

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Ekstraksi Biji Jintan Hitam

Thymoquinone yang merupakan zat aktif dalam penelitian ini, sedikit larut dalam air, mudah larut dalam alkohol, eter, kloroform dan benzene (Sethi, 2003). Oleh karena itu, pelarut yang digunakan dalam ekstraksi jintan hitam dalam penelitian ini adalah etanol 80% yang merupakan golongan alkohol. Etanol merupakan pelarut yang direkomendasikan di Farmakope Indonesia III. Konsentrasi 80% menunjukkan perbandingan etanol dan air.

Berdasarkan jurnal yang ditulis oleh Ali Benhaddou-Andaloussi tentang efek ekstrak biji jintan hitam terhadap glukosa darah pada tikus diabetes, perbandingan antara serbuk biji jintan hitam dan pelarut adalah 1:10 pada awalnya, namun setelah dilakukan maserasi dengan perbandingan tersebut didapatkan larutan yang encer, sehingga dibutuhkan waktu yang sangat lama untuk mengevaporasi. Kemudian dilakukan penyesuaian, menggunakan perbandingan 1:5.

. Pengadukan bertujuan untuk mengacaukan kesetimbangan zat aktif yang terdifusi, mengingat prinsip dasar maserasi merupakan difusi zat aktif berdasarkan konsentrasi, berpindah dari bagian yang berkonsentrasi tinggi menuju bagian yang berkonsentrasi rendah hingga kedua bagian memiliki konsentrasi yang sama atau disebut seimbang. Dengan pengadukan diharapkan keseimbangan konsentrasi terus berubah sehingga proses difusi zat aktif dari serbuk ke etanol dapat terjadi lebih maksimal. Pengadukan menggunakan stirer

selama 1 jam dengan kecepatan 510 rpm. Tidak terdapat ketentuan pasti mengenai kecepatan pengadukan, yang terpenting adalah kecepatan pengadukan konstan selama 1 jam.

Maserasi dilakukan selama 24 jam sesuai dengan jurnal Ali Benhaddou-Andaloussi tahun 2011 yang dirujuk. Remaserasi merupakan maserasi yang diulangi kembali, berguna untuk mengambil zat-zat yang mungkin tersisa pada saat maserasi, oleh karena itu konsentrasi alkohol yang digunakan tidak setinggi saat maserasi. Hasil penyaringan dari proses maserasi dan remaserasi diupayakan menggunakan *rotatory evaporator* hingga terbentuk ekstrak pekat. Suhu yang digunakan adalah 40°C agar *thymoquinone* tidak rusak, karena *thymoquinone* memiliki titik leleh 44-47° C dan titik didih 230-232° C (Aggarwal *et al.*, 2011). Kecepatan putaran *rotatory evaporator* yang digunakan adalah 40 rpm, hal tersebut didasarkan pada beberapa kali percobaan yang dilakukan untuk memperoleh kecepatan paling tinggi, namun tanpa *bumping*.

Hasil dari proses evaporasi di oven pada suhu 40°C untuk mendapatkan ekstrak yang lebih pekat. Pengovenan pada suhu 40°C dilakukan selama 1 malam, namun hasilnya belum pekat juga. Kemudian dipindahkan ke suhu 37°C selama 3 hari, namun hasil yang didapatkan juga belum pekat. Sehingga, dilakukan evaporasi kembali menggunakan *rotatory evaporator*. Hal ini tidak merusak thymoquinone karena dibawah titik leleh 44-47° C dan titik didih 230-232° C (Aggarwal *et al.*, 2011). Kerugian dari evaporasi kembali ini adalah tertinggalnya ekstrak kental di labu alas bulat cukup banyak, karena ekstrak kental sulit diambil dari labu alas bulat. Dari 200 gram serbuk biji jintan hitam, didapatkan ekstrak kental sejumlah 33 gram.

6.2 Uji Fitokimia Ekstrak Biji Jintan Hitam

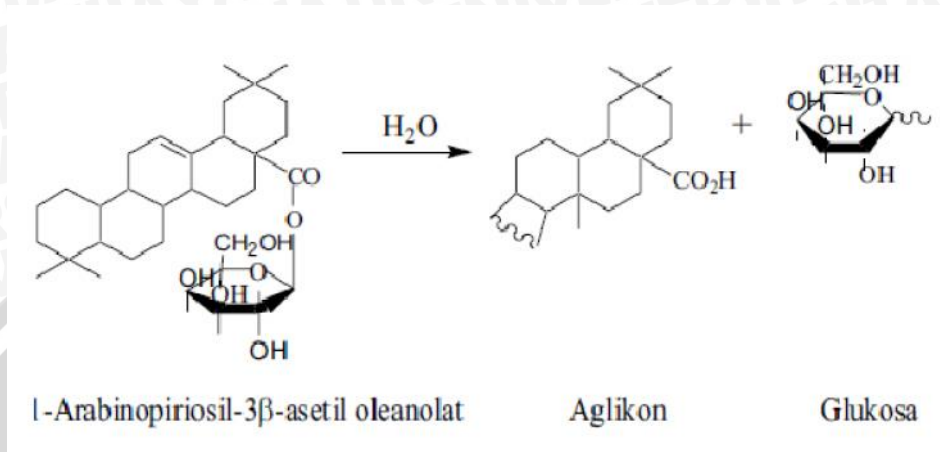
Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan ekstrak biji jintan hitam. Zat aktif biji jintan hitam yang digunakan sebagai antidiabetes adalah *thymoquinone*, termasuk dalam golongan minyak atsiri. Namun, uji fitokimia yang dilakukan tidak hanya uji minyak atsiri, hal ini sesuai dengan prinsip pengobatan herbal, dimana setiap komponen dimungkinkan memiliki pengaruh terhadap potensi tanaman sebagai obat.

6.2.1 Uji Saponin

Jurnal yang ditulis oleh M. Al-Attar tahun 2010 disebutkan bahwa kandungan jintan hitam adalah *fixed oil*, protein, alkaloid, saponin dan *essential oil*, oleh karena itu perlu dilakukan uji saponin. Pada jurnal yang berjudul Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu dalam Ekstrak Etanol oleh Soerya Dewi Marlina tahun 2005 menyebutkan waktu pengocokan adalah 30 detik, pada jurnal oleh Devmurari tahun 2010 yang berjudul *Phytochemical screening study and antibacterial evaluation of Symplocos racemosa Roxb* menyebutkan waktu pengocokan adalah 15 menit. Pada jurnal yang ditulis oleh Natalini Nova Kristina tahun 2009, waktu pengocokan optimal adalah 10 menit, dan pada penelitian ini digunakan waktu pengocokan 15 menit sesuai dengan jurnal oleh Devmurari tahun 2010 untuk mendapatkan busa yang optimal namun masih tetap dapat menjaga konsistensi kekuatan pengocokan, mengingat pengocokan tidak dilakukan menggunakan mesin.

Timbulnya busa setelah pengocokan menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis

menjadi glukosa dan senyawa aglikon (Marliana, 2005) . Berikut merupakan reaksi timbulnya busa pada uji saponin



Gambar 6.1 Reaksi hidrolisis saponin
Marliana, 2005

Pada penelitian ini terbentuk busa namun tidak stabil dan tidak tingginya kurang dari 3 cm, sehingga hasil uji saponin dinyatakan negatif. Berdasarkan jurnal Padmaa M Paarakh tahun 2009 terdapat kandungan saponin dalam jintan hitam herba, namun dalam biji kandungan tersebut tidak ditemukan (Paarakh, 2009). Pada penelitian kali ini zat aktif yang diinginkan adalah golongan minyak atsiri, sehingga hasil negatif pada uji saponin ini tidak menjadi masalah.

6.2.2 Uji Minyak Atsiri

Thymoquinone merupakan zat aktif yang berfungsi sebagai antidiabetes merupakan golongan minyak atsiri (Gali-Muhtasib *et al.*, 2006), sehingga perlu dilakukan uji minyak atsiri dalam ekstrak. Ekstrak ditetaskan ke *plate* berwarna putih agar perubahan warna nampak jelas, untuk mengetahui terjadinya perubahan maka dibuat dua tetesan ekstrak ke plate, satu sebagai kontrol untuk membandingkan perubahan warna yang terjadi. Selanjutnya ditambahkan sudan

III sebanyak 3 tetes. Perubahan menjadi merah diamati dengan membandingkan plate uji dengan kontrol.

Uji minyak atsiri menggunakan sudan III menunjukkan hasil positif, ditandai dengan perubahan warna menjadi merah pada ekstrak. *Thymoquinone* merupakan zat aktif yang digunakan dalam penelitian kali ini, dan merupakan golongan minyak atsiri. Hasil positif dari uji ini menunjukkan kemungkinan keberadaan *thymoquinone* dalam ekstrak, sehingga ekstrak dapat berefek. Namun, hal tersebut belum dapat dipastikan, karena tidak dilakukan identifikasi *thymoquinone* yang lebih spesifik seperti menggunakan KLT (Kromatografi Lapis Tipis).

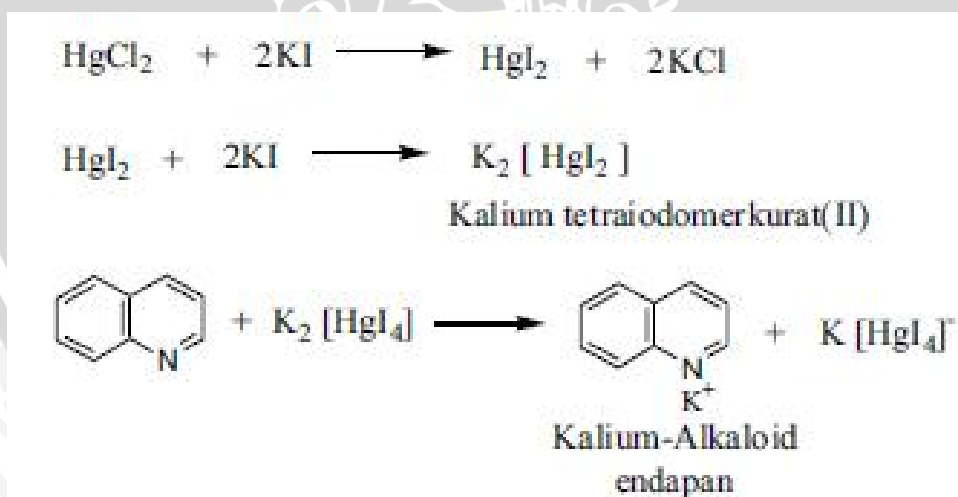
6.2.3 Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan karena dalam jurnal oleh Gali-Muhtasib tahun 2006, disebutkan bahwa salah-satu kandungan biji jintan hitam adalah alkaloid. Prinsip uji alkaloid adalah pemberian reagen yang dapat berinteraksi dengan nitrogen bebas pada alkaloid sehingga terbentuk endapan (Marliana, 2005).

Prose uji alkaloid membutuhkan penyiapan ekstrak terlebih dahulu, penambahan HCl perlu dilakukan karena alkaloid bersifat basa sehingga biasanya diekstrak dengan pelarut yang mengandung asam dan pemanasan bertujuan mempercepat proses ekstraksi alkaloid (Marliana, 2005). Ekstrak yang telah panas ditunggu hingga dingin untuk selanjutnya ditambah NaCl untuk mengendapkan protein yang dimungkinkan ada di ekstrak tersebut. Selanjutnya dilakukan penyaringan agar protein yang terpresipitasi dapat dipisahkan. Adanya endapan protein dalam ekstrak dapat menyebabkan positif palsu, karena protein juga dapat berinteraksi dengan logam berat membentuk endapan (Marliana,

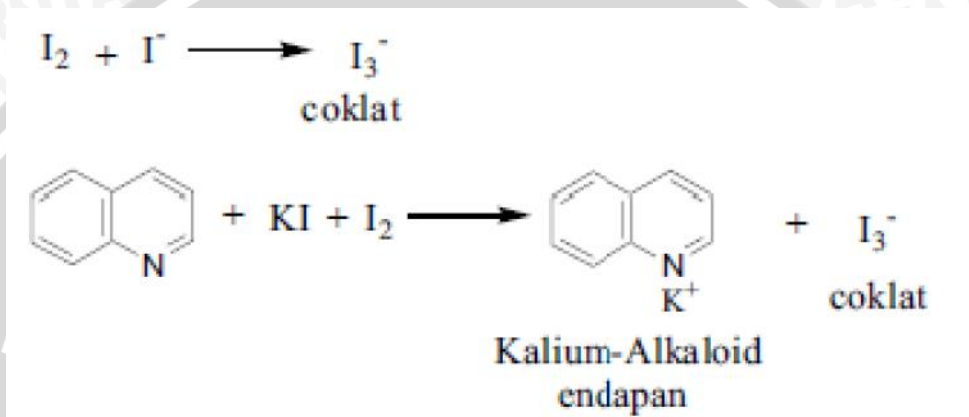
2005). Sampel yang telah didapat dibagi menjadi tiga larutan, larutan A untuk uji alkaloid dengan reagen wagner (*Iodin dalam kalium iodida*), larutan B menggunakan reagen meyer (*Potassium Mercuric Iodide*) dan larutan C sebagai kontrol berupa ekstrak tanpa pereaksi. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan setelah pemberian reagen, sehingga kontrol dibutuhkan untuk membandingkan terjadinya perubahan tersebut.

Terbentuknya endapan putih merupakan hasil positif pada uji alkaloid menggunakan reagen meyer (*Potassium Mercuric Iodide*). Endapan ini terjadi karena adanya kompleks kalium-alkaloid, alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam. Pada uji alkaloid dengan pereaksi meyer, diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat(II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Marliana, 2005).



Gambar 6.2 Reaksi Pengendapan Meyer
Marliana, 2005

Hasil positif untuk uji alkaloid menggunakan reagen wagner (*Iodin dalam kalium iodida*) adalah terbentuknya endapan berwarna coklat hingga kuning. Endapan ini merupakan kompleks alkaloid-kalium. Ion logam K^+ akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen pada alkaloid membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap.



Gambar 6.3 Reaksi Pengendapan Wagner
Marliana, 2005

6.2.4 Uji Protein

Uji ini dilakukan untuk memastikan bahwa terdapat protein dalam ekstrak biji jintan hitam dalam etanol seperti yang disebutkan dalam jurnal oleh Atef M. Al-Attar tahun 2010 terhadap biji *Nigella sativa* di Arab Saudi. Ekstrak biji jintan hitam dalam etanol sebanyak 0,3 gram diletakkan di *plate* putih sebanyak 2 buah, salah-satu digunakan sebagai kontrol atau pembanding. Selanjutnya ditetaskan asam nitrat sebanyak 5 tetes sebagai reagen dalam test ini.

Hasil uji protein menunjukkan perubahan warna menjadi kuning, hal ini menandakan ekstrak positif protein. Padmaa M Paarakh tahun 2009 salah satu kandungan biji jintan hitam adalah protein, sehingga terdapat kesesuaian antara literatur dengan penelitian ini.

6.3 Induksi Diabetes Melitus Tipe 2

Berdasarkan penelitian oleh B. Qin tahun 2004 tentang diabetes melitus tipe 2, diketahui bahwa diet tinggi fruktosa dapat menginduksi resistensi insulin. Dalam diet tinggi fruktosa ini, 60% kebutuhan kalori tikus dipenuhi dari fruktosa. Sehingga didapatkan hasil setiap tikus mendapatkan asupan fruktosa sebanyak 16 gram. Berikut perhitungan jumlah fruktosa yang diberikan:

- Tikus diet normal membutuhkan 102 kkal untuk tikus BB 150-220 gram (Anggraeni *et al.*, 2009).
- 1 gram fruktosa = 3,9 kkal (Roberfroid, 1999).
- Jadi fruktosa yang dibutuhkan adalah:
 - $102 \text{ kkal} \times 60\% = 61,2 \text{ kkal}$
 - $61,2 \text{ kkal} / 3,9 \text{ kkal} = 15,66 \text{ gram fruktosa}$.
- Sisa energi yang dibutuhkan 40,8 kkal dari pakan standar (comfeed PAR-S, tepung terigu 2:1)

Untuk menjamin setiap tikus mendapat 16 gram fruktosa setiap hari, maka fruktosa direncanakan diberikan melalui *intragastric* (sonde). Pada proses penelitian telah dilakukan beberapa kali percobaan untuk melarutkan 16 gram fruktosa menjadi volume 3 ml cairan, namun tidak berhasil. 16 gram fruktosa ketika dilelehkan memiliki volume $\pm 6 \text{ ml}$, sehingga tidak dapat disondekan karena kapasitas lambung pada tikus berkisar antara 0,4 hingga 3, 4 mL (Mc. Connell *et al.*, 2008).

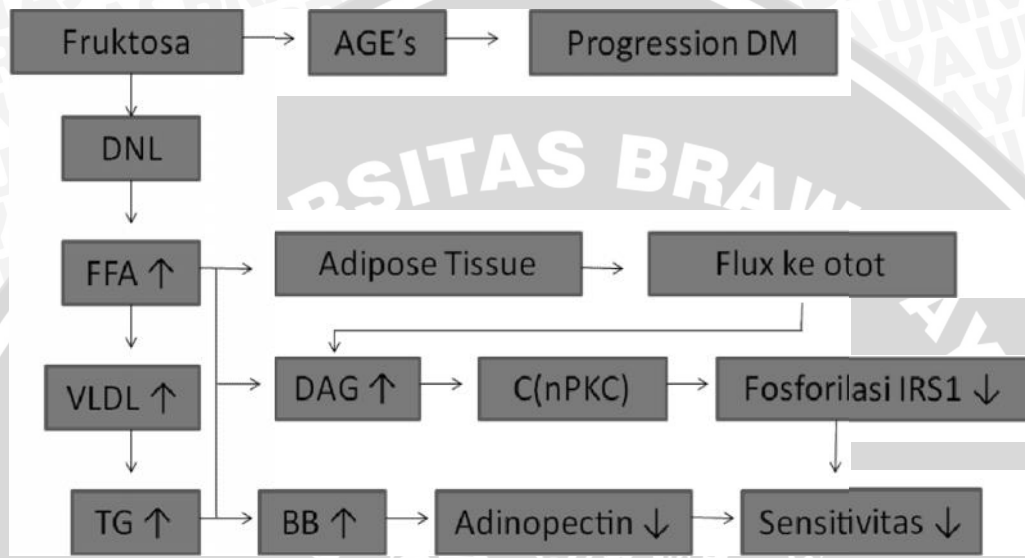
Kemudian sebagai alternatifnya, fruktosa sebagian diberikan melalui sonde dan sisanya dicampurkan dengan pakan. Pada awalnya dilarutkan 3 gram fruktosa menjadi 3 ml sirup fruktosa, dan 13 gram fruktosa dicampurkan dengan pakan. Namun pakan terlalu manis dan lengket sehingga tidak dimakan sama

sekali oleh tikus, jika kondisi ini diterjadi terus menerus dikhawatirkan tikus mati. Sehingga kemudian jumlah fruktosa disesuaikan menjadi 7,5 gram per hari.

Fruktosa merupakan monosakarida yang berasal dari buah, madu dan beberapa sayuran (Lustig, 2010). Walaupun fruktosa tidak membutuhkan insulin untuk masuk ke dalam sel, namun fruktosa menghasilkan *advanced glycation end-products* (AGEs) yang berperan dalam percepatan proses penuaan dan berperan dalam patogenesis diabetes melitus (Gaby, 2005). Fruktosa menyebabkan pembentukan AGEs products lebih tinggi dibandingkan dengan sukrosa, karena memiliki jalur metabolisme yang mirip dengan etanol. Fruktosa dan etanol di metabolisme di hepar dan dikonversi menjadi acetyl-CoA tanpa diregulasi oleh insulin dan hanya sedikit mengalami perubahan menjadi bentuk nontoksik seperti glikogen. Peningkatan jumlah acetyl-CoA akan mengalami *de-novo lipogenesis* (DNL) sehingga menyebabkan resistensi insulin (Lustig, 2010).

Fruktosa diberikan untuk menginduksi diabetes melitus tipe 2, berdasarkan jurnal oleh Kimber L. Stanhope tahun 2008 tentang pengaruh konsumsi fruktosa terhadap jaringan lemak dan resistensi insulin yang diterbitkan oleh Lippincott Williams & Wilkins, diet tinggi fruktosa dapat menyebabkan *de-novo lipogenesis* (DNL) sehingga meningkatkan produksi *hepatic free fatty acid* (FFA) kemudian disertai peningkatan produksi VLDL yang berpengaruh pada peningkatan Triglicerida (TG) yang dapat berat badan dan *diacylglycerol* (DAG). Berat badan menyebabkan produksi adinopectin turun, yang seiring dengan penurunan sensitivitas insulin. Sedangkan DAG dapat menginduksi aktivasi *novel protein kinase C* (nPKC), dimana keduanya berhubungan dengan resistensi insulin pada manusia melalui penurunan fosforilasi IRS1. Jumlah FFA dan TG yang tinggi di jaringan adiposa dapat menyebabkan flux ke jaringan otot

sehingga dapat memicu DAG yang mengaktivasi C(nPKC), sehingga resistensi juga terjadi di jaringan otot. Penjelasan mekanisme fruktosa menginduksi DM2 seperti penjabaran diatas, secara singkat dapat dilihat pada gambar 6.2 di bawah ini:



Gambar 6.2 Bagan Fruktosa Menginduksi Resistensi Insulin

6.4 Euthanasia Hewan Coba

Proses euthanasia hewan coba didahului dengan pemberian Ketamin HCl sebagai general anastesi sebelum dilakukan pembedahan di daerah peritoneal kemudian di injeksikan *insulin rapid acting*. Fungsi pemberian insulin adalah untuk menstimulasi translokasikan GLUT4 ke permukaan sel, karena protein GLUT4 diproduksi berdasarkan stimulasi insulin (Bryant *et al.*, 2002). Pemilihan insulin yang digunakan adalah *rapid acting* agar efek lebih cepat terjadi dan lokasi injeksi adalah pada vena porta hepatika karena merupakan vena yang paling mudah untuk dilakukan injeksi. Proses distribusi insulin ke seluruh tubuh membutuhkan waktu, oleh karena itu diberi senggang 120 detik sebelum tikus dieuthanasia.

Proses euthanasia dilakukan dengan menyuntikan *syringe* kosong (hanya berisi udara) ke daerah batang otak tikus melalui bagain bawah tempurung kepala tikus, dengan ini akan terjadi kerusakan batang otak yang menimbulkan kematian.

6.5 Pembuatan Homogenat Jaringan Otot

Otot yang diambil pada proses pembedahan disimpan di *sentrifuse tube* pada suhu -40°C , bertujuan untuk menghambat terjadinya proses enzimatik sehingga protein dalam otot tidak terdenaturasi. Pembuatan homogenasi membutuhkan *buffer lysis*, komposisi *buffer lysis* ditunjukkan pada tabel 6.1.

Table 6.1 Fungsi Bahan Pada Larutan Buffer Lysis

Bahan	Jumlah	Fungsi
Tris Base	0,1211 g	Mengatur pH antara 7 – 9 agar protein tidak rusak
EDTA	0,0074 g	Melindungi protein dari metal ion
NaCl	0,8775	Mengendapkan protein
PMSF	0,009 g	Protease inhibitor untuk trypsin, chymotrypsin, thrombin and papain.
NP 40	0,125	Non ionic detergent
Protease Inhibitor Cocktail (PIC) merk <i>Sigma</i>	50 μl	Menghambat enzim protease yang menyebabkan denaturasi protein.

Protein merupakan senyawa yang akan diekstraksi dalam proses pembuatan homogenasi ini, jika protein berikatan dengan ion logam akan membentuk ikatan protein-logam dan mengendap, oleh karena itu ditambahkan EDTA untuk mengkhelat ion logam sehingga tidak berikatan dengan protein (Amersham Bioscience, 2001).

Jumlah jaringan otot yang dilsolasi adalah 100 mg, jumlahnya harus sama karena analisa ini bertujuan untuk menghitung jumlah GLUT4 secara

kuantitatif, perbedaan jumlah otot akan berpengaruh pada konsentrasi protein yang diisolasi. Otot dicacah menggunakan gunting untuk mempermudah proses penggerusan, kemudian ditambahkan larutan *buffer lysis* yang telah dibuat sebelumnya dengan komposisi seperti resep diatas sebanyak 1 ml. Penggerusan dilakukan hingga seluruh otot hancur, dengan waktu 5 menit. Penggerusan dilakukan sampai halus dan homogen dan waktu tidak ditetapkan, namun untuk mencegah terjadinya penggerusan yang tidak seragam maka waktu disamakan 5 menit berdasarkan waktu optimal penggerusan beberapa sampel diawal. Pada saat proses penghancuran ini, maka protein yang ada di dalam sel dapat keluar dan terlarut dalam *buffer lysis*.

Hasil dari penggerusan dimasukkan ke *sentrifuse tube* sebagai wadah sampel dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 4°C, tujuannya untuk mereaksikan *buffer lysis* dengan jaringan otot. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C agar terbentuk supernatan dan pelet, dimana protein terlarut dalam supernatan dan zat-zat lainnya berada di pelet. Digunakan suhu 4°C ini untuk menghambat proses enzimatis yang mungkin terjadi. Dari hasil sentrifugasi didapatkan supernatan dan pelet, bagian supernatan diambil menggunakan mikropipet untuk selanjutnya dianalisa menggunakan ELISA. Pada proses penyimpanan baik supernatan, pelet, maupun organ otot dimasukkan dalam freezer -40°C.

6.6 Pengukuran Kadar GLUT-4 Menggunakan ELISA

Dalam penelitian ini digunakan *ELISA kit*, proses diawali dari pembuatan standar. Larutan *stock* standart yang berisi GLUT4 dengan konsentrasi 96 µg/L, kemudian diencerkan beberapa kali untuk mendapat konsentrasi tertentu (lihat

lampiran 9). Larutan standar ini berguna untuk menentukan fungsi persamaan yang digunakan untuk menentukan konsentrasi sampel.

Sampel berupa supernatan dari homogenasi organ otot, berdasarkan *manual data sheet kit* ini diperlukan pengenceran sampel sebanyak 5 kali (lihat di lampiran 9). Pengenceran ini berguna untuk menurunkan konsentrasi protein dalam supernatan, hal ini perlukan karena antibodi yang telah di *coating* di *well* memiliki ambang batas ikatan, jika jumlah protein (khususnya GLUT4) pada sampel diatas ambang batas, maka nilai konsentrasinya tidak terbaca.

Langkah berikutnya, memasukkan larutan standar dan larutan sampel ke dalam *well*. Sampel yang mengandung glut-4 akan berikatan dengan *anti-glut4 antibody* yang telah dicoating di *well*. Proses ikatan ini membutuhkan waktu, sehingga dilakukan inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Berikutnya dilakukan pencucian pada *well* menggunakan *washing solution* yang telah diencerkan sebanyak 30 kali (lihat lampiran), dalam *kit* ini tidak dijelaskan komposisi *washing solution*, namun pada dasarnya *washing solution* berisi detergen, yang biasa digunakan adalah PBS atau PBS-Tween. Fungsi pencucian ini adalah menghilangkan protein lain yang tidak berikatan dengan *anti-glut4 antibody*. Sampel yang mengandung GLUT4, spesifik berikatan dengan *anti-glut4 antibody*, sehingga protein lain yang terkandung dalam sampel tidak terikat dengan *anti-glut4 antibody* dan hilang saat pencucian.

Penambahan *HRP-conjugate* berfungsi untuk memberi label pada ikatan antara *anti-GLUT4 antibody* dengan GLUT4, proses ini membutuhkan waktu inkubasi 30 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya, ditambahkan larutan chromogenic A dan B yang berfungsi sebagai substrat. Pada *kit ELISA* ini terdapat dua larutan chromogenic yang komposisinya tidak disebutkan. Kedua

larutan ini bekerja bersama-sama untuk berinteraksi dengan *HRP labeled* dan ditandai dengan perubahan warna. Chromogenic substrat yang biasa digunakan untuk HRP-reagen adalah TMB. Waktu yang dibutuhkan untuk membentuk reaksi ini adalah 10 menit, oleh karena itu dilakukan inkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Setelah itu dilakukan pemberian *stop solution* untuk menghentikan reaksi yang terjadi antara substrat dan *HRP labeled*.

6.7 Efek Ekstrak Biji Jintan Hitam Terhadap Perbedaan Konsentrasi GLUT4 Antar Kelompok

Berdasarkan hasil uji *one way ANOVA* (lihat lampiran 11) , didapatkan hasil bahwa tidak terjadi perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Analisa *one way ANOVA* merupakan uji rata-rata kelompok, digunakan untuk jenis hipotesa komparatif, dengan variabel berupa ordinal dan numerik, jumlah kelompok >2 dan tidak berpasangan. Tujuan dari uji ini adalah mengetahui perbedaan nilai rata-rata GLUT4 antar kelompok perlakuan.

Pada percobaan ini menggunakan kontrol positif metformin (Pp), kontrol negatif aquadest (Pn), kelompok perlakuan mendapatkan ekstrak biji jintan hitam dengan tiga dosis yang berbeda dan terdapat pula kelompok tikus normal (tanpa diinduksi diabetes melitus). Parameter yang digunakan untuk menilai kondisi diabetes melitus tipe adalah kadar glukosa darah, dinyatakan mengalami diabetes melitus jika kadar glukosa darah puasa 200 mg/dl, sedangkan pada hewan coba kadar glukosa darah tidak mencapai 200 mg/dl. Kadar glukosa darah paling tinggi adalah 112 mg/dl pada tikus nomor 12. Sehingga dapat diketahui bahwa tikus belum mengalami diabetes melitus saat dimulai perlakuan.

Hasil pengukuran konsentrasi GLUT4 dimungkinkan dipengaruhi berbagai hal, namun yang paling utama adalah proses pengukuran menggunakan ELISA. Nilai R^2 kurva baku yang didapat adalah 0,932 menunjukkan kualitas standar tidak terlalu baik, ditunjukkan pula dengan nilai absorbansi standar yang berada diluar direntang 0,2 – 0,8. Pada pelaksanaan pengukuran menggunakan ELISA semua prosedur telah dilaksanakan sesuai dengan *manual data sheet kit*, namun dimungkinkan hal-hal yang berpengaruh terhadap hasil konsentrasi adalah:

1. Pengeringan setelah pencucian well menggunakan wash solution tidak maksimal, sehingga masih ada *wash solution* yang tersisa.
2. Waktu inkubasi sampel kurang lama, saat inkubasi sampel yang mengandung GLUT4 akan berikatan dengan antibodi yang telah *ter-coating* di well. Waktu inkubasi untuk ELISA manual biasanya 24 jam. Pada *kit* ini, waktu inkubasi hanya 30 menit yang mengakibatkan ikatan antara antibodi dan sampel belum cukup kuat sebelum dicuci.
3. Pengenceran *wash solution* yang kurang dan jumlah pencucian yang terlalu banyak. Pada dasarnya *wash solution* mengandung detergen untuk membuang protein lain yang tidak berikatan dengan antibodi, biasanya merupakan PBS. Jika konsentrasinya terlalu tinggi, maka dapat membuang sampel yang berikatan dengan antibodi. Jumlah pencucian yang terlalu banyak juga dapat membuang sampel yang berikatan dengan antibodi.

Hal-hal tersebut diatas berakibat pada rendahnya jumlah konsentrasi GLUT4 yang terukur, juga mengganggu validitas konsentrasi protein yang terukur.

GLUT4 merupakan jenis protein yang menjadi jalan masuknya glukosa dari darah ke dalam sel. Pada kondisi diabetes melitus tipe 2, terjadi resistensi

insulin yang mengakibatkan kadar GLUT4 ke permukaan sel menurun. Hewan coba pada penelitian ini belum mengalami diabetes melitus, sehingga kadar GLUT4 ke permukaan sel normal. Pemberian metformin dan ekstrak tidak berpengaruh secara signifikan pada kadar GLUT4 ke permukaan sel karena secara normal kadar GLUT4 sudah cukup untuk mentransport glukosa dari dalam darah menuju sel, sehingga perubahan konsentrasi GLUT4 di permukaan sel tidak terjadi secara berarti.

Pada penelitian ini tidak terjadi perbedaan kadar GLUT4 yang signifikan antar kelompok perlakuan. Namun secara deskriptif dapat diketahui bahwa nilai rata-rata konsentrasi GLUT4 asli (sebelum dilakukan transformasi) mulai dari terendah adalah kontrol negatif (Pn), tikus normal (P0), kontrol positif (Pp), perlakuan dosis 48 mg/kg BB (P2), perlakuan dosis 24 mg/kgBB (P1) dan paling tinggi perlakuan dosis 96 mg/kgBB (P3).

$$Pn < P0 < Pp < P2 < P1 < P3$$

Nilai minimum konsentrasi glut-4 adalah 61 g/L terdapat pada kelompok kontrol negatif, dan nilai tertinggi adalah 743 g/L terdapat pada kelompok perlakuan dosis 96 mg/kgBB.

Rata-rata nilai konsentrasi terendah terdapat pada kelompok kontrol negatif, selanjutnya adalah kelompok tikus normal (tidak diinduksi DM tipe 2), dari hal ini dapat diketahui bahwa pemberian diet tinggi fruktosa berpengaruh terhadap penurunan konsentrasi GLUT4 walaupun tidak signifikan. Pemberian diet tinggi fruktosa menyebabkan peningkatan *de-novo lipogenesis* (DNL) selanjutnya meningkatkan produksi *hepatic free fatty acid* (FFA) yang dapat meningkatkan produksi *diacylglycerol* yang menginduksi aktivasi novel protein kinase C (nPKC), dimana keduanya berhubungan dengan resistensi insulin pada

manusia (Stanhope, 2008). Selain itu fruktosa berinteraksi dengan molekul protein dan menghasilkan *advanced glycation end-products* (AGEs) yang berperan dalam percepatan proses penuaan dan berperan dalam patogenesis diabetes melitus (Gaby, 2005). Pada hewan coba penelitian ini, resistensi insulin yang ditandai dengan penurunan kadar GLUT4 ke permukaan sel belum sepenuhnya terjadi, namun proses menuju resistensi insulin sudah dimulai. Penurunan kadar GLUT4 sudah terjadi, namun masih dalam ambang toleransi tubuh sehingga belum berakibat pada peningkatan gula darah.

Nilai konsentrasi GLUT4 pada kontrol positif berada di atas kontrol negatif, hal ini menunjukkan bahwa pemberian metformin dapat meningkatkan kadar GLUT4 namun tidak signifikan. Metformin memiliki efek meningkatkan sensitivitas insulin di jaringan perifer maupun hepar (Dipiro *et al.*, 2008; Koda-Kimbel *et al.*, 2008; Bruton *et al.*, 2008). Secara molekuler mekanisme kerjanya dengan mediasi aktivasi *AMP kinase*. Selain itu, metformin juga menurunkan glukoneogenesis dan absorpsi glukosa di usus halus (Bruton *et al.*, 2008). *AMP kinase* dapat menginduksi aktivasi jalur PI3-kinase sebagai regulator translokasi GLUT4 (Russel *et al.*, 1999). Peningkatan sensitivitas insulin dalam penelitian ini ditandai dengan peningkatan konsentrasi GLUT4. Kondisi penurunan GLUT4 yang masih dapat ditoleransi tubuh sebelum dilakukan perlakuan, menyebabkan peningkatan yang signifikan belum terjadi.

Nilai rata-rata konsentrasi GLUT4 pada kelompok tikus perlakuan, baik dengan dosis 24 mg/kgBB, 48 mg/kgBB atau 96 mg/kgBB di atas kelompok kontrol positif, namun tidak signifikan. Hal ini menunjukkan ekstrak biji jintan hitam dapat meningkatkan kadar GLUT4 ke permukaan sel lebih baik dibanding metformin. *Nigella sativa* dapat meningkatkan sensitivitas insulin sehingga sesuai

digunakan untuk terapi diabetes melitus tipe 2. Mekanisme kerjanya dengan meningkatkan aktivitas transduksi signal intraseluler (Najmi, 2012). Efek antiinflamasi *Nigella sativa* diduga dapat pula bekerja meningkatkan sensitivitas insulin karena proses terjadinya resistensi insulin salah-satunya diawali dari proses inflamasi.

Perbandingan konsentrasi GLUT4 pada tiga perlakuan dosis, menunjukkan bahwa dosis 96 mg/kgBB dapat meningkatkan kadar GLUT4 tertinggi, diikuti oleh konsentrasi 24 mg/kgBB dan yang paling rendah diantara ketiganya adalah dosis 48 mg/kgBB. Pada dosis 24 mg/kgBB terdapat nilai absorbansi yang jauh lebih tinggi dibandingkan yang lain, yakni pada tikus nomor 7 dengan nilai glukosa darah 101 mg/dL dan absorbansi 0,085 sedangkan nilai absorbansi lainnya bernilai 0,02 dan 0,025. Hal inilah yang dimungkinkan menyebabkan nilai rata-rata yang didapat bernilai tinggi. Namun, setelah dilakukan identifikasi data pencilan, tidak ditemukan nilai pencilan dari data. Hal yang mempengaruhi nilai rata-rata konsentrasi GLUT4 tidak menunjukkan pola sesuai dosis, dimungkinkan karena kadar glukosa tikus sebelum mendapatkan perlakuan bervariasi dan belum mencapai kondisi DM.

6.8 Efek Pemberian Ekstrak Biji Jintan Hitam Terhadap Perbedaan Glukosa Darah Sebelum dan Sesudah Perlakuan

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji jintan hitam terhadap glukosa darah, maka glukosa darah *pre* dan *post-treatment* dibandingkan. Namun sebelumnya terlebih dahulu dilakukan test normalitas dan homogenitas, agar dapat dianalisa secara parametrik. Glukosa darah pretest memiliki sebaran normal namun glukosa darah posttest tidak memiliki sebaran data normal

sehingga dilakukan transformasi data. Setelah dilakukan beberapa kali transformasi data menggunakan *squareroot*, *1/squareroot*, *log10* hasil tetap tidak normal, sehingga digunakan analisa non parametrik.

Analisa non parametrik yang digunakan adalah Wilcoxon test untuk mengetahui perbedaan dua kelompok uji yang berpasangan. Didapatkan nilai P Asymp. > 0,05 sehingga diketahui bahwa tidak ada perbedaan glukosa darah yang signifikan pada hewan coba sebelum dan sesudah perlakuan.

Pada jurnal oleh Bilal tahun 2009 tentang efek jintan hitam dalam berbagai preparasi, diketahui bahwa jintan hitam memiliki beberapa mekanisme kerja untuk menurunkan kadar glukosa darah, diantaranya dengan mencegah glukoneogenesis, menjaga dan memperbaiki integritas sel β -langerhan, serta insulinotropik (Bilal, 2008). Sebelum dilakukan perlakuan, glukosa darah tikus masih dalam rentang normal, sehingga proses glukoneogenesis, penurunan sekresi insulin dan kerusakan sel β -langerhan belum terjadi oleh karena itu penggunaan ekstrak biji jintan hitam tidak berpengaruh besar. Dalam keadaan normal, glukoneogenesis tidak terjadi sehingga ekastrak biji jintan hitam tidak melakukan fungsinya untuk mencegah glukoneogenesis. Begitu pula dengan insulinotropik, jumlah insulin dalam keadaan normal masih mencukupi. Dari hasil ini dapat diketahui pula bahwa penggunaan ekstrak biji jintan hitam dengan dosis tertentu pada tikus normal tidak menyebabkan hipoglikemia, begitu pula dengan penggunaan metformin.

6.9 Korelasi Perubahan Glukosa Darah Terhadap Konsentrasi GLUT4

Konsentrasi GLUT4 merupakan penanda terjadinya resistensi insulin pada diabetes melitus tipe 2, sedangkan perubahan glukosa darah sebelum dan

sesudah perlakuan merupakan penanda perbaikan kondisi hewan coba. Berdasarkan hasil korelasi pearson, delta glukosa darah berkorelasi sangat lemah dengan konsentrasi GLUT4.

Nilai glukosa darah *pre-treatment* seluruh hewan coba berada dalam rentang normal, artinya belum terjadi kondisi DM 2. Setelah dilakukan perlakuan, terjadi perubahan glukosa darah sebelum dan setelah perlakuan namun tetap dalam rentang normal. Perubahan glukosa darah yang terjadi cukup variatif, terdapat beberapa hewan coba yang justru mengalami peningkatan glukosa darah setelah mendapat perlakuan, yakni pada hewan coba nomor 3 (kontrol negatif), 6 (kontrol positif), 16 (perlakuan dengan dosis 96 mg/kgBB), 17 (perlakuan dengan dosis 96 mg/kgBB). Terjadinya peningkatan glukosa darah setelah perlakuan, tidak berarti banyak karena masih dalam rentang normal. Menurut C. J. Rhodes and M. F. White dalam jurnal berjudul "*Molecular insights into insulin action and secretion*", peningkatan glukosa darah dalam tubuh menstimulasi peningkatan sekresi insulin dan menyebabkan masuknya glukosa ke dalam sel, sintesa glikogen, dan hambatan glikoneogenesis serta glukoneogenesis untuk menjaga kondisi normoglikemik. Dari pernyataan ini dapat diketahui bahwa tujuan utama sekresi insulin adalah menjaga glukosa darah dalam kadar normal, pada tikus nomor 3, 6, 16 dan 17 keadaan normoglikemik tetap tercapai. Selain dipengaruhi sekresi insulin, *uptake* glukosa darah ke sel juga dipengaruhi oleh kegiatan fisik misalnya olahraga. Hal tersebut juga dapat dijadikan faktor yang mempengaruhi kadar glukosa darah tikus, tikus yang bergerak aktif dimungkinkan memiliki kadar glukosa darah lebih rendah.

6.10 Keterbatasan Penelitian

Jumlah sampel setiap kelompok perlakuan tidak sama, hal ini terjadi karena, pemberian fruktosa secara *intragastic* dalam waktu lama menyebabkan kematian pada beberapa tikus. Konsidi DM 2 tidak tercapai setelah induksi selama 6 minggu, sehingga pemberian perlakuan dilakukan sebelum tikus mengalami DM 2. Jumlah konsumsi fruktosa masing-masing tikus tidak sama, karena sebagian fruktosa diberikan bersama makanan sehingga tidak dapat dikontrol sepenuhnya.

