flavonoid setelah spy di uv 366. Fase diam : Silika Gel 60 F₂₅₄. Fase gerak

: heksan : etil asetat : asam formiat (6:4:0,2). Pembanding: kuarsetin 10 mg/1 ml etanol. Deteksi : Sitroborat

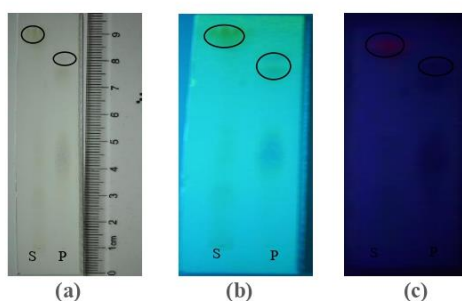
Pelarut pengembang yang digunakan kloroform : metanol : air (64:50:1). Hasil dilihat setelah plat disemprot dengan pereaksi Liberman Bourchat untuk menampakkan bercak atau noda. Bercak atau noda warna coklat-merah bata dapat dilihat di sinar tampak dan sinar uv 366 pada Gambar 18. Bercak berwarna coklat-merah bata ini menandakan adanya senyawa golongan saponin pada daun sirih merah.



Gambar 18 Profil kromatografi lapis tipis identifikasi saponin

Keterangan : (a) saponin setelah spy di sinar tampak. (b) saponin setelah spy di uv 254. (c) saponin setelah spy di uv 366. Fase diam : Silika Gel 60 F₂₅₄. fase gerak: Kloroform : metanol : air (64:50:1). Pembanding: saponin 10 mg/1 ml etanol. Deteksi: Liberman Bourchat

Pelarut pengembang yang digunakan kloroform : metanol : air dengan (64:50:1). Hasil dilihat setelah plat disemprot dengan pereaksi FeCl₃ untuk menampakkan bercak atau noda. Bercak atau noda warna biru-kehijauan dapat dilihat di sinar uv 254 pada Gambar 18. Bercak berwarna biru-kehijauan ini menandakan adanya senyawa golongan tanin pada daun sirih merah.



Gambar 19 Profil kromatografi lapis tipis identifikasi tanin

Keterangan : (a) tanin di sinar tampak. (b) tanin di uv 254. (c) tanin di uv 366. Fase diam : Silika Gel 60 F₂₅₄. Fase gerak: etil asetat : asam formiat : toluene : air (6:1,5:3:0,5). Pembanding : Tanin 10 mg/1 mL etanol. Deteksi FeCl₃

Hasil identifikasi menunjukkan ekstrak daun sirih merah dan buah mahkota dewa mengandung senyawa metabolit sekunder yang sama yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Hasil identifikasi fitokimia ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya oleh Firdaus usman (2009) menyatakan ekstrak buah mahkota dewa mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, dan tanin. Hasil penelitian Mustika weni (2014) menyatakan ekstrak daun sirih merah mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin.

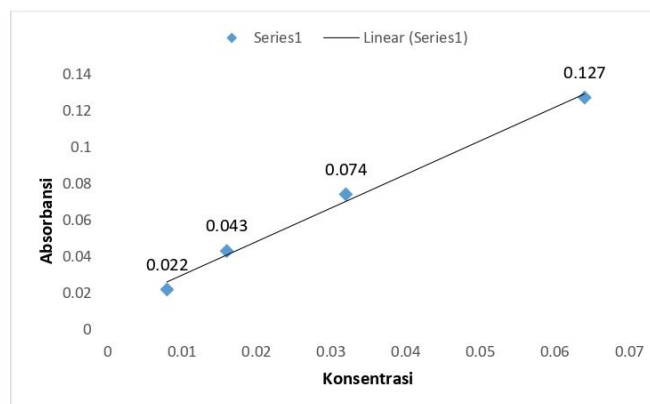
5.3 Identifikasi penetapan kadar flavonoid total. Analisis dilakukan dengan tahapan pembuatan standar yakni dengan menggunakan larutan standar flavonoid kuarsetin. Larutan standar yang digunakan adalah senyawa flavonoid kuarsetin dengan konsentrasi 10 mg/25 ml pelarut etanol p.a.

Hasil pengukuran absorbansi standar pada panjang gelombang 415 nm dapat diperoleh data yang dapat dilihat pada Tabel 6 sebagai berikut.

Tabel. 6 Hasil pengukuran absorbansi standar

Standar	Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi Standar
1	0,008	0,022
2	0,016	0,043
3	0,032	0,074
4	0,064	0,127

Berdasarkan hasil penentuan absorbansi larutan standar tersebut dapat digambarkan kurva kalibrasi larutan standar berupa grafik kurva konsentrasi (mg/ml) versus absorbansi yang dapat ditunjukkan pada Gambar 20 sebagai berikut.



Gambar 20 Kurva kalibrasi larutan standar kuarsetin.

Berdasarkan hasil pengukuran absorbansi larutan standar pada berbagai konsentrasi maka kurva kalibrasi larutan standar senyawa flavonoid kuarsetin diperoleh hubungan yang linear antara absorbansi dengan konsentrasi yang ditunjukkan dengan pengukuran linearitas sebesar 0,993. Besarnya linearitas ini mendekati nilai satu sehingga dapat dikatakan bahwa absorbansi merupakan fungsi

yang besarnya berbanding lurus dengan konsentrasi dan mengikuti persamaan regresi linear. Persamaan yang diperoleh dari kurva pada Gambar 9 adalah :

$$y = 1,837x + 0,011$$

Persamaan diatas pada kurva kalibrasi standar senyawa flavonoid quersetin tersebut digunakan sebagai pembanding dalam analisis kuantitatif pada pengukuran kandungan senyawa flavonoid kuarsetin ekstrak etanol daun sirih merah dan buah mahkota dewa. Berdasarkan hasil pengukuran pada sampel daun sirih merah dan buah mahkota dewa diperoleh data yang ditunjukkan pada Tabel 7 sebagai berikut.

Tabel 7. Hasil kadar flavonoid total daun sirih merah dan buah mahkota dewa

Nama Sampel	No	Penimbangan sampel (mg)	Absorbansi sampel	Kadar terukur (mg)	Persen kadar (%)
Sirih merah	1	20,8	0,028	0,0090	0,65
Sirih merah	2	20,8	0,030	0,0101	0,73
Sirih merah	3	20,8	0,028	0,0090	0,65
Rata-rata				0,0094	0,68
Mahkota dewa	1	21,9	0,962	0,4456	24,42
Mahkota dewa	2	21,9	0,969	0,4493	24,62
Mahkota dewa	3	21,9	0,970	0,4498	24,65
Rata-rata				0,4482	24,56

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kandungan senyawa flavonoid rata-rata pada ekstrak etanol daun sirih merah adalah 0,0094 mg atau 0,68% sedangkan kandungan senyawa favonoid rata-rata pada ekstrak etanol buah mahkota dewa adalah 0,4482 mg atau 24,56%. Hasil perhitungan penetapan kadar flavonoid ekstrak daun sirih merah dan ekstrak buah mahkota dewa dapat dilihat pada Lampiran 10.

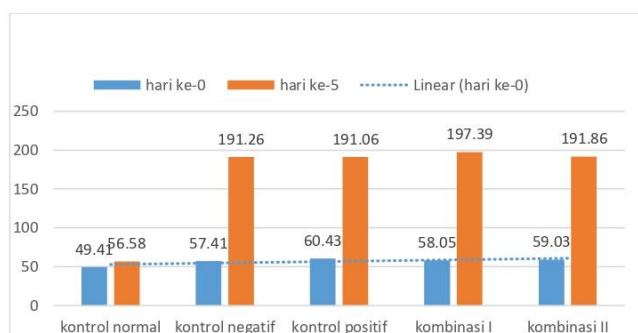
6. Pengujian Tikus DM Tipe II Induksi Streptozotosin-Nikotinamid

Penelitian ini menggunakan hewan percobaan berupa tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*). Tikus jantan digunakan karena mempunyai kerja

metabolisme obat yang lebih cepat dan kondisi biologis yang lebih stabil karena tikus jantan tidak dipengaruhi hormon estrogen yang dapat mempengaruhi kadar gula darah. Diaklimatisasi tikus selama 1 minggu sebelum digunakan dengan tujuan agar tikus dapat beradaptasi dengan lingkungan barunya seperti kandang, pemberian makanan dan minuman, dan sekitarnya. Setelah diaklimatisasi, tikus kemudian ditimbang. Setiap melakukan pengukuran darah, seluruh tikus dipuasakan selama 8 jam untuk meminimalkan pengaruh zat-zat lain seperti makanan dan absorpsi obat yang diberikan pada pengukuran kadar glukosa darah awal. Pada perlakuan terhadap hewan uji memberikan hasil kadar glukosa darah yang berbeda-beda. Hal ini dapat disebabkan oleh faktor variasi biologis dari setiap hewan uji yang tidak dapat dihilangkan, sehingga relatif dapat mempengaruhi hasil perbedaan kadar glukosa darah awal pada setiap hewan uji.

6.1 Hasil peningkatan kadar glukosa darah tikus setelah diinduksi STZ-

NA. Pada penelitian ini untuk membuat model hewan yang diabetes maka tikus diinduksi dengan menggunakan streptozotosin. Streptozotosin-nikotinamid diberikan secara intraperitoneal pada hewan uji. Nikotinamid dosis 110 mg/kg bb diberikan terlebih dahulu, 15 menit setelah induksi nikotinamid kemudian diberikan streptozotosin dosis 55 mg/kg bb. Dosis streptozotosin-nikotinamid yang diberikan tidak mengacu pada penelitian-penelitian yang telah ada, namun berdasarkan pengalaman dari hasil orientasi. Pemberian dosis streptozotosin 55 mg/kg bb dan nikotinamid 110 mg/kg bb dalam 5 hari telah mampu membuat kondisi diabetes tipe-2 dengan keadaan kadar glukosa tinggi, penurunan berat badan, polidipsi, polifagi, dan poliuri pada setiap hewan uji.



Gambar 21 Profil peningkatan glukosa darah setelah diinduksi STZ-NA

Pada hari ke-5 terjadi peningkatan kadar glukosa darah pada seluruh kelompok kontrol negatif, kontrol positif, kombinasi I, dan kombinasi II setelah semua hewan uji di beri STZ-NA terkecuali kontrol normal. Hasil pengukuran kadar glukosa darah setelah sebelumnya dipuasakan selama 8 jam mengakibatkan semua hewan uji mengalami peningkatan kadar glukosa darah >126 mg/dL sehingga dikatakan hiperglikemik. Peningkatan kadar glukosa darah yang terjadi adalah berkisar 185,43-197,99 mg/dL (Lampiran 12). Hasil analisis statistik dengan *independent samples test*, menunjukkan terdapat perbedaan secara bermakna antara kelompok hewan uji normal dengan kelompok hewan uji induksi STZ-NA yaitu 0,00 ($P < 0,05$) (Lampiran 16.1).

Streptozotosin merupakan salah satu zat diabetagonik yang diketahui dapat digunakan untuk menginduksi hewan percobaan. Pemberian streptozotosin adalah cara yang cepat untuk menghasilkan kondisi hiperglikemik, karena dalam sel streptozotosin serupa dengan glukosa yang diangkut oleh protein pengangkut glukosa yaitu GLUT-2, akan tetapi tidak dikenali oleh protein pengangkut glukosa lainnya. Penurunan kadar insulin dalam darah disebabkan oleh kerusakan pankreas

sebagai penghasil hormon insulin karena streptozotisin mampu merusak sel β pankreas secara langsung. Oleh karena itu dibutuhkan suatu senyawa lainnya yang mampu melindungi sel β pankreas dari toksisitas streptozotisin yaitu nikotinamid. Kehadiran nikotinamid dapat meringankan toksisitas streptozotisin karena nikotinamid diketahui dapat mencegah penipisan di sel β pankreas.

6.2 Hasil penurunan kadar glukosa darah tikus setelah diinduksi STZ-NA. Pemberian sediaan uji diberikan selama 14 hari secara peroral, pada penelitian ini setiap pengambilan darah terlebih dahulu hewan uji dipuasakan selama 8 jam. Pada masing-masing hewan uji terjadi peningkatan kadar glukosa darah yang bervariasi, demikian pula terlihat adanya penurunan kadar glukosa darah yang terjadi setelah pemberian perlakuan pada tiap kelompok. Pada hari ke-12 dengan percobaan yaitu kontrol positif, kombinasi I dan kombinasi II didapatkan kadar glukosa darah masing-masing 163,95 mg/dL, 182,67 mg/dL, dan 165,35 mg/dL, sementara untuk kontrol negatif dan kontrol normal masing-masing sebesar 194,42 mg/dL dan 56,28 mg/dL. Pada hari ke-19 diperoleh kontrol positif, kombinasi I, dan kombinasi II didapatkan kadar glukosa darah masing-masing 117,35 mg/dL, 149,39 mg/dL, dan 125,41 mg/dL, sementara untuk kontrol negatif dan kontrol normal masing-masing sebesar 196,24 mg/dL dan 56,24 mg/dL (Lampiran 12). Masing-masing subyek memberikan respon yang berbeda pada tiap kelompok terhadap perlakuan yang sama. Hal ini disebabkan terdapatnya variasi biologis terhadap dosis yang diberikan.



Gambar 22 Profil penurunan kadar glukosa darah

Berdasarkan Gambar 22, pada kelompok perlakuan kontrol positif, kombinasi I, dan kombinasi II telah memberikan penurunan dari hari ke-12 hingga hari ke-19, namun pada kelompok perlakuan kontrol negatif yang hanya diterapi dengan suspensi Na-CMC memberikan peningkatan secara terus-menerus hingga hari ke-19. Perbandingan lebih jelas efek daya hipoglikemik antara kelompok dapat dilihat pada persentase penurunan kadar glukosa Tabel 8 berikut ini.

Tabel 8. Persentase penurunan kadar glukosa darah pada tikus

Kelompok Perlakuan	Persentase Penurunan (%)	
	T1	T2
Kontrol positif	20,72±3,25	56,41±2,69
Kombinasi I	7,45±3,19	24,32±2,07
Kombinasi II	19,96±1,87	49,97±2,23

Keterangan :

Kontrol positif : Glibenklamid
 Kombinasi I : Ekstrak daun SM+MD dosis 50:100
 Kombinasi II : Ekstrak daun SM+MD dosis 100:200

Dilihat dari hasil persentase penurunan kadar glukosa darah seluruh dosis perlakuan mengalami penurunan glukosa darah, namun dari data tersebut dapat dilihat dosis perlakuan yang menurunkan glukosa secara maksimal terdapat pada

kontrol positif (Glibenklamid dosis 5 mg/kg BB), kemudian dosis kombinasi II (Ekstrak SM:MD dosis 100:200 mg/kg BB) lebih besar persentasenya dibandingkan dosis kombinasi I (Ekstrak SM:MD dosis 50:100). Hal ini disebabkan dosis sediaan uji dan glibenklamid memberikan aktivitas yang mampu menekan peningkatan kadar glukosa darah pada hewan uji yang diinduksi streptozotocin-nikotinamid dibandingkan kelompok yang hanya diterapi Na-CMC.

Penentuan adanya perbedaan signifikan antar dosis kombinasi sirih merah dan buah mahkota dewa dilakukan dengan uji statistik ANOVA dengan taraf kepercayaan 95%. Analisa awal dilakukan untuk uji hiperglikemik setelah induksi STZ-NA, yaitu uji normalitas dengan metode Kolmogorov-smirnov untuk melihat distribusi data kadar glukosa darah tikus pada hari ke-5 antara kelompok hewan uji normal dengan kelompok hewan uji induksi STZ-NA menunjukkan semua kelompok tikus terdistribusi normal 0,981 dan 0,706 ($P > 0,05$). Analisa berikutnya dilakukan untuk uji hipoglikemik hari ke-0 hingga ke-12 (t1) dan hari ke-0 hingga ke-19 (t2) selama 14 hari perlakuan menunjukkan semua kelompok terdistribusi normal 0,850 dan 0,104 ($P > 0,05$) (Lampiran 16.1). Dilanjutkan uji homogenitas dengan metode *levene statistic* sebagai syarat uji ANOVA untuk melihat data kadar glukosa tikus homogen atau tidak. Hasil menunjukkan syarat normalitas dan homogenitas telah terpenuhi 0,756 dan 0,545 ($P > 0,05$) (Lampiran 16.2).

Analisis one-way ANOVA digunakan untuk mengetahui perbedaan persentase penurunan kadar glukosa darah. Hasil signifikansi menunjukkan bahwa daya hipoglikemik pada hari ke-0 hingga ke-12 (t1) dan hari ke 0 hingga ke-19 (t2) yaitu 0,00 ($P > 0,05$). Data persentase menunjukkan berbeda bermakna, sehingga

untuk mengetahui perbedaan signifikansi pada masing-masing perlakuan dilanjutkan uji Tukey. Secara statistik menunjukkan pada hari ke-0 hingga ke-12 (t1) dan hari ke-0 hingga hari ke-19 (t2) tidak memberikan perbedaan yang signifikan antara kelompok normal dan negatif (Lampiran 16.3), namun berdasarkan Tabel 8. kontrol negatif memberikan peningkatan yang signifikan berbeda dibandingkan kontrol normal.

Kombinasi II dan kontrol positif pada hari ke-0 hingga ke-12 (t1) tidak memberikan perbedaan yang signifikan, namun memberikan perbedaan yang signifikan dengan kombinasi I. Pada hari ke-0 hingga ke-19 (t2) antara kontrol positif, kombinasi II, dan kombinasi I terjadi perbedaan yang signifikan (Lampiran 16.3), dan berdasarkan Tabel 8. antara kombinasi I dan kombinasi II memberikan penurunan yang signifikan berbeda dengan kontrol positif.

Berdasarkan Gambar 21 di atas, dapat dilihat perubahan luas daerah kadar glukosa darah tikus sebelum dan sesudah pemberian sediaan uji ekstrak daun SM+MD dihitung mulai dari hari ke-0 sampai hari ke-19. Hasil perhitungan rata-rata AUC kadar glukosa darah memperlihatkan semakin kecil nilai AUC total maka aktivitas antihiperlipidemik semakin besar. Hasil perhitungan rata-rata AUC kadar glukosa darah tikus dapat dilihat pada Tabel 9 dan Lampiran 13.

Tabel 9. Luas AUC rata-rata kadar glukosa darah tikus

Kelompok Perlakuan	Luas AUC rata-rata kadar glukosa darah			
	AUC ₀₋₅ hari	AUC ₅₋₁₂ hari	AUC ₁₂₋₁₉ hari	AUC _{total} ±SD
Kontrol normal	264,97	395,01	393,83	1053,80±23,90
Kontrol negatif	621,85	1349,85	1372,74	3344,43±45,37
Kontrol positif	628,72	1242,54	984,56	2855,81±37,26
Kombinasi I	636,61	1327,42	1162,24	3126,26±39,34
Kombinasi II	627,22	1250,23	1017,67	2895,12±13,34

Berdasarkan luas AUC_{total} pada Tabel 9 kadar glukosa darah pada seluruh kelompok perlakuan memberikan efek penurunan kadar glukosa darah setiap minggunya. Rata-rata luas AUC_{total} kelompok perlakuan berada dibawah luas AUC_{total} kelompok kontrol negatif.



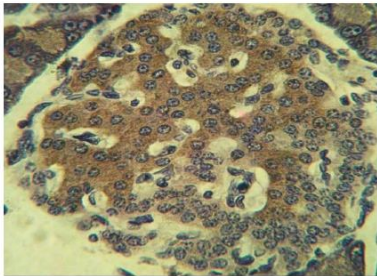
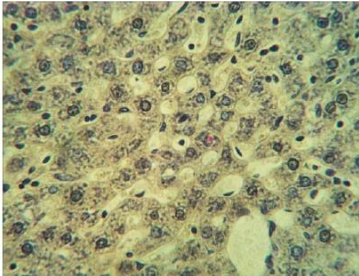
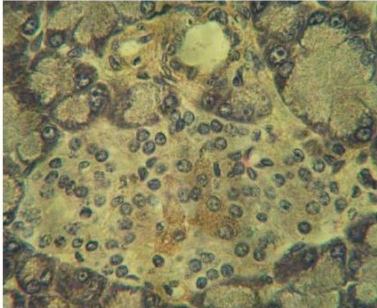
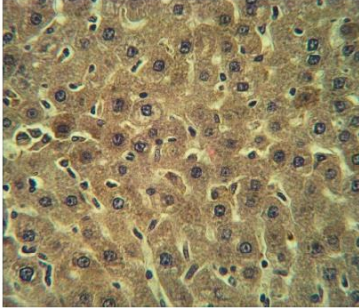
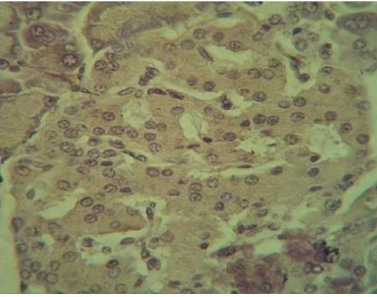
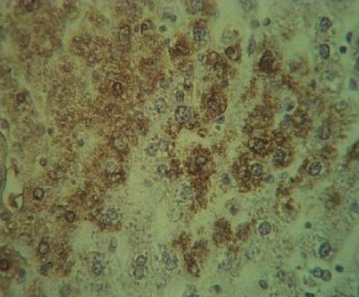
Gambar 23 Luas AUC_{total} kelompok perlakuan

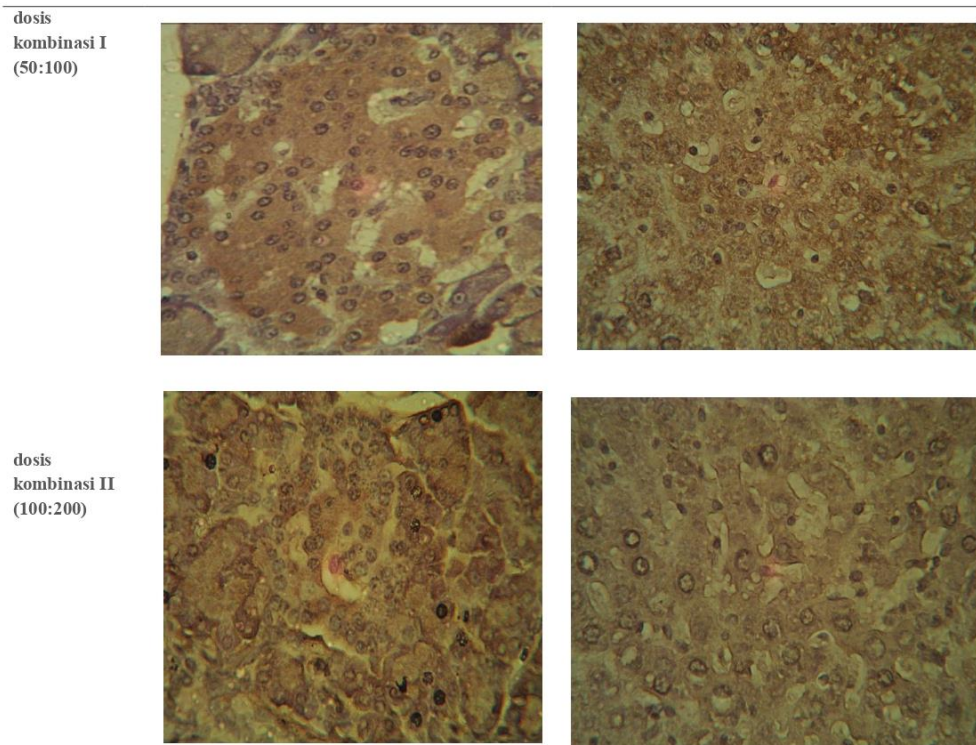
Berdasarkan Gambar 23, menunjukkan bahwa semakin kecil nilai AUC kelompok uji, semakin baik kemampuannya dalam menurunkan kadar glukosa darah. Pada uji statistik kadar glukosa darah tikus antara kelompok kombinasi I dapat menurunkan kadar glukosa darah tikus namun menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok kombinasi II dan kontrol positif.

7. Hasil pengamatan imunohistokimia jaringan hati dan sel β pankreas tikus

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah jumlah GLUT2 di jaringan hati dan sel β pankreas. Glukosa transporter 2 (GLUT2) bersifat afinitas rendah dengan kapasitas yang tinggi dalam penyerapan glukosa. GLUT2 bukan hanya protein struktural namun juga secara signifikan sangat berperan dalam masuknya glukosa. GLUT2 merupakan jalan glukosa untuk masuk ke dalam sel β pankreas dan sebagai transporter glukosa utama pada tikus. GLUT2 pada hati

pertama kali terletak di basolateral (sinusoid) membran plasma yang berperan dalam homeostatis glukosa, memanfaatkan atau memproduksi glukosa saat kondisi makan maupun berpuasa. Pengamatan GLUT2 terhadap sel β pankreas dan jaringan hati dengan teknik imunohistokimia (IHC) menggunakan antibodi primer antiGLUT2. Aplikasi *software* analisis ImageJ digunakan untuk analisis semikuantitatif untuk mendapatkan jumlah densitas protein GLUT2 berdasarkan hasil foto IHC. Seperti yang diharapkan induksi STZ-NA memicu kerusakan sel β pankreas dan menurunkan secara signifikan jumlah GLUT2. Namun secara bertahap ekspresi jumlah GLUT2 meningkat secara bertahap dari kelompok tikus yang berikan perlakuan terapi.

Kelompok Perlakuan	Sel β pankreas	Hepatosit
kontrol normal		
kontrol negatif		
kontrol positif (Glibenklamid)		



Gambar 24. Hasil pewarnaan dengan teknik imunohistokimia, tampak adanya protein GLUT2 pada perbesaran 40x di sel beta pankreas dan jaringan hepar tikus jantan galur wistar. (A). GLUT2 yang ditandai dengan adanya warna coklat. (B). (tanda panah) menunjukkan inti sel yang dikelilingi sitoplasma dan berisi GLUT2.

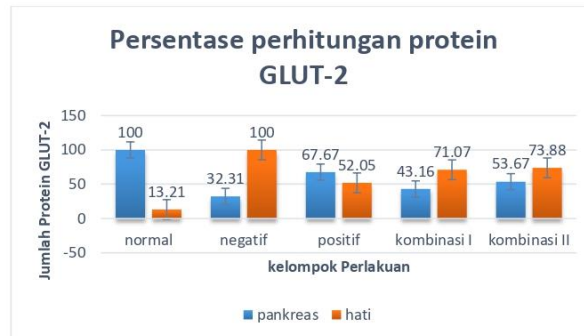
Berdasarkan Gambar 24. diperoleh hasil pada setiap kelompok perlakuan memberikan hasil persentase jumlah protein GLUT2 yang berbeda-beda pada setiap kelompok perlakuan. Hasil perhitungan jumlah persentase protein GLUT2 sel β pankreas dan jaringan hepar dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Persentase jumlah GLUT2

Kelompok Perlakuan	Persentase Jumlah Protein GLUT2 (%)	
	Sel β pankreas	Jaringan Hepar
Kontrol Normal	100	13,21
Kontrol Negatif	32,31	100
Kontrol Positif	67,67	52,05
Kombinasi I	43,16	71,07
Kombinasi II	53,67	73,88

Keterangan : Kontrol normal (tanpa induksi STZ-NA). Kontrol Negatif (Induksi STZ-NA dan Tanpa perlakuan terapi). Kontrol Positif (Induksi STZ-NA dan terapi Glibenklamid). Kombinasi I (Induksi STZ-NA dan Terapi ekstrak SM:MD dosis 50:100). Kombinasi II (Induksi STZ-NA dan Terapi ekstrak SM:MD dosis 100:200).

Berdasarkan Tabel 10. diperoleh persentase jumlah GLUT2 akibat penginduksi streptozotosin-nikotinamid setelah 14 hari, apabila pada setiap kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol normal terhadap sel β pankreas terjadi penurunan sedangkan pada jaringan hepar terjadi peningkatan jumlah GLUT2. Hal ini mengindikasikan bahwa efek streptozotosin mempengaruhi aktivitas GLUT2 dan kadar glukosa darah. Glukosa transporter 2 (GLUT2) bersifat afinitas rendah dengan kapasitas yang tinggi dalam penyerapan glukosa. Kadar glukosa darah yang tinggi pada kontrol negatif selama 14 hari menyebabkan GLUT2 mengalami penurunan jumlah GLUT2 pada permukaan sel β pankreas. Hal demikian diperjelas dengan warna dan jumlah GLUT2 yang dihasilkan pada kontrol negatif signifikan berbeda dibandingkan kontrol normal.



Gambar 25. Hasil persentase berdasarkan rata-rata densitas protein GLUT-2

Berdasarkan Gambar 25. hasil perolehan foto IHC dan jumlah GLUT2 setelah diterapi selama 14 hari pada kontrol positif yaitu 67,67%, kombinasi I yaitu 43,16%, dan kombinasi II yaitu 53,67%. Pada sel β pankreas yang diberikan terapi (kontrol positif, kombinasi I dan II) menunjukkan adanya penurunan kerusakan sel dan kerusakan yang lebih rendah dari membran plasma setelah pemberian dan efek dari STZ-NA. Kadar glukosa darah yang tinggi memberikan aktivitas jumlah GLUT2 yang berbeda pada jaringan hepar akibat efek dari penginduksi STZ. Berdasarkan hasil foto IHC dan diperjelas dengan data persentase jumlah GLUT2 pada kontrol negatif jauh lebih tinggi dibandingkan kontrol normal. Kelompok terapi kontrol positif menunjukkan adanya perbaikan GLUT2 sebesar 52,05%, kombinasi I sebesar 71,07%, dan kombinasi II sebesar 73,07%. Dari hasil yang diperoleh, diperkirakan senyawa yang terkandung dalam ekstrak kombinasi I dan II berpotensi dalam memperbaiki homeostatis glukosa yang terganggu akibat bahan penginduksi. Dapat disimpulkan bahwa terapi selama 14 hari dianggap sudah mampu untuk menurunkan kadar glukosa darah dan mulai menunjukkan adanya

perbedaan hasil jumlah peningkatan dan penurunan GLUT2 pada sel β pankreas dan jaringan hepar dibandingkan dengan kontrol normal, namun dianggap signifikan berbeda terhadap hasil kontrol negatif.

Adapun hasil penelitian terdahulu menjadi acuan untuk melihat pengamatan GLUT2 yang diperoleh dalam penelitian ini. Lee H.S., *et al* (2003), menunjukkan pada sel β pankreas tikus yang diinduksi STZ 60 mg/kg BB dan di terapi ekstrak polienolfosfatidilkolin (PPC) yang diekstrak dari kedelai menunjukkan peningkatan ekspresi GLUT2 dalam membran plasma sebanyak 75% setelah tiga minggu efek dari STZ, sementara penurunan ekspresi GLUT2 ditunjukkan oleh kontrol diabetes tanpa perlakuan terapi.

Pada penelitian ini digunakan obat hipoglikemik oral yaitu obat modern dan obat tradisional. Pengobatan secara tradisional didasarkan faktor-faktor empiris, kebiasaan, pengalaman, dan terkadang unsur-unsur yang bersifat mistik. Pada umumnya mekanisme proses penyembuhan yang terjadi dalam pengobatan jenis ini tidak dapat dijelaskan secara tuntas seperti pengobatan modern. Banyak jenis obat tradisional yang sudah digunakan sebagai obat oral antidiabetik. Ekstrak daun sirih merah dan ekstrak buah mahkota dewa merupakan obat herbal yang mempunyai kemampuan menurunkan kadar glukosa darah. Pengobatan modern yang digunakan pada penelitian ini adalah dari golongan sulfonilurea (glibenklamid). Fungsi glibenklamid dalam penelitian ini adalah sebagai pembanding dalam menurunkan kadar glukosa darah.

Penelitian terdahulu mengungkapkan mekanisme dari tanaman yang digunakan pada penelitian ini. Menurut Agustanti (2008), sirih merah menunjukkan

aktivitas enzimatis yaitu sebesar 0,1421, 0,2255, dan 12,4452 $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{menit}$. Kadar flavonoid yang besar dalam daun sirih merah mampu meningkatkan aktivitas enzim α -glukosidase, selain itu dapat menghambat kerusakan pulau langerhans di pankreas dengan cara membantu meregenerasi sel-sel tersebut sehingga dapat memproduksi insulin kembali. Hal ini semakin diperjelas oleh meilitia (2013), menyatakan bahwa kadar glukosa darah puasa pada pasien diabetes mellitus tipe-2 saat diberikan rebusan daun sirih merah selama 7 hari dapat menurunkan kadar glukosa darah sebanyak 16 mg/dL. Hal ini disebabkan oleh adanya flavonoid dan alkaloid. Alkaloid yang banyak dalam daun sirih merah mampu meningkatkan aktivitas enzim glukosa oksidase sehingga semakin banyak glukosa yang diserap oleh sel tubuh. Berdasarkan kedua penelitian tersebut dapat diketahui bahwa alkaloid dan flavonoid dari ekstrak daun sirih merah pada penelitian ini bekerja dengan cara meningkatkan aktivitas enzimatis.

Meiyanti (2006), menyatakan bahwa bubuk daging buah mahkota dewa mempunyai efek hipoglikemik terhadap gula darah pada orang sehat setelah pembebanan glukosa. Kemungkinan efek menurunkan glukosa darah ini terjadi melalui kerja saponin dan tanin yang terkandung di dalamnya. Saponin bergabung ke dalam membran sel membentuk struktur yang lebih permeabel dibanding membran aslinya. Saponin meningkatkan permeabilitas usus kecil, sehingga meningkatkan *uptake* zat yang sesungguhnya kurang diserap dan menyebabkan hilangnya fungsi normal usus. Pengaruh saponin terhadap susunan membran sel dapat menghambat absorpsi molekul zat gizi yang lebih kecil yang seharusnya cepat diserap, misalnya glukosa. Struktur membran sel yang terganggu diduga juga

menimbulkan gangguan pada sistem transporter glukosa sehingga akan terjadi hambatan untuk penyerapan glukosa. Kemungkinan efek penurunan kadar glukosa darah ini selain oleh saponin juga mungkin disebabkan oleh kandungan tanin.

Tanin bersifat sebagai astringen, dapat mempresipitasikan protein selaput lendir usus dan membentuk lapisan yang melindungi usus, sehingga menghambat penyerapan glukosa. Secara empiris buah mahkota dewa memang memiliki aktivitas antihiperglikemik dalam proses penghambatan atau menginhibisi proses kerja enzim α -glukosidase dalam tubuh yang bertugas menguraikan polisakarida menjadi monosakarida yang akan masuk ke dalam darah. Buah mahkota dewa memiliki potensi aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase pada fraksi amil alkohol sebesar 40,04%, dimana fraksi tersebut mengandung campuran kelas isoflavan, flavon, flavonol, dan flavanon dari kelompok metabolit sekunder flavonoid. Ekstrak metanol buah mahkota dewa dapat menghambat aktivitas α -glukosidase sebesar 40,95% dengan persentase inhibisi 12,61 dan 5,41 pada eluat tabung yang mengandung alkaloid. (Usman, 2009; Rohimah, 2008).

Pada pengujian identifikasi kandungan senyawa untuk kedua tanaman, diperoleh kandungan senyawa yang sama yaitu flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin. Berdasarkan penelitian-penelitian sebelumnya yang telah dilakukan, diperkirakan pada penelitian ini penurunan kadar glukosa darah selama 14 hari akibat induksi STZ-NA yaitu melalui penghambatan enzim α -glukosidase, dimana pada penelitian sebelumnya dikatakan bahwa semakin besar kandungan flavonoid dan alkaloid dari sirih merah maka akan semakin meningkatkan potensi enzimatik, sementara pada penelitian ini hanya melakukan penetapan kadar flavonoid total

(Lampiran 10). Hasil yang diperoleh kandungan flavonoid dari daun sirih merah jauh lebih rendah dibandingkan buah mahkota dewa, sehingga diperkirakan pada penelitian ini penurunan kadar glukosa darah disebabkan oleh penghambatan enzim α -glukosidase.

Obat herbal mempunyai cara kerja yang berbeda jika dibandingkan dengan obat kimia. Tidak seperti obat kimia yang bisa langsung bereaksi, reaksi obat herbal dan manfaatnya dapat dirasakan setelah beberapa minggu atau beberapa bulan. Hal tersebut disebabkan oleh senyawa-senyawa yang terdapat pada obat herbal membutuhkan waktu untuk menyatu dalam metabolisme tubuh, karena obat herbal mempunyai cara kerja dengan berfokus pada sumber penyebabnya. Obat herbal bekerja langsung pada sumbernya dengan memperbaiki keseluruhan sistem tubuh yakni dengan memperbaiki sel-sel, jaringan dan organ-organ tubuh yang rusak serta dengan meningkatkan sistem kekebalan tubuh sebagai sistem pertahanan terhadap penyakit.

Perlu dilakukan tinjauan kembali dalam penelitian berikutnya untuk lebih mengetahui mekanisme maupun peran dari transporter glukosa dalam mengangkut senyawa-senyawa dalam ekstrak tumbuhan sirih merah dan mahkota dewa sehingga memberikan efek pada fungsi sel β , pelepasan insulin dan fungsi hati dalam menjaga homeostatis glukosa.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Kombinasi ekstrak etanol daun sirih merah dan ekstrak etanol buah mahkota dewa dosis 50:100 mg/kg bb dan dosis 100:200 mg/kg bb mempunyai aktivitas menurunkan kadar glukosa darah pada tikus yang diinduksi streptozotisin-nikotinamid.
2. Kombinasi ekstrak etanol daun sirih merah dan ekstrak etanol buah mahkota dewa dengan dosis 50:100 mg/kg bb telah mampu memberikan aktivitas dalam meningkatkan jumlah GLUT2 di sel β pankreas dan menurunkan jumlah GLUT-2 pada jaringan hati

B. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan fraksi senyawa dari daun sirih merah dan fraksi senyawa dari buah mahkota dewa yang diduga mempunyai aktivitas terhadap penyerapan glukosa oleh glukosa transporter-2
2. Perlu dilakukan penelitian dalam jangka waktu pengamatan kadar glukosa darah lebih dari 14 hari dan untuk mengetahui perbandingan efek GLUT2 di sel β pankreas dan jaringan hati.

RINGKASAN

Diabetes mellitus (DM) merupakan salah satu kondisi penyakit yang terjadi pada berbagai jenis usia dan diketahui dapat menyebabkan komplikasi yang serius. Terapi DM terdiri dari terapi nonfarmakologi dan farmakologi. Apabila dengan terapi nonfarmakologi belum mampu mencapai sasaran terapi maka perlu dilanjutkan dengan terapi farmakologi yang terdiri dari obat antidiabetes oral dan bentuk injeksi. Penderita diabetes selama hidupnya perlu mengonsumsi obat-obatan diabetik, namun pengobatan secara terus-menerus akan menimbulkan rasa tidak nyaman pada penderita, selain itu biaya yang dibutuhkan cukup tinggi karena biaya tersebut akan semakin bertambah secara terus-menerus dalam jangka waktu yang tidak terbatas. Oleh karena itu, diperlukan alternatif pengobatan dari bahan alam yang lebih mudah didapatkan oleh masyarakat dan dianggap lebih aman sehingga diharapkan dapat mengurangi ketidaknyamanan serta meminimalkan biaya pengobatan.

Beberapa penelitian menunjukkan ekstrak etanol 30% daun sirih merah dengan konsentrasi 200.000 ppm berpotensi sebagai aktivator enzim glukosa oksidase. Ekstrak metanol buah mahkota dewa dan akar bosa dengan konsentrasi masing-masing 1% b/v dapat menghambat aktivitas α -glukosidase sebesar 40.95 dan 99.34% (Agustanti, 2008; Rohimah, 2008).

Tujuan Penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antidiabetes dari kombinasi ekstrak etanol daun sirih merah dan ekstrak etanol buah mahkota dewa pada tikus yang diinduksi streptozotisin-nikotinamid dan mengetahui aktivitas peningkatan dan penurunan jumlah GLUT-2 di sel β pankreas dan di jaringan hati

dari ekstrak etanol daun sirih merah dan ekstrak etanol buah mahkota dewa pada tikus yang diinduksi streptozotisin-nikotinamid. Pengujian pada tikus dibagi atas 3 kelompok perlakuan kontrol dan 2 kelompok perlakuan dosis ekstrak. Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor tikus. Tikus yang mempunyai kadar glukosa darah tinggi (Hiperglikemik) digunakan dalam penelitian. Selanjutnya pada kelompok II sampai V diberikan perlakuan terapi berupa Na-CMC, Glibenklamid, dan sediaan kombinasi ekstrak etanol daun sirih merah dan buah mahkota dewa selama 14 hari dengan durasi pemberian sekali sehari.

Pada hari ke-5 terjadi peningkatan kadar glukosa darah pada seluruh kelompok kontrol negatif, kontrol positif, kombinasi I, dan kombinasi II setelah semua hewan uji di beri STZ-NA terkecuali kontrol normal. Hasil pengukuran kadar glukosa darah setelah sebelumnya dipuasakan selama 8 jam mengakibatkan semua hewan uji mengalami peningkatan kadar glukosa darah >126 mg/dL sehingga dikatakan hiperglikemik. Peningkatan kadar glukosa darah yang terjadi adalah berkisar 185,43-197,99 mg/dl.

Pada hari ke-12 dengan perlakuan terapi yaitu kontrol positif, kombinasi I dan kombinasi II didapatkan kadar glukosa darah masing-masing 163,95 mg/dL, 182,67 mg/dL, dan 165,35 mg/dL, sementara untuk kontrol negatif dan kontrol normal masing-masing sebesar 194,42 mg/dL dan 56,28 mg/dL. Pada hari ke-19 diperoleh kontrol positif, kombinasi I, dan kombinasi II didapatkan kadar glukosa darah masing-masing 117,35 mg/dL, 149,39 mg/dL, dan 125,41 mg/dL, sementara untuk kontrol negatif dan kontrol normal masing-masing sebesar 196,24 mg/dL dan 56,24 mg/dL. Kelompok perlakuan kontrol positif, kombinasi I, dan kombinasi II telah memberikan penurunan dari hari ke-12 hingga hari ke-19, namun pada

kelompok perlakuan kontrol negatif yang hanya diterapi dengan suspensi Na-CMC memberikan peningkatan secara terus-menerus hingga hari ke-19.

Hasil perolehan foto IHC dan jumlah GLUT2 setelah diterapi selama 14 hari pada kontrol positif yaitu 67,67%, kombinasi I yaitu 43,16%, dan kombinasi II yaitu 53,67%. Pada sel β pankreas yang diberikan terapi (kontrol positif, kombinasi I dan II) menunjukkan adanya penurunan kerusakan sel dan kerusakan yang lebih rendah dari membran plasma setelah pemberian dan efek dari STZ-NA. Kadar glukosa darah yang tinggi memberikan aktivitas jumlah GLUT2 yang berbeda pada jaringan hepar akibat efek dari penginduksi STZ. Berdasarkan hasil foto IHC dan diperjelas dengan data persentase jumlah GLUT2 pada kontrol negatif jauh lebih tinggi dibandingkan kontrol normal. Kelompok terapi kontrol positif menunjukkan adanya perbaikan GLUT2 sebesar 52,05%, kombinasi I sebesar 71,07%, dan kombinasi II sebesar 73,07%. Dari hasil yang diperoleh, diperkirakan senyawa yang terkandung dalam ekstrak kombinasi I dan II berpotensi dalam memperbaiki homeostatis glukosa yang terganggu akibat bahan penginduksi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abeeleh, *et al.*, 2009, *Induction of Diabetes Mellitus in Rats Using Intraperitoneal Streptozotocin : A Comparison between 2 Strains of Rat*, *European Journal of Scientific Research* 32: 398-402.
- Agustanti L., 2008, Potensi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Aktivator Enzim Glukosa Oksidase, Program Studi Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Ali. B Rabyah, *et al.*, 2012, Hypoglycemic and antihyperglycemic study of *Phaleria macrocarpa* fruits pericarp. School of Pharmaceutical Sciences, Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia, *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 6, pp. 1982-1990.
- Amin MI., 2011, Hypoglycemic Effects in Response to Abelson's Esculentus Treatment : A Research Framework using STZ-Induced Diabetic Rats. Faculty of Dentistry, University Teknologi MARA (UiTM) Malaysia, *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics* 1:63-64.
- Ansel HC., 1989, *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*, Jakarta : UI Press.
- Arambewela LSR., 2005, Antidiabetic Activities of Aqueous and Ethanolic Extracts of *Piper betle* Leaves in Rats, *J of Ethno Pharmacology* 102: 239-245. 27:243-275.
- Arbianti, Kumiasih & Maharani., 2008, The Influence of Red Sirih (*Piper crocatum*) and Green Sirih (*Piper betle* lynn) Leaf Extracts on the Neutrophil Count of Inflamed Oral Mucosa During Healing, *Journal of Archives of Orofacial Sciences* 3:56-78.
- Arfianti N., 2008, Aktivitas Insulinotropik Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa secara In Vitro, Program Studi Biokimia, Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor.
- Arjadi F, Susatyo P., 2010, Regenerasi Sel Pulau Langerhans Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Diabetes yang Diberi Rebusan Daging Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarp* (scheff.)Boerl.), Medical Faculty of Jendral Soedirman University, Purwokerto Vol. 2.
- Astuti, Yuni T., 2010, Efek Pemberian Per Oral Infusa Daun Sirih Merah (*Piper cf. Fragile*, Benth) terhadap penyembuhan Luka Tikus Putih Jantan yang Dibuat Diabetes, (Skripsi) Farmasi FMIPA UI.

- Azad K A, S W, Azizi M W., 2014, Toxicity study of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. International Islamic University Malaysia, Malaysia.
- Bonner-Weir, S., Trent, D.F., Honey, R.N., and Weir, G.C., 1981, Responses of Neonatal Rat Islets to *Streptozotocin* : Limited β -Cell Regeneration and Hyperglycemia, *Diabetes* 30:64-69.
- Cefalu T. William., 2015, *American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes*. The Journal of Clinical and Applied Research and Education 38:S1-S94.
- Dean JH., 2008, Clinical Practice Guidelines for The Prevention and Management Of Diabetes In Canada, *Canadian Journal Of Diabetes*. Supl 1.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia., 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. RI. Jakarta, 5:7-12.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia., 1986, *Sediaan Galenika*. Direktorat jendral POM. Jakarta : Depkes RI.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia., 2005, *Pharmaceutical Care untuk Penyakit Diabetes Melitus*. Jakarta, 14-22.
- Dewi FY, Anthara SM, Dharmayudha OG., 2014, Efektifitas Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Tikus Putih Jantan (*Rattus novergicus*) Yang Di Induksi Aloksan. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, *Buletin Veteriner Udayana* Vol. 6.
- Dharmayudha OG, Anthara SM, Wiranata AMI, Made L, Sudimartini., 2014, Efektifitas Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Terhadap Peningkatan Berat Badan Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Jantan Kondisi Diabetes Yang Diinduksi Aloksan, Universitas Udayana, Denpasar, Bali, *Buletin Veteriner Udayana* Vol. 6.
- Dipiro, et al., 2005, *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach, Sixth Edition*. USA: The McGraw-Hill Companies, 1337-1340.
- Dorland, W. A. N., 2002, *Kamus Kedokteran Dorland*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC, p : 931.
- Dyah N, Firman., 2007, *Mahkota Dewa dan Manfaatnya*. Geneca Exact, Buku Pengayaan Seri PKK, Hlm 1-7.

- Edward Z., 2009, Efek Ekstrak Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa*) Terhadap Kadar Malondialdehid Serum Pada Mencit Diabetes Melitus Akibat Induksi Aloksan, *Majalah Kedokteran Andalas*.
- Firmani, Ayu., 2010, Pengaruh Pemberian Infusa Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*, Ruiz & Pav) secara Topikal Terhadap Penyembuhan Luka pada Tikus Putih Jantan Diabetes, (Skripsi) Farmasi FMIPA UI.
- Gropper, S. S, J. L. Smith, J. L. Groof., 2005, *Advanced Nutrition and Human Metabolism*, Edisi ke-4. Belmont, USA : Thompson Wadsworth, pp : 84-6, 96,98.
- Gunawan D, Mulyani S., 2004, *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi)* Jilid 1. Hlm 9.
- Handayani M., 2009, Uji Klinik (Uji Saran Dosis) Efek Hipoglikemik dan Efek Antioksidan Ekstrak Kering Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa* [Sceff]Boerl) pada Sukarelawan Sehat yang diinduksi dengan Glukosa.
- Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia*, Edisi ke-2, Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Harmanto, N., 2001, *Mahkota Dewa: Obat Pusaka Para Dewa*, Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Hendra, *et al.*, 2013, Antioxidant, Anti-inflammatory and Cytotoxicity of *Phaleria macrocarpa* (Boerl.) Scheff Fruit. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 11:110.
- Heyne, K., 1987, *Tumbuhan berguna Indonesia II*. (Badan Litbang Kehutanan Jakarta, Penerjemah). Jakarta : Yayasan Sarana Wana Jaya, 622-628.
- Howell SL., 1997, The Biosynthesis and Secretion of Insulin. In : *Text Book of Diabetes*, Pickup JC, William G (eds), 2nd ed., Blackwell Science Ltd. London : pp 8.1-14.
- Ivorra MD, Paya M, Villar A., 1989, A Review of Natural Product and Plants as Potensial Antidiabetic Drugs. *J Ethnopharmacol*.
- Juliantina, F. Dewa ACM, Bunga N, Titis N., 2010, Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai agen Antibakterial terhadap Bakteri Gram positif & negatif, *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*.
- Kendran *et al.*, 2013, Toksisitas Ekstrak Daun Sirih Merah pada Tikus Putih Penderita Diabetes Melitus. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, *Jurnal Veteriner* 14:527-533.

- Kitabchi A.E, M.D., 2009, Pathophysiology Course Endokrin Module. Physiology of Endocrine Pancreas and Pathophysiology of Diabetes Mellitus (DM).
- Kunju S., 2012, Aktivitas Antidiabetes Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta indica* Adr. Juss.) dan Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz&Pav) pada Tikus Putih Jantan dengan Metode Toleransi Glukosa, (Skripsi) Fakultas Farmasi, Universitas Padjajaran, Jatinangor.
- Lenzen, S., 2008, Review : The Mechanisms of *Alloxan* and *Streptozotocin*-induced Diabetes. *Diabetologia*. 51:216-226.
- Levy, J, Gavin, J.R, Fausto, A, Gingerich, R.L. and Avioli, L.V., 1984, Impaired Insulin Action in Rats with Non-Insulin-Dependent Diabetes, *Diabetes*, 33: 901-906.
- Lisdawati, V., 2002, Buah Mahkota Dewa-Toksisitas, Efek Antioksidan, dan Efek Anti Kanker Berdasarkan Uji Penapisan Farmakologi.
- Malole, M.B.M, C.S.N, Pramono., 1989, *Penggunaan Hewan-hewan di Laboratorium*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Bogor:104-107.
- Mardiana, L., 2004, *Kanker pada Wanita : Pencegahan dan Pengobatan dengan Tanaman Obat*. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Masharani U, Karam JH., 2001, *Pancreatic Hormones & Diabetes Mellitus*. In *Basic & Clinical Endocrinology*. 6th ed. Greenspan FS, Gardner DG (eds), Mc Graw Hill, New York: pp. 623-48.
- Meiyanti, Dewoto R. Hedi, Suyatna D. Fransiscus., 2006, Efek Hipoglikemik Daging Buah Mahkota dewa (*Phaleria Macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) terhadap Kadar Gula darah pada Manusia Sehat setelah Pembebanan Glukosa, Fakultas Departemen Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti. *Universa Medicina* 25:114-20.
- Mun'im A, Azizahwati, Firmani A., 2010, Pengaruh Pemberian Infusa Daun Sirih Merah secara Topikal Terhadap Penyembuhan Luka pada Tikus Putih Diabet, Fakultas MIPA, Universitas Indonesia, Depok.
- Neldawati., 2013, Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid untuk Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat, Jurusan Fisika, Universitas Negeri Padang FMIPA UNP Air Tawar Barat Padang, *Pillar Of Physics* 2:76-83.
- Notoatmodjo S., 2002, *Metodologi Penelitian Kesehatan*, Jakarta: Rineka Cipta.

- Paget GE, Barnes JM., 1964, *Evaluating of drug activities pharmacometrics*, London: Academic Press.
- Patra, J.C and Chua, B.H., 2010, Artificial neural network-based drug design for diabetes mellitus using flavonoids, *Journal of Computational Chemistry* 32: 555-567.
- Perkeni., 2011, *Konsensus Pengendalian dan Pencegahan Diabetes Mellitus Tipe2 di Indonesia*.
- Pernata A. D., 2006, Potensi rebusan daun sirih merah (*Piper crocatum*) Terhadap Perbaikan Pankreas Tikus Putih Hiperglikemik, Program Studi Biokimia, Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor.
- Porte, Daniel & Robert S. Sherwin., 1998, *Diabetes Melitus Fifth Edition*, Stamford: Appleton & lange, 146-150.
- Pusdiknakes., 1985, *Diktat Kimia Klinik*. Depkes RI: Jakarta.
- Putra ST., 1993, Pewarnaan Imunohistologik dan Imunositopatologik untuk Penelitian Kedokteran. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Raju SM, Raju B., 2010, *Illustrated medical biochemistry, 2nd Edition*, Jaypee Brothers Medical Publishers ltd, New Delhi, India. 645 pp.
- Rofles, S. R., K. Pinna, E. Whitney., 2006, *Understanding Normal and Clinical Nutrition*. Belmont, USA : Thompson Wadsworth pp : 115: 143: 174-5:466: 791: 798.
- Rohimah A., 2008, Isolasi dan Identifikasi Golongan Alkaloid dari Ekstrak Buah Mahkota Dewa yang Menginhibisi α -glukosidase Program Studi Biokimia, Fakultas MIPA. Institut Pertanian Bogor.
- Rohyami Y., 2007, Identifikasi Flavonoid dari Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* Boerl) Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR, Laporan Penelitian PDM DIKTI.
- Safithri Mega, Fahma F., 2008, Potency of *Piper crocatum* Decoction as an Antihyperglycemia in Rat Strain *Sprague dawley*, Department of Biochemistry, Faculty of Mathematics and Natural Science, *Hayati Journal of Biosciences*, p 45-48, ISSN: 1978-3019 Vol. 15.
- Safithri, M., Fahma F., dan Marlina, P.W.N., 2012^a, Analisis Proksimat dan Toksisitas Akut Ekstrak Daun Sirih Merah yang Berpotensi sebagai Antidiabetes, *Jurnal Gizi dan Pangan*, 7:43-48.

- Safitri M, Yasni S, Bintang M, Ranti A.S., 2012^b, Toxicity Study of Antidiabetics Functional Drink of *Piper crocatum* and *Cinnamomum burmanii*, *Hayati Journal of Biosciences* 19:31-36.
- Salim A., 2006, Potensi rebusan daun sirih merah (*Piper crocatum*) Sebagai Senyawa Antihiperlipidemik pada Tikus Putih Galur *Sprague-Dawley*, Program Studi Biokimia, Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor.
- Samson M. Z., 2010, Senyawa Golongan Alkaloid Ekstrak Buah Mahkota Dewa sebagai Inhibitor α -Glukosidase, Program Studi Biokimia, Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor.
- Sang KJ., 2000, Inhibition of Alpha Glukocidase and Amylase by Luteolin Flavonoid, *J Bio Sci Bioteknol Biochem* 64:2458-2461.
- Sharp, P.E., Laregina, M.C., Suckw, M.A., 1998, *The Laboratory Rat*. CRC Press USA.
- Sherwood, L., 2001, *Fisiologi Manusia : dari Sel ke Sistem*. Ed ke-2. Jakarta : Penerbit Buku kedokteran EGC. P : 576.
- Siswono., 2001, *Mahkota Dewa 'Racum' Irian yang Berkhasiat*. Gizi.net
- Stites DP, Roddgers RPC, Folds JD, Schimitz J., 1997, Immunologic Laboratory Tests, Clinical laboratory Methods for Detection of Antigen & Antibodies. In : Stites DP, Terr AI, Parslow TG, Editors. Medical immunology. 9th ed. Stamford USA : Prentice-Hall International Inc, 11-53.
- Stryer L ; alih bahasa Sadikin Mohamad dkk., 2000, *Glikolisis*. Dalam: Biokimia. Jakarta : EGC : 505 – 79.
- Sudewo, B., 2008, *Basmi Penyakit Dengan Sirih merah*, Jakarta : PT. Agromedia Pustaka, Hlm 35-36.
- Sulistiyoningrum E, Setiawati, Ismaulidiya RF., 2013, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl improved renal histological changes in alloxan-induced diabetic rats, Faculty of Medicine and Health Sciences, Jenderal Soedirman University, Purwokerto, Indonesia. *International Journal of Medicinal Plants and Alternative Medicine* Vol. 1, pp. 087-092.
- Sulistiyoningrum E., 2013, *Phaleria macrocarpa* Reduces Glomerular Growth Factor Expression in Alloxan Induced Diabetic Rat. Histology and Pharmacology Department Faculty of Medicine and Health Sciences, Jenderal Soedirman University, Purwokerto, Univ Med Vol. 32:71-9.

- Sumastuti R., 2005, Multi efek dan multiguna buah/daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl). FK UGM.
- Sumastuti., 2002, Efek Antihistamin Ekstrak Daun dan Buah Mahkota Dewa pada Ileum Marmot Terpisah.
- Suratmo., 2010, Potensi Ekstrak Daun Sirih Merah Sebagai Antioksidan, (Skripsi) Kimia FMIPA, Universitas Brawijaya.
- Suyono S. *Patofisiologi diabetes melitus*. Dalam : Soegondo S, Soewondo P, Subekti I, editor. *Penatalaksanaan diabetes melitus terpadu.*, 2005, Jakarta : Balai Penerbit FKUI, 7-15.
- Szkudelski T., 2012, Streptozotocin-nicotinamide induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. Department of animal physiology and biochemistry, poznan university of life sciences, wolynska 35:60-637 Poznan, poland.
- Szkudelski, T., 2001, The Mechanism Of Alloxan And Streptozotocin Action In β Cells Of The Rat Pancreas, *J Physiol. Res.*, 50: 536-54.
- Tahara A, *et al.*, 2008, Hypoglycaemic Effects of Antidiabetic Drugs in Streptozotocin-Nicotinamide Induced Mildly Diabetic and Streptozotocin-Induced Severely Diabetic Rats. Nordic Pharmacological Society. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology Drug Discovery Research*, Astellas Pharma Inc., Ibaraki, Japan.
- Tjahyono, *Imunohistokimia dalam Diagnosis Klinik*. Dalam : Tjahyono, Susilaningih, Azhar TN., 2000, Editor. Aplikasi Biomolekuler dalam diagnosis klinik dan penelitian, BP UNDIP Semarang, 40-6.
- Tjitrosoepomo, Gembong., 2005, *Taksonomi Tumbuhan Obat-obatan*, Jogjakarta: Gajah Mada University Press.
- Umayah, umniyati S, Sofoewan., 1999, Immunocytochemistry and Serological Diagnosis for Detection of Toxoplasmosis on Spontaneous Abortion, Yogyakarta.
- Voight, R., 1995, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Alih Bahasa Drs. Soendami Noerono Soewandhi. Universitas Gajah Mada, Yogyakarta Hlm 577-578.
- Weir, *et al.*, 1981, Islets Secretion in A New Experimental Model for *Non-Insulin-Dependent Diabetes*, *Diabetes*, 30:590-595.
- White MF, Kahn RC., 1994, *Molecular Aspect of Insulin Action*, In Joslin's *Diabetes Mellitus*: pp.139-62.

- Wicaksono, *et al.*, 2009, Antiproliferative Effect of Methanol Extract of *Piper crocatum* Ruiz & Pav Leaves on Human Breast (T47D) Cells in vitro. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8:345-352.
- Widowati L., 2003, Uji keamanan buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) dan khasiat antidiabetesnya, tahap I: uji toksisitas akut dan khasiat menurunkan kadar glukosa darah. Jakarta: Puslitbang Farmasi dan Obat Tradisional.
- Widowati L., 2004, Uji keamanan buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) dan khasiat antidiabetesnya, tahap II: uji toksisitas subkronis dan mutagenitas. Jakarta: Puslitbang Farmasi dan Obat Tradisional.
- Wood S.I, Trayhurn P., 2003, Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. Liverpool Centre for Nutritional Genomics, Neuroendocrine & Obesity Biology Unit, Department of Medicine, University of Liverpool, University Clinical Departments, Liverpool L69 3GA, UK *British Journal of Nutrition* 89:3-9
- Yulinta R.M.N, Gelgel P.T.K, Kardena M.I., 2013, Efek Toksisitas Ekstrak Daun Sirih Merah Terhadap Gambaran Mikroskopis Ginjal Tikus Putih Diabetik yang diinduksi Aloksan. Fakultas Kedokteran Hewan. *Buletin Veteriner Udayana* Vol. 5.

Lampiran 1. Surat keterangan hasil identifikasi daun sirih merah dan buah mahkota dewa



BAGIAN BIOLOGI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS GADJAH MADA YOGYAKARTA
 Alamat: Sekip Utara Jl. Kaliurang Km 4, Yogyakarta 55281
 Telp. , 0274.542738, 0274.649.2568 Fax. +274-543120

SURAT KETERANGAN
No.: BF/261/ Ident/Det/VI/2015

Kepada Yth. :
Sdri/Sdr. Teodhora
Fakultas Farmasi USB
Di Surakarta

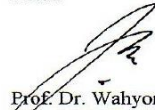
Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi sampel yang Saudara kirimkan ke Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM, adalah :

No.Pendaftaran	Jenis	Suku
261	<i>Piper crocatum</i> Ruiz. & Pav. <i>Phaleria macrocarpa</i> (Scheff.) Boerl	Piperaceae Thymelaeaceae

Demikian, semoga dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 15 Juni 2015
 Ketua


 Prof. Dr. Wahyono, SU., Apt.
 NIP. 195007011977021001

Lampiran 4. Surat keterangan *Ethical Clirens*

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 : 671 / X / HREC / 2015

The Health Research Ethics Committee Dr. Moewardi General Hospital / School of Medicine Sebelas
 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

Aktivitas Antidiabetes Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Piper crocatum dan Ekstrak Etanol Buah Phaleria macrocarpa pada Tikus Diinduksi Streptozotosin-Nikotinamid terhadap Ekspresi Glukosa Transporter-2

Principal investigator : Teodhora
 Peneliti Utama SBF 071410092

Location of research : Gedung Pusat Antar Universitas UGM
 Lokasi Tempat Penelitian

Is ethically approved
 Dinyatakan laik etik

Issued on : 27 Oktober 2015

Chairman
 Ketua

 Dr. Han Wujoso, dr.,Sp.F,MM,
 NIP. 19621022-199503 1 001

Lampiran 5. Gambar tikus putih (*Rattus norvegicus*), prosedur preparasi dan pewarnaan jaringan pankreas dan hati tikus



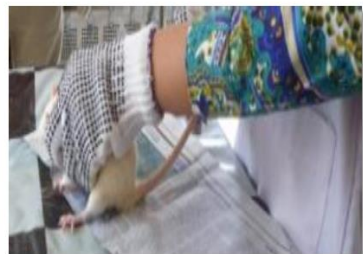
(1)



(2)



(3)



(4)



(5)



(6)





(9)



(10)



(11)



(12)



(13)

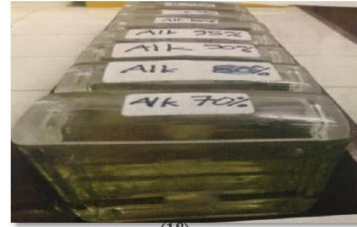


(14)





(17)



(18)



(21)



(22)



(23)



(24)



(25)



(26)



(27)



(28)

Keterangan Gambar :

1. Kandang tikus
2. Kelompok tikus
3. Penimbangan tikus
4. Perlakuan sebelum pemberian sediaan pada tikus
5. Pemberian sediaan uji tikus
- 6-7. Pengambilan darah tikus melalui orbita mata
8. Sampel darah untuk pengukuran kadar glukosa tikus
9. Kelompok tikus yang akan dibedah
10. Pembedahan tikus
11. Pengambilan organ tikus
- 12-13. Sampel organ diletakkan dalam wadah
- 14-15. Larutan boan dimasukkan dalam sampel organ
16. Preparasi sampel organ
17. Larutan dehidrasi
18. Proses dehidrasi jaringan
19. Pembeningan jaringan (*clearing*)
20. Pembedaan jaringan (*embedding*)

21. Pengecoran
22. Persiapan alat pemotongan jaringan
23. Preparat dalam gelas obyek dimasukkan ke larutan gelatin
24. Preparat dipanaskan pada slide warmer pada suhu 40°C
25. Deparafinasi
26. Preparat dituangi larutan harris hematoksilin
27. Rangkaian larutan dehidrasi
28. Mounting

Lampiran 6. Perhitungan penetapan susut pengeringan serbuk daun sirih merah dan serbuk buah mahkota dewa menggunakan *moisture balance*

Tanaman	Berat awal (g)	Berat sisa (g)	Susut pengeringan (%)
Daun sirih merah	2	1,90	5
	2	1,83	8,5
	2	1,92	4
Rata-rata			5,8
Buah mahkota dewa	2	1,86	7
	2	1,87	6,5
	2	1,88	6
Rata-rata			6,5

$$\text{Rumus : Susut pengeringan} = \frac{\text{berat awal} - \text{berat sisa}}{\text{Berat awal}} \times 100$$

Susut pengeringan serbuk daun sirih merah

1. Susut pengeringan = $\frac{2-1,90}{2} \times 100\% = 5\%$
2. Susut pengeringan = $\frac{2-1,83}{2} \times 100\% = 8,5\%$
3. Susut pengeringan = $\frac{2-1,92}{2} \times 100\% = 4\%$

$$\text{Rata - rata} = \frac{5\%+8,5\%+4\%}{3} = 5,8\%$$

Jadi, persentase rata-rata kadar air serbuk daun sirih merah adalah 5,8%

Susut pengeringan serbuk buah mahkota dewa

1. Susut pengeringan = $\frac{2-1,86}{2} \times 100\% = 7\%$
2. Susut pengeringan = $\frac{2-1,87}{2} \times 100\% = 6,5\%$
3. Susut pengeringan = $\frac{2-1,88}{2} \times 100\% = 6\%$

$$\text{Rata - rata} = \frac{7\% + 6,5\% + 6\%}{3} = 6,5\%$$

Jadi, persentase rata-rata kadar air serbuk buah mahkota dewa adalah 6,5%

Lampiran 7. Perhitungan rendemen ekstrak etanol 96% daun sirih merah dan ekstrak etanol 96% buah mahkota dewa

Tanaman	Bobot sampel (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen ekstrak (%)
Daun sirih merah	750	31,355	4,180
Buah mahkota dewa	750	28,226	3,763

$$\text{Rumus : Rendemen (\% b/b)} = \frac{\text{berat ekstrak (g)}}{\text{berat sampel (g)}} \times 100\%$$

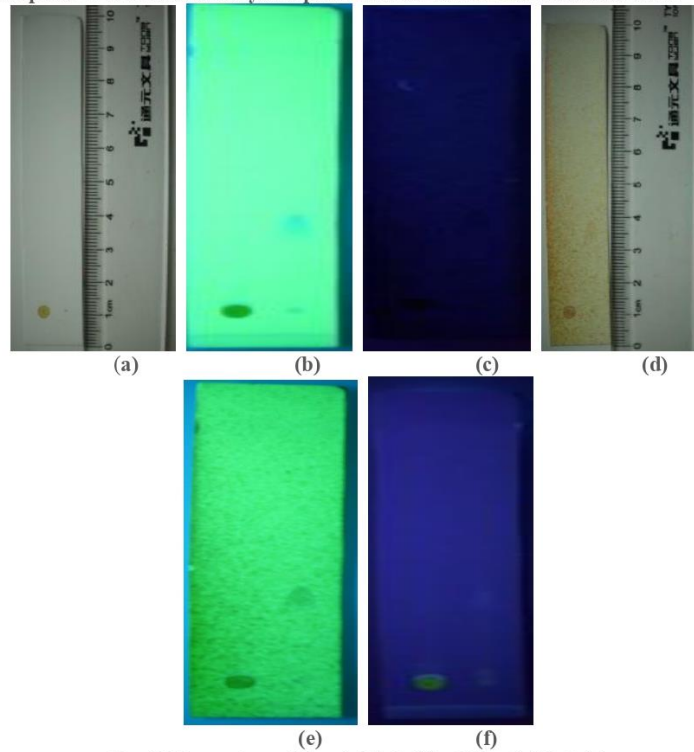
Rendemen ekstrak daun sirih merah

$$\text{Rendemen (\% b/b)} = \frac{31,355}{750} \times 100\% = 4,180 \%$$

Rendemen ekstrak buah mahkota dewa

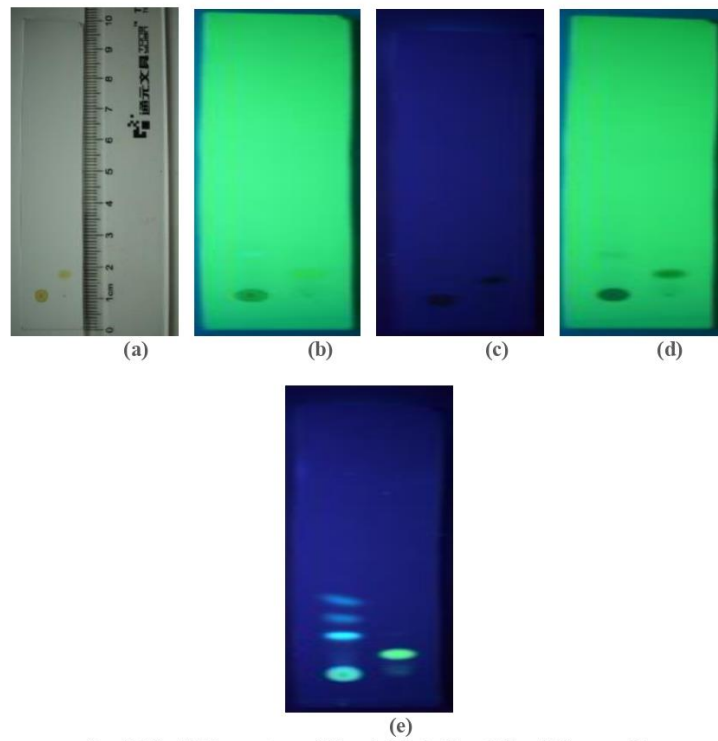
$$\text{Rendemen (\% b/b)} = \frac{28,226}{750} \times 100\% = 3,763 \%$$

Lampiran 8. Identifikasi senyawa pada ekstrak etanol buah mahkota dewa

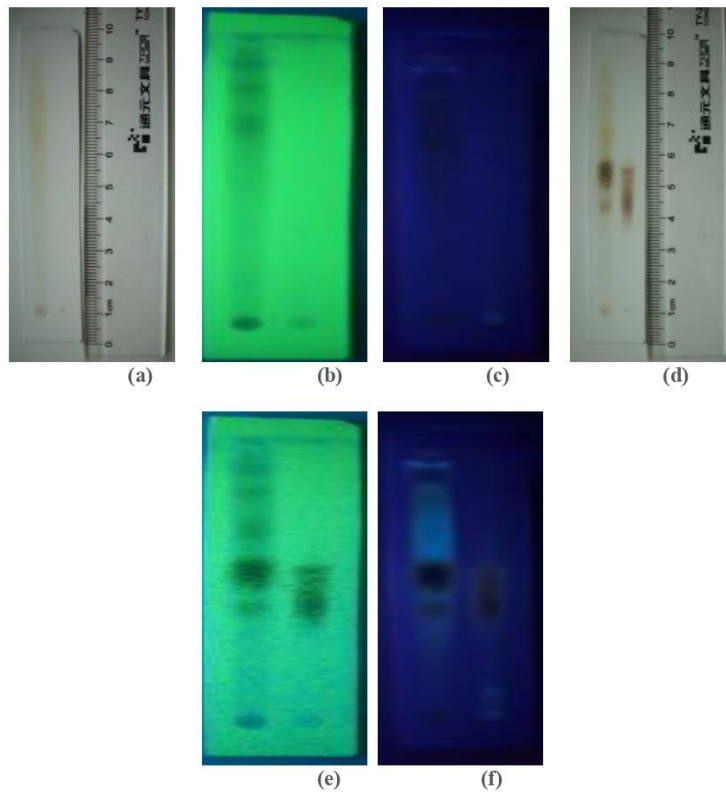


Profil Kromatografi Lapis Tipis Identifikasi Alkaloid
Keterangan : Fasediam : Silika Gel 60 F254
 Fasegerak : Toluena : etilasetat : dietilamin (7:2:1)
 Pembanding : Quinin 10 mg/1ml etanol
 Deteksi : Dragendorff

- a. Alkaloid sebelum spy di sinar tampak
- b. Alkaloid sebelum spy di uv 254
- c. Alkaloid sebelum spy di uv 366
- d. Alkaloid setelah spy di sinar tampak
- e. Alkaloid setelah spy di uv 254
- f. Alkaloid setelah spy di uv 366



- (e)
- Profil Hasil Kromatografi Lapis Tipis Identifikasi Flavonoid**
- Keterangan :** Flavonoid (quersetin)
 Fase diam : Silica Gel 60 F254
 Fase gerak : heksan : etilasetat : asamformiat (6:4:0,2)
 Pemandangan : quersetin 10 mg/1 ml etanol
 Deteksi : Sitroborat
- a. Flavonoid sebelum di spy sinar tampak
 - b. Flavonoid sebelum spy di uv 254
 - c. Flavonoid sebelum spy di uv 366
 - d. Flavonoid setelah spy di uv 254
 - e. Flavonoid setelah spy di uv 366



Profil Hasil Kromatografi Lapis Tipis Identifikasi Saponin

Keterangan : Saponin

Fase diam : Silika Gel 60 F254

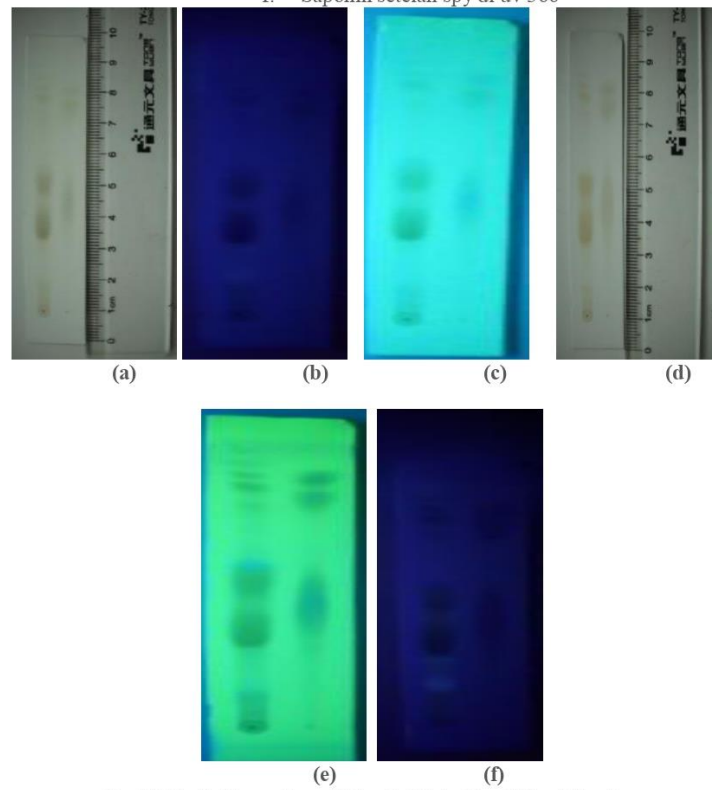
Fase gerak : Kloroform : metanol : air (64:50:1)

Pembanding : saponin 10 mg/1 ml etanol

Deteksi : Liberman Bourchat

- a. Saponin sebelum spy di sinar tampak
- b. Saponin sebelum spy di uv 254
- c. Saponin sebelum spy di uv 366
- d. Saponin setelah spy di sinar tampak
- e. Saponin setelah spy di uv 254

f. Saponin setelah spy di uv 366



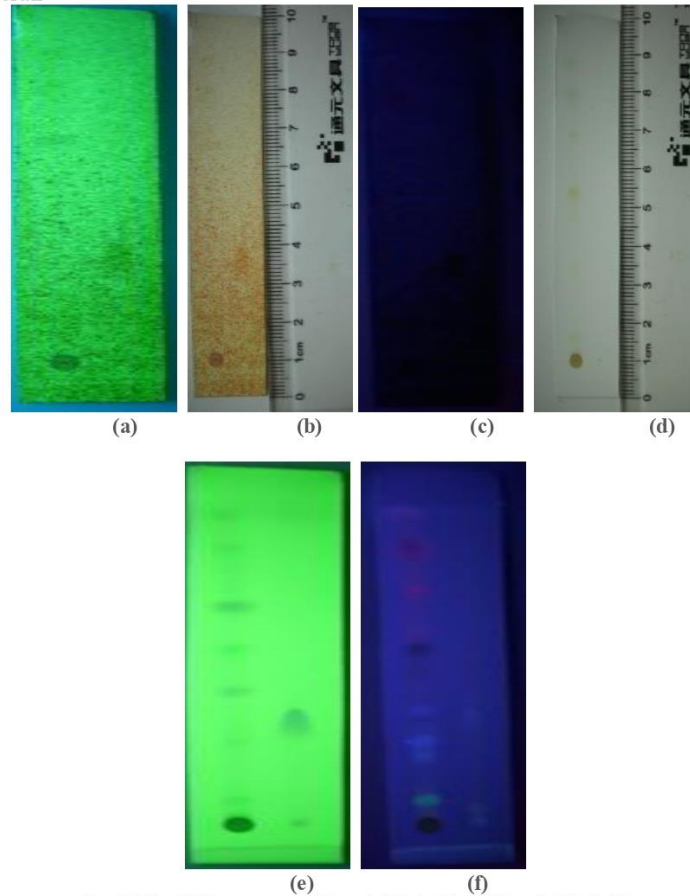
Profil Hasil Kromatografi Lapis Tipis Identifikasi Tanin

Keterangan : Tanin

- Fase diam : Silika Gel 60 F254
 Fase gerak : etil asetat : asam formiat : toluene : air (6:1,5:3:0,5)
 Pembanding : tanin 10 mg/1 mL etanol
 Deteksi : FeCl_3
- Tanin sebelum spy di sinar tampak
 - Tanin sebelum spy di uv 254
 - Tanin sebelum spy di uv 366
 - Tanin setelah spy di sinar tampak

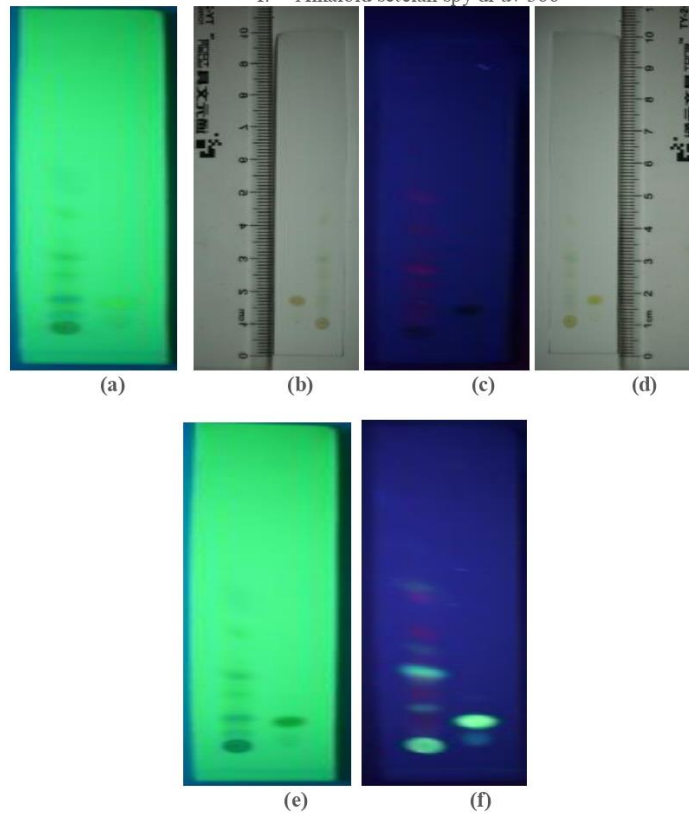
- e. Tanin setelah spy di uv 254
- f. Tanin setelah spy di uv 366

Lampiran 9. Identifikasi senyawa pada ekstrak etanol ekstrak etanol daun sirih merah



Profil Hasil Kromatografi Lapis Tipis Identifikasi Alkaloid
Keterangan : Fase diam : Silika Gel 60 F254
 Fase gerak : Toluena : etilasetat : dietilamin (7:2:1)
 Pembanding : Quinin 10 mg/1 ml etanol
 Deteksi : Dragendorf

- a. Alkaloid sebelum spy di sinar tampak
- b. Alkaloid sebelum spy di uv 254
- c. Alkaloid sebelum spy di uv 366
- d. Alkaloid setelah spy di sinar tampak
- e. Alkaloid setelah spy di uv 254
- f. Alkaloid setelah spy di uv 366

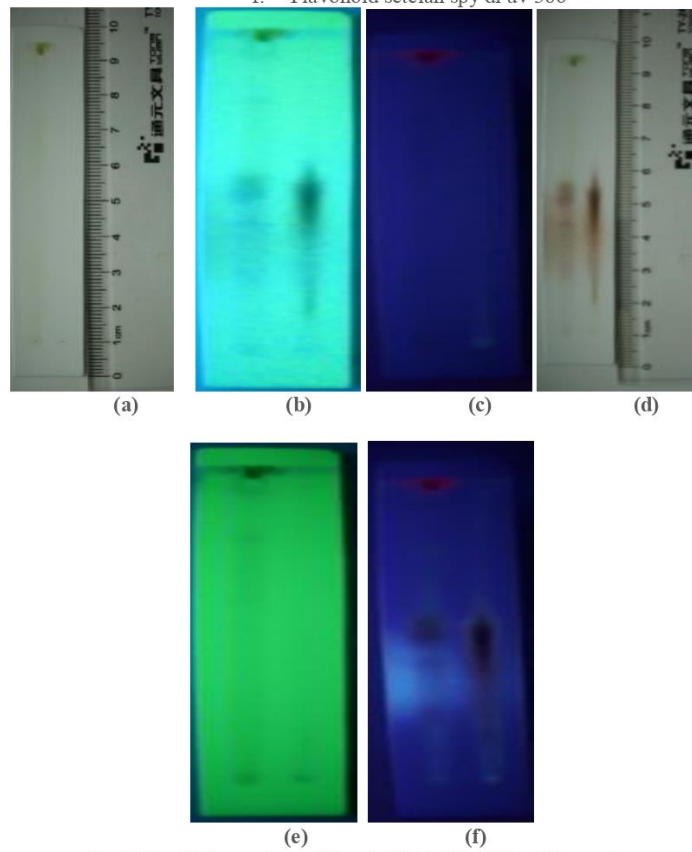


Profil Hasil Kromatografi Lapis Tipis Identifikasi Flavonoid
 Keterangan : Flavonoid (quersetin)
 Fasediam : Silika Gel 60 F254
 Fasegerak : heksan : etilasetat : asamformiat (6:4:0,2)

Pembanding : quersetin 10 mg/1 ml etanol

Deteksi : Sitroborat

- a. Flavonoid sebelum spy di sinar tampak
- b. Flavonoid sebelum spy di uv 254
- c. Flavonoid sebelum spy di uv 366
- d. Flavonoid setelah spy di sinar tampak
- e. Flavonoid setelah spy di uv 254
- f. Flavonoid setelah spy di uv 366



Profil Hasil Kromatografi Lapis Tipis Identifikasi Saponin

Keterangan : Saponin

Fase diam : Silika Gel 60 F254

Fase gerak : Kloroform : metanol : air (64:50:1)

Pembanding : saponin 10 mg/1ml etanol

Deteksi : Liberman Bourchat

a. Saponin sebelum spy di sinar tampak

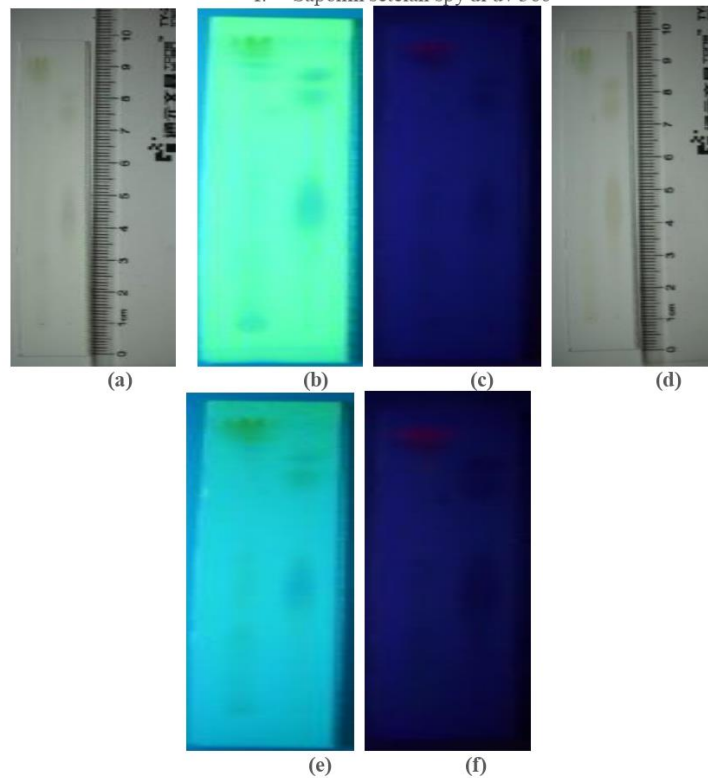
b. Saponin sebelum spy di uv 254

c. Saponin sebelum spy di uv 366

d. Saponin setelah spy di sinar tampak

e. Saponin setelah spy di uv 254

f. Saponin setelah spy di uv 366

**Profil Hasil Kromatografi Lapis Tipis Identifikasi Tanin**

Keterangan :Tanin

- Fase diam : Silika Gel 60 F254
Fase gerak : etil asetat : asam formiat : toluene : air (6:1,5:3:0,5)
Pembanding : tanin 10 mg/1 mL etanol
Deteksi : FeCl₃
- Tanin sebelum spy di sinar tampak
 - Tanin sebelum spy di uv 254
 - Tanin sebelum spy di uv 366
 - Tanin setelah spy di sinar tampak
 - Tanin setelah spy di uv 254
 - Tanin setelah spy di uv 366

Lampiran 10. Data hasil pengukuran kadar glukosa darah

Kelompok perlakuan	No	Kadar glukosa darah awal (mg/dL)	Kadar glukosa induksi	Kadar glukosa hari ke-12	Kadar glukosa hari ke-19	Persentase (t1)	Persentase (t2)
Kontrol normal (tanpa induksi)	1.	42,16	56,28	55,81	55,80	3,31	3,40
	2.	54,59	58,29	58,14	58,01	4,11	7,59
	3.	53,51	54,77	54,65	54,70	9,74	6,17
	4.	48,65	56,28	55,81	55,80	6,12	6,29
	5.	48,11	57,29	56,98	56,91	3,37	4,14
Rerata ± SD		49,41±4,96	56,58±0,26	56,28±1,33	56,24±1,26	5,33±2,71	5,52±1,71
Kontrol negatif (Na-CMC 1%)	1.	58,38	193,97	200,58	201,10	-4,88	-5,26
	2.	62,70	190,45	194,19	198,90	-2,92	-6,61
	3.	57,84	190,95	193,02	196,69	-1,55	-4,30
	4.	54,59	189,95	193,02	197,24	-2,27	-5,38
	5.	53,51	190,95	191,28	195,03	-0,24	-2,96
Rerata ± SD		57,41±3,61	191,26±1,57	194,42 ±3,60	197,79±2,31	-2,37±1,72	-4,90±1,36
Kontrol positif (Glibenklamid)	1.	63,24	195,98	162,21	116,57	25,44	59,82
	2.	62,16	194,47	167,44	119,89	20,43	56,37
	3.	61,62	189,95	165,12	115,47	19,35	58,04
	4.	58,92	189,45	161,05	117,68	21,76	54,98
	5.	56,22	185,43	163,95	117,13	16,62	52,86
Rerata ± SD		60,43±2,84	191,06±4,23	163,95 ±2,50	117,35±1,64	20,72±3,25	56,41±2,69
Ekstrak daun SM+MD dosis 50:100	1.	58,38	195,50	187,21	150,28	8,71	34,88
	2.	56,76	197,99	185,47	153,59	8,87	31,44
	3.	55,14	195,98	183,72	148,62	8,70	33,63
	4.	58,92	194,97	177,33	144,75	12,97	36,91
	5.	61,08	198,49	179,65	149,72	13,71	35,49
Rerata ± SD		58,05±2,25	197,39±1,86	182,67±4,10	149,39±1,38	7,45±3,19	24,32±2,07
Ekstrak daun SM+MD dosis 100:200	1.	55,14	191,96	166,28	121,55	18,77	51,46
	2.	56,76	193,47	166,86	120,99	19,46	53,01
	3.	59,46	190,95	165,12	126,52	19,65	49,00
	4.	63,24	189,95	166,28	129,83	18,68	47,44
	5.	60,54	192,96	162,21	128,18	23,22	48,92
Rerata ± SD		59,03±3,18	191,86±1,44	165,35 ±1,87	125,41±3,96	19,96±1,87	49,97±2,23

Lampiran 11. Prosedur preparasi dan pewarnaan jaringan pankreas dan hati tikus

1. Preparasi *slide* sampel jaringan pankreas dan hati

Preparasi *slide* sampel jaringan pankreas dan hati merupakan tahap awal yang dilakukan agar *slide* sampel dapat digunakan dalam proses *Immunohistochemistry* (IHC). Beberapa tahapan yang dilakukan dalam proses ini adalah sebagai berikut :

- a. Tikus sebanyak 25 ekor ditimbang satu persatu, dicatat kondisinya.
- b. Dianestesi dengan eter, dilanjutkan dengan kloral hidrat 3,5%, 1 ml/ 100 gram BB.
- c. Dibuka abdomen dan thorax.
- d. Diambil pankreas dan hati pada organ tikus, kemudian beri label dengan benang.

2. Proses pemotongan jaringan menggunakan paraffin

- a. Slide sampel disiapkan
- b. Dicuci dengan air mengalir selama 30 menit
- c. Dilakukan dehidrasi menggunakan etanol 70%, 80%, 90%, dan etanol absolut (sebanyak 3 kali) masing-masing selama 1 jam
- d. Dilakukan proses clearing menggunakan larutan xylen (sebanyak 3 kali) masing-masing selama 20 menit
- e. Dilakukan proses infiltrasi menggunakan paraffin (sebanyak 3 kali), kemudian dilanjutkan dengan perlakuan *embedding/paraffin block* pada jaringan pankreas dan hati

- f. Dilakukan pengecoran/pembuatan blok preparat menggunakan pot sampel kemudian dituangi paraffin yang telah dicairkan dan dilanjutkan dengan penanaman jaringan.
 - g. Dilakukan pemotongan blok preparat menggunakan mikrotom. Dibuat beberapa potongan untuk menghindari hilangnya jaringan saat deparafinasi
 - h. Dimasukkan ke dalam air hangat, tempelkan hasil potongan pada permukaan gelas obyek yang telah dilapisi gelatin
 - i. Dipanaskan gelas obyek pada permukaan *slide warmer* sampai kering.
3. Proses Pewarnaan Imunohistokimia
- a. Dilakukan deparafinasi menggunakan larutan xylol (sebanyak 3 kali) masing-masing selama 3 menit
 - b. Dilakukan rehidrasi menggunakan alkohol absolut (sebanyak 3 kali) kemudian dilanjutkan dengan alkohol 100%, 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing selama 3 menit
 - c. Dicuci dengan air mengalir selama 10 menit
 - d. Dimasukkan ke dalam *Destilated Water* (DW), kemudian di masukkan ke dalam mikrowave selama 10 menit
 - e. Dicuci menggunakan *Phospat Buffer Saline* (PBS) selama 5 menit
 - f. Dimasukkan ke dalam 30% H₂O₂ dalam methanol absolut (1:9) selama 15 menit
 - g. Dicuci menggunakan PBS (sebanyak 3 kali) masing-masing selama 5 menit
 - h. Digunakan DAKO PEN untuk melingkari batas jaringan pada gelas obyek

- i. Ditetesi antibodi primer 1:100 (antibodi antiGLUT-2)
- j. Diinkubasi selama semalam pada suhu 4°C
- k. Dicuci menggunakan PBS (sebanyak 3 kali) selama 5 menit
- l. Ditetesi Antibodi Sekunder + Enzim peroksidase
- m. Dicuci PBS (sebanyak 3 kali) masing-masing selama 5 menit
- n. Ditetesi Diaminobenzinin (DAB)
- o. Dichelupkan sekali ke dalam counterstain
- p. Dicuci dengan air mengalir selama 10 menit
- q. Dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol 70%, 80%, 95%, 90%, alkohol 100%, dan alkohol absolut (sebanyak 3 kali) masing-masing selama 2 menit
- r. Dilakukan proses *clearing* menggunakan larutan xylol (sebanyak 3 kali) selama 5 menit
- s. Dilakukan *mounting* menggunakan balsam kanada
- t. Dilakukan pengamatan hasil pewarnaan

4. Fotomikroskopi

Total sampel adalah sebanyak 20 sampel yang diperoleh dari 5 kelompok perlakuan, masing-masing dari perlakuan diambil 2 ekor tikus dan pengambilan 10 organ hati dan 10 organ pankreas.

5. Kuantifikasi translokasi protein GLUT-2

Masing-masing foto dilakukan kuantifikasi dengan menggunakan parameter luas dan intensitas translokasi protein GLUT-2. Kuantifikasi dibantu program

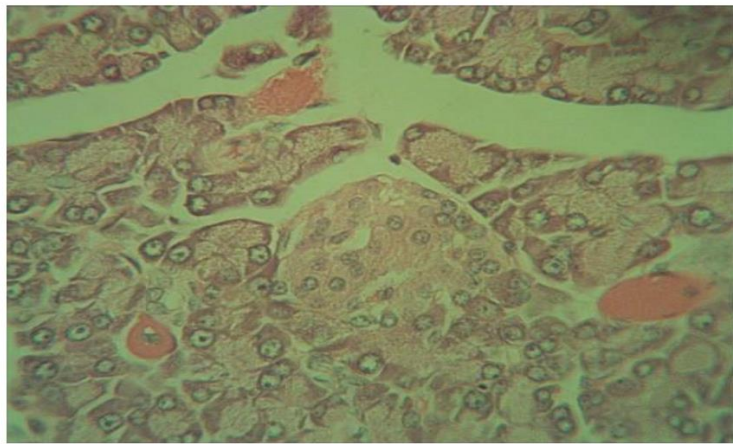
komputer *macbiophotonics image J* sampai diperoleh hasil luas dan intensitas protein GLUT-2. Adapun kuantifikasi protein GLUT-2 menggunakan program *macbiophotonics image J* dilakukan dengan cara sebagai berikut :

- a. Dilakukan pengambilan gambar dengan perbesaran 40 kali dimensi 1024 x 768, simpan.
- b. Buka program *macbiophotonics image J*.
- c. Klik *analyze, set measurements*, klik *area*, klik *standard deviation*, klik *min & max gray value*, dan klik *mean gray value*.
- d. Klik *file, open*, cari gambar yang akan diedit dengan *klik open*.
- e. Setelah gambar terbuka, klik *analyze, tools*, klik *ROI manager*.
- f. Setelah tampil *ROI manager*, dilakukan *check list show all* dan *edit mode* pada bagian bawah tampilan.
- g. Dilakukan *selections* terhadap *area* GLUT-2 menggunakan *polygon selections*, klik *polygon selections* pada tampilan *image J*.
- h. Hindari *selections* pada sinusoid hepatosit yang terletak pada membran yang berwarna putih. sinusoid yang berwarna putih dapat memberikan intensitas yang tinggi, sehingga mempengaruhi objektivitas pengukuran.
- i. Setelah dilakukan *selections*, klik *add* pada tampilan *ROI manager*.
- j. Dilakukan *selections-selections* berikutnya, klik *add* pada tampilan *ROI manager*

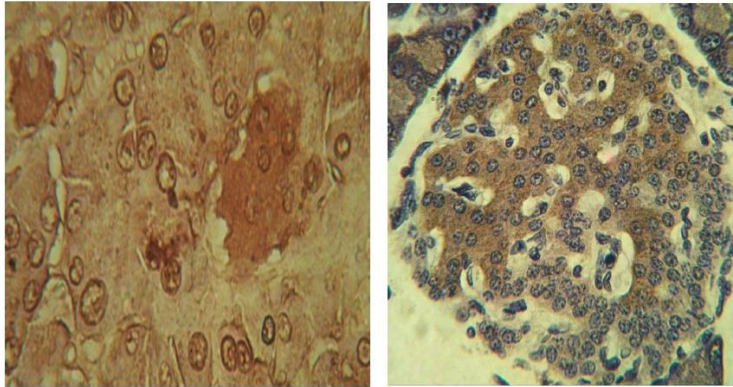
- k. Apabila seluruh *selections* telah dilakukan, klik *measure*, untuk melihat hasil luas (*area*), intensitas (*mean*) dan kerapatan (*density*). Data hasil dapat disimpan dan dapat disalin ke program *Microsoft office excel*.

Lampiran 11. Hasil pewarnaan secara *Immunohistochemistry* (IHC) tiap kelompok perlakuan

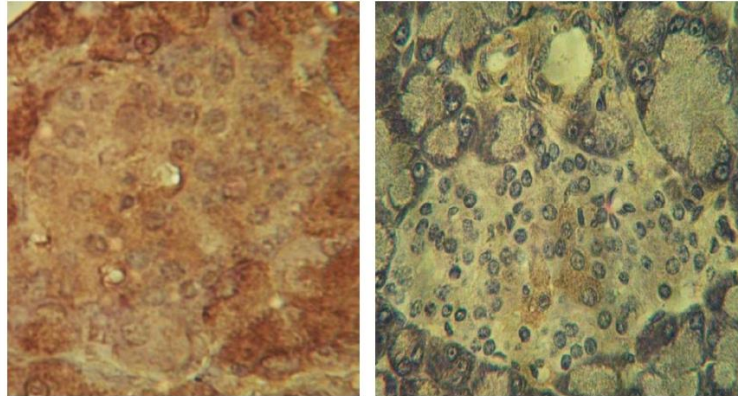
Kontrol
Normal



Hematoksilin dan Eosin pada pulau Langerhans.

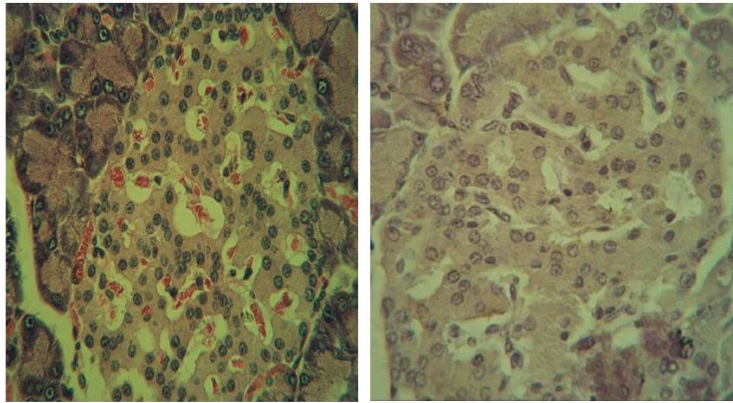


Imunohistokimia (IHC) GLUT2 dalam sel β pulau Langerhans. Gambar menunjukkan hasil GLUT 2 pada hewan uji kelompok kontrol normal tanpa pemberian STZ-NA selama 14 hari.



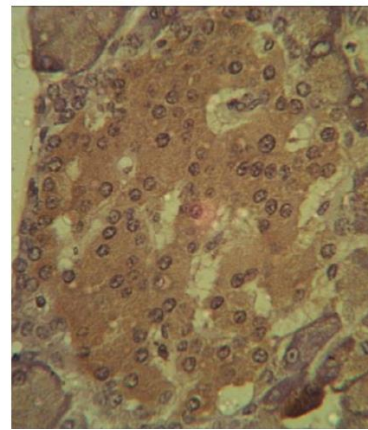
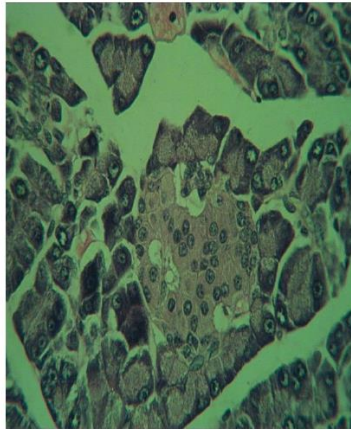
Imunohistokimia (IHC) GLUT2 dalam sel β pulau Langerhans. Gambar menunjukkan hasil GLUT 2 pada hewan uji kelompok kontrol negatif yang telah diberikan STZ-NA selama 14 hari.

**Kontrol
Positif**



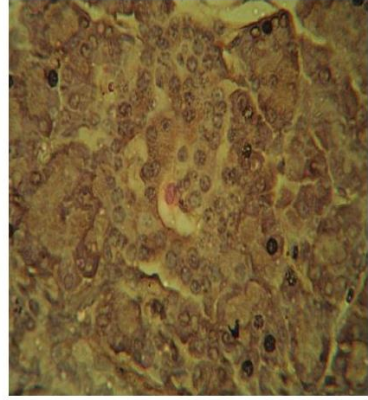
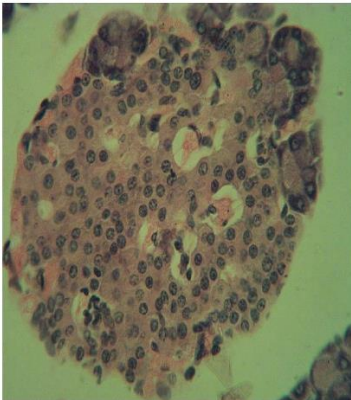
Hematoksilin dan Eosin pada pulau Langerhans (Kiri). Imunohistokimia (IHC) GLUT2 dalam sel β pulau Langerhans. Gambar menunjukkan hasil GLUT 2 pada hewan uji terapi Glibenklamid yang telah diberikan STZ-NA setelah 14 hari (Kanan).

**Kombinasi
I SM:MD
dosis
50:100**



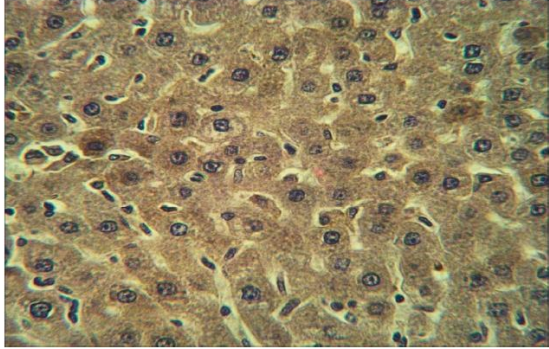
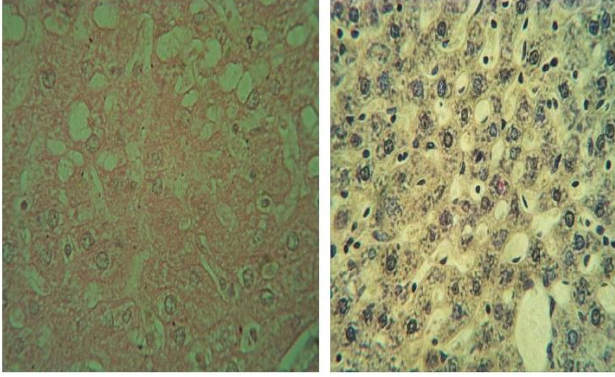
Hematoksilin dan Eosin pada pulau Langerhans (Kiri). Imunohistokimia (IHC) GLUT2 dalam sel β pulau Langerhans. Gambar menunjukkan hasil GLUT 2 pada hewan uji terapi kombinasi I dengan pemberian STZ-NA setelah 14 hari (kanan).

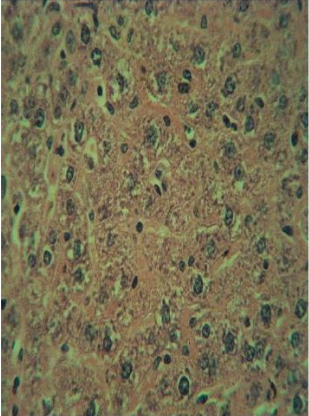
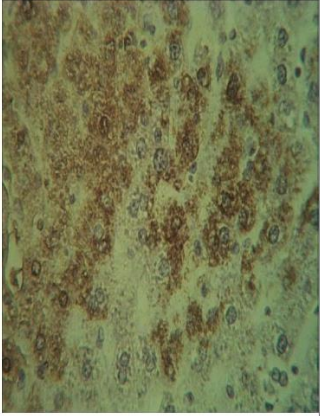
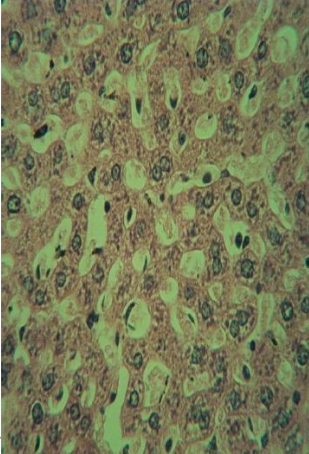
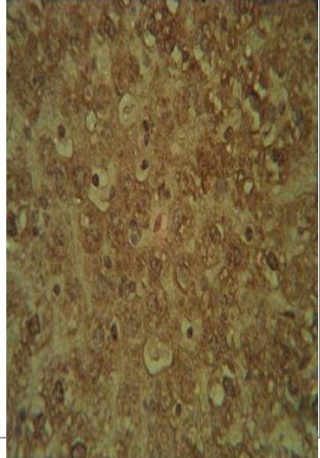
**Kombinasi
II SM:MD
dosis
100:200**

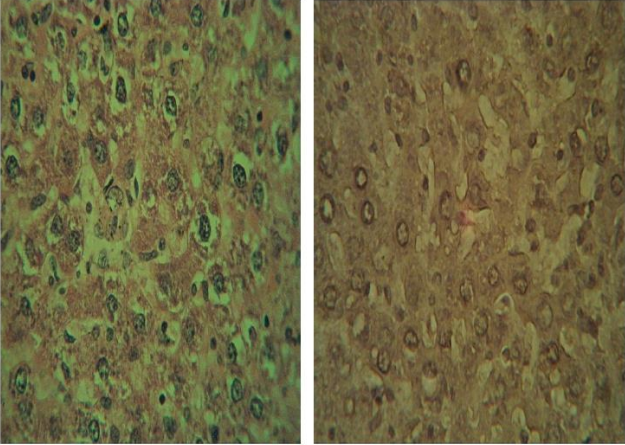


Hematoksilin dan Eosin pada pulau Langerhans (kiri). Imunohistokimia (IHC) GLUT2 dalam sel β pulau Langerhans. Gambar menunjukkan hasil GLUT 2 pada hewan uji terapi kombinasi II dengan pemberian STZ-NA setelah 14 hari (Kanan).

Hasil pewarnaan secara Hematoksilin dan Eosin, serta *Immunohistochemistry* (IHC) tiap kelompok perlakuan terhadap Jaringan Hepatosit

Kelompok perlakuan	Hasil Foto H&E dan IHC
<p>Kontrol Negatif</p>	 <p>Imunohistokimia (IHC) GLUT2 dalam jaringan Hepatosit. Gambar menunjukkan hasil GLUT 2 pada hewan uji kelompok negatif tanpa pemberian STZ-NA setelah 14 hari</p>
<p>Kontrol normal</p>	 <p>Hematoksilin dan Eosin pada Organ Hati (Kiri). Imunohistokimia (IHC) GLUT2 dalam jaringan Hepatosit. Gambar menunjukkan hasil</p>

	GLUT 2 pada hewan uji kelompok normal dengan pemberian STZ-NA setelah 14 hari (Kanan).	
Kontrol positif (Glibenklamid)		
	Hematoksilin dan Eosin pada Organ Hati (Kiri). Imunohistokimia (IHC) GLUT2 dalam jaringan Hepatosit. Gambar menunjukkan hasil GLUT2 pada hewan uji terapi Glibenklamid dengan pemberian STZ-NA setelah 14 hari (Kanan)	
Kombinasi SM+MD dosis 50:100		

<p>Kombinasi SM+MD dosis 100:200</p>	<p>Hematoksilin dan Eosin pada Organ Hati (Kiri). Imunohistokimia (IHC) GLUT2 dalam jaringan Hepatosit. Gambar menunjukkan hasil GLUT 2 pada hewan uji terapi kombinasi I dengan pemberian STZ-NA setelah 14 hari (Kanan).</p>  <p>Hematoksilin dan Eosin pada Organ Hati (Kiri). Imunohistokimia (IHC) GLUT2 dalam jaringan Hepatosit. Gambar menunjukkan hasil GLUT 2 pada hewan uji terapi kombinasi II dengan pemberian STZ-NA setelah 14 hari (Kanan).</p>
---	--

Lampiran 12. Analisis statistik

1. Uji Distribusi Normal Shapiro-wilk
 - a. Tujuan : Untuk mengetahui kenormalan data sebagai syarat uji ANOVA
 - b. Kriteria uji : Sig < 0,05 berarti tidak terdistribusi normal, sehingga perlu dilanjutkan uji non parametrik. Sig > 0,05 berarti terdistribusi normal, sehingga dilanjutkan uji independent samples test pada tikus normal dan tikus induksi hari ke-5, serta uji parametrik pada kelompok kontrol normal, negatif, positif, dan kelompok pemberian terapi ekstrak daun sirih merah dan buah mahkota dewa hari ke-12 dan 19
 - c. Hasil :

Kelompok tikus normal dengan kelompok tikus induksi STZ-NA

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kontrol_normal	.209	5	.200*	.969	5	.871
kontrol_induksi	.377	5	.019	.787	5	.063

a. Lilliefors Significance Correction

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

T-Test**Group Statistics**

kelompokperlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
normal_negatif Kontrolnormal	5	56.5820	1.31190	.58670
Pemberian Induksi STZNA	5	191.2540	1.57387	.70386

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
normal_negatif	Equal variances assumed	.046	.835	-146.972	8	.000	-134.67200	.91631	-136.78502	-132.55898
	Equal variances not assumed			-146.972	7.749	.000	-134.67200	.91631	-136.79701	-132.54699

Kesimpulan :

Pada independent samples t-test kriteria uji yang dipakai adalah nilai Sig. (2-tailed) pada kolom *Equal variances not assumed*, yang artinya bahwa tidak diasumsikan dalam varian yang sama. Nilai Sig. (2-tailed) = .000 (< 0,05). Jadi terdapat perbedaan yang signifikan antar kadar glukosa tikus tanpa induksi (kontrol normal) dengan kelompok tikus yang diinduksi STZ-NA.

Uji distribusi normal Shapiro-wilk Test terhadap persentase penurunan kadar glukosa darah pada hari ke-1 hingga hari ke-12 (t1)

Tests of Normality

kelompok_perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
hipoglikemik12 kontrolnormal	.273	5	.200*	.827	5	.132
kontrolnegatif	.175	5	.200*	.986	5	.965
kontrolpositif	.174	5	.200*	.986	5	.962
kombinasi I	.226	5	.200*	.910	5	.466
kombinasi II	.182	5	.200*	.949	5	.732

a. Lilliefors Significance Correction

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

Kesimpulan :

Dari hasil statistik diatas, nilai signifikansi pada persentase penurunan kadar glukosa darah (t1), signifikansi > 0,05, maka Ho diterima. Pada Sig. (> 0,05), artinya data terdistribusi normal sehingga dapat dilanjutkan uji parametrik (one-way Anova).

Uji distribusi normal Shapiro-wilk Test terhadap persentase penurunan kadar glukosa darah pada hari ke-1 hingga hari ke-19 (t2)

Tests of Normality

kelompok_per lakukan	Kolmogorov-Smimov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
hipoglikemik_1 kontrol normal	.248	5	.200*	.933	5	.617
9 kontrol negatif	.212	5	.200*	.963	5	.832
kontrol positif	.127	5	.200*	.995	5	.993
kombinasi I	.179	5	.200*	.964	5	.838
kombinasi II	.268	5	.200*	.935	5	.634

a. Lilliefors Significance Correction

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

Kesimpulan :

Dari hasil statistik diatas, nilai signifikansi pada persentase penurunan kadar glukosa darah (t2), signifikansi > 0,05, maka Ho diterima. Pada Asymp. Sig. (> 0,05), artinya data terdistribusi normal sehingga dapat dilanjutkan uji parametrik (one-way Anova).

2. Uji homogenitas *varian levene* terhadap persentase penurunan kadar glukosa darah pada hari ke-1 hingga hari ke-12 (t1)

a. Tujuan : untuk mengetahui kenormalan data sebagai syarat uji ANOVA

b. Hipotesis :

Ho = data persentase penurunan kadar glukosa darah berasal dari kelompok yang terdistribusi normal

Ha = data persentase penurunan kadar glukosa darah berasal dari kelompok yang tidak terdistribusi normal

Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

c. Hasil :

Test of Homogeneity of Variances

hipoglikemik12

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.472	4	20	.756

Kesimpulan :

Nilai signifikansi pada persentase penurunan kadar glukosa darah berdasarkan *Levene statistic* diperoleh 0,756 > 0,05, maka Ho diterima. Data persentase penurunan kadar glukosa darah pada hari ke-1 hingga hari ke-12 homogen.

Uji homogenitas *varian levene* terhadap persentase penurunan kadar glukosa darah pada hari ke-1 hingga hari ke-19 (t2)

Test of Homogeneity of Variances

hipoglikemik_19

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.791	4	20	.545

Kesimpulan :

Nilai signifikansi pada persentase penurunan kadar glukosa darah berdasarkan *Levene statistic* diperoleh $0,545 > 0,05$, maka H_0 diterima. Data persentase penurunan kadar glukosa darah pada hari ke-1 hingga hari ke-19 homogen.

Uji homogenitas *varian levene* terhadap AUC total pada hari ke-1 hingga hari ke-19

Test of Homogeneity of Variances

AUC_Total

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.468	3	16	.261

Kesimpulan :

Nilai signifikansi AUC total berdasarkan *Levene statistic* diperoleh $0,261 > 0,05$, maka H_0 diterima. Data persentase penurunan kadar glukosa darah pada hari ke-1 hingga hari ke-19 homogen. Uji analisis variansi (ANOVA 1-Arah) terhadap AUC total pada hari ke-1 hingga hari ke-

3. Uji analisis variansi (one-way ANOVA) terhadap persentase penurunan kadar glukosa darah pada hari ke-1 hingga hari ke-12 (t_1)
 - a. Tujuan : untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan persentase penurunan kadar glukosa darah pada (t_1) dan (t_2)
 - b. Hipotesis :
 - H_0 = data persentase penurunan kadar glukosa darah berasal dari kelompok yang terdistribusi normal
 - H_a = data persentase penurunan kadar glukosa darah berasal dari kelompok yang tidak terdistribusi normal.
 - c. Kriteria Uji :
 - Sig. $< 0,05$ berarti H_0 ditolak
 - Sig. $> 0,05$ berarti H_0 diterima
 - d. Hasil :

ANOVA

hipoglikemik12

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)	1172.930	4	293.232	42.118	.000
	Linear Contrast	484.601	1	484.601	69.605	.000
	Term Deviation	688.329	3	229.443	32.956	.000
Within Groups		139.242	20	6.962		
Total		1312.172	24			

Kesimpulan :

Nilai signifikansi pada persentase penurunan kadar glukosa darah $< 0,05$, maka H_0 ditolak. Data persentase menunjukkan perbedaan secara bermakna pada hari ke-1 hingga hari ke 12 (t_1). Untuk mengetahui perbedaan signifikansi pada masing-masing perlakuan dilanjutkan dengan uji Tukey.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

hipoglikemik12
Tukey HSD

(I) kelompok_perla kuan	(J) kelompok_perla kuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrolnormal	kontrolnegatif	2.95800	1.66878	.416	-2.0356	7.9516
	kontrolpositif	-15.39000*	1.66878	.000	-20.3836	-10.3964
	kombinasi I	-5.26200*	1.66878	.036	-10.2556	-.2684
	kombinasi II	-11.45600*	1.66878	.000	-16.4496	-6.4624
kontrolnegatif	kontrolnormal	-2.95800	1.66878	.416	-7.9516	2.0356
	kontrolpositif	-18.34800*	1.66878	.000	-23.3416	-13.3544
	kombinasi I	-8.22000*	1.66878	.001	-13.2136	-3.2264
	kombinasi II	-14.41400*	1.66878	.000	-19.4076	-9.4204
kontrolpositif	kontrolnormal	15.39000*	1.66878	.000	10.3964	20.3836
	kontrolnegatif	18.34800*	1.66878	.000	13.3544	23.3416
	kombinasi I	10.12800*	1.66878	.000	5.1344	15.1216
	kombinasi II	3.93400	1.66878	.168	-1.0596	8.9276
kombinasi I	kontrolnormal	5.26200*	1.66878	.036	.2684	10.2556
	kontrolnegatif	8.22000*	1.66878	.001	3.2264	13.2136
	kontrolpositif	-10.12800*	1.66878	.000	-15.1216	-5.1344
	kombinasi II	-6.19400*	1.66878	.011	-11.1876	-1.2004
kombinasi II	kontrolnormal	11.45600*	1.66878	.000	6.4624	16.4496
	kontrolnegatif	14.41400*	1.66878	.000	9.4204	19.4076
	kontrolpositif	-3.93400	1.66878	.168	-8.9276	1.0596
	kombinasi I	6.19400*	1.66878	.011	1.2004	11.1876

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

Homogeneous Subsets**hipoglikemik12**Tukey HSD^a

kelompok_perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
kontrolnegatif	5	2.3720		
kontrolnormal	5	5.3300		
kombinasi I	5		10.5920	
kombinasi II	5			16.7860
kontrolpositif	5			20.7200
Sig.		.416	1.000	.168

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Uji analisis variansi (ANOVA 1-Arah) terhadap persentase penurunan kadar glukosa darah pada hari ke-1 hingga hari ke-19 (t2)

ANOVA

hipoglikemik_19

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between (Combined)	11680.437	4	2920.109	735.018	.000
Groups					
Linear Contrast	6820.419	1	6820.419	1716.76	.000
Term				2	
Deviation	4860.018	3	1620.006	407.770	.000
Within Groups	79.457	20	3.973		
Total	11759.894	24			

Kesimpulan :

Nilai signifikansi pada persentase penurunan kadar glukosa darah $< 0,05$, maka H_0 ditolak. Data persentase menunjukkan perbedaan secara bermakna pada hari ke-1 hingga hari ke-19 (t_2). Untuk mengetahui perbedaan signifikansi pada masing-masing perlakuan dilanjutkan dengan uji Tukey.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

hipoglikemik_19
Tukey HSD

(I) kelompok_perlak uan	(J) kelompok_perlak uan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol normal	kontrol negatif	.67600	1.26061	.982	-3.0962	4.4482
	kontrol positif	-50.89600*	1.26061	.000	-54.6682	-47.1238
	kombinasi I	-27.22200*	1.26061	.000	-30.9942	-23.4498
	kombinasi II	-44.44800*	1.26061	.000	-48.2202	-40.6758
kontrol negatif	kontrol normal	-.67600	1.26061	.982	-4.4482	3.0962
	kontrol positif	-51.57200*	1.26061	.000	-55.3442	-47.7998
	kombinasi I	-27.89800*	1.26061	.000	-31.6702	-24.1258
	kombinasi II	-45.12400*	1.26061	.000	-48.8962	-41.3518
kontrol positif	kontrol normal	50.89600*	1.26061	.000	47.1238	54.6682
	kontrol negatif	51.57200*	1.26061	.000	47.7998	55.3442
	kombinasi I	23.67400*	1.26061	.000	19.9018	27.4462
	kombinasi II	6.44800*	1.26061	.000	2.6758	10.2202
kombinasi I	kontrol normal	27.22200*	1.26061	.000	23.4498	30.9942
	kontrol negatif	27.89800*	1.26061	.000	24.1258	31.6702
	kontrol positif	-23.67400*	1.26061	.000	-27.4462	-19.9018
	kombinasi II	-17.22600*	1.26061	.000	-20.9982	-13.4538
kombinasi II	kontrol normal	44.44800*	1.26061	.000	40.6758	48.2202
	kontrol negatif	45.12400*	1.26061	.000	41.3518	48.8962
	kontrol positif	-6.44800*	1.26061	.000	-10.2202	-2.6758
	kombinasi I	17.22600*	1.26061	.000	13.4538	20.9982

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

Homogeneous Subsets**hipoglikemik_19**Tukey HSD^a

kelompok perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
kontrol negatif	5	4.8420			
kontrol normal	5	5.5180			
kombinasi I	5		32.7400		
kombinasi II	5			49.9660	
kontrol positif	5				56.4140
Sig.		.982	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.