

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Melitus

Menurut *Internasional Diabetes Federation* (IDF), diabetes merupakan penyakit kronik yang terjadi karena tubuh tidak mampu memproduksi insulin dalam jumlah cukup atau tidak mampu menggunakan insulin secara efektif yang biasa disebut resisten terhadap insulin. Keadaan abnormalitas jumlah dan fungsi insulin ini ditandai dengan intoleransi glukosa yang berakibat pada kondisi hiperglikemia. Berdasarkan *IDF Global Guideline for Diabetes Type 2* tahun 2012, seseorang dikatakan terdiagnosa DM ketika kadar glukosa darah puasa 126 mg/dL (7.0 mmol/L), kadar glukosa darah 2 jam setelah konsumsi glukosa 200 mg/dL (11.1 mmol/L), kadar glukosa darah acak \geq 200 mg/dL (11.1 mmol/L), dan hemoglobin terglikasi HbA_{1c} \geq 6,5% (48 mmol/mol). Dalam waktu yang lama, kelainan ini dapat menyebabkan berkembangnya berbagai macam komplikasi seperti *retinopathy*, *nephropathy* dan *neuropathy* (Fauci *et al.*, 2008; Dipiro *et al.*, 2008).

Berdasarkan proses patogenesisnya, penyebab serta onsetsnya, diabetes melitus diklasifikasikan ke dalam 2 kelompok, yakni diabetes melitus tipe 1 dan diabetes melitus tipe 2 (Fauci *et al.*, 2008). Diabetes melitus tipe 1 terjadi karena kondisi autoimun, dimana antibodi tubuh menghancurkan sel β -langerhan pankreas. Marker dari autoimun ditemukan pada 90% pasien yang didiagnosa diabetes melitus tipe 1 (Dipiro *et al.*, 2008). Sel β -langerhan pankreas merupakan

penghasil insulin, sehingga jika sel β -langerhan pankreas mengalami kerusakan maka sekresi insulin akan menurun bahkan dapat berhenti. Sedangkan fungsi insulin adalah regulator keseimbangan glukosa darah. Oleh sebab itu, kerusakan sel β -langerhan pankreas dapat mengakibatkan kondisi hiperglikemia. Karena penyebab diabetes melitus tipe 1 ini adalah autoimun, maka penyebaran umur penderita diabetes tipe 1 ini cukup beragam, kebanyakan pada usia muda namun juga dapat terjadi pada usia tua, tergantung ketahanan sel β -langerhan pankreas terhadap perusakan oleh antibodi tubuh (Dipiro *et al.*, 2008).

Diabetes melitus tipe 2 ditandai dengan keadaan resistensi insulin dan kekurangan sekresi insulin, dengan progresivitas sekresi insulin yang semakin menurun dari waktu ke waktu (Dipiro *et al.*, 2008). Kebanyakan penderita DM tipe 2 mengalami obesitas sebagai faktor pemicunya. Kondisi obesitas menjadi penyebab abnormalitas fungsi insulin (Kahn *et al.*, 2000; Shealson *et al.*, 2007).

Terjadinya resistensi insulin mengakibatkan penggunaan glukosa oleh jaringan menurun, produksi glukosa oleh hepar meningkat, dan peningkatan akumulasi glukosa di sirkulasi. Kondisi akumulasi glukosa di sirkulasi (hiperglikemia) menstimulasi pankreas untuk memproduksi insulin lebih banyak, peningkatan kadar insulin (hiperinsulinesmia), dan glukosa di sirkulasi darah menstimulasi terjadinya resistensi insulin (Koda-Kimbel *et al.*, 2008).

2.2 Signaling Insulin

Insulin diproduksi oleh sel β -langerhan di pankreas untuk mengatur keseimbangan glukosa darah, dalam kondisi basal (tidak ada makanan) maupun *postprandial* (setelah makan). Makanan yang masuk ke dalam saluran cerna dimetabolisme menjadi bentuk yang lebih sederhana yaitu glukosa agar mudah diserap oleh sel tubuh. Tingginya kadar glukosa dalam darah akan menstimulasi

sel -langerhan pankreas untuk memproduksi insulin (Thorrel *et al.*, 1999; Pessin *et al.*, 2000). Insulin disekresi oleh pankreas ke aliran darah untuk dibawa ke target organ. Pada target organ terdapat *Insulin Receptor Substrate* (IRS) yang akan berikatan dengan hormon insulin. IRS memiliki 2 bagian utama, yakni subunit yang berada di ekstraseluler berfungsi untuk berikatan dengan hormon insulin dan subunit yang berada di intraseluler yang merupakan lokasi dari tirosin kinase (Pessin *et al.*, 2000; Taha *et al.*, 1999). Saat hormon insulin berikatan dengan subunit di ekstraseluler, sinyal akan diteruskan ke tirosin kinase yang berada di subunit dan mengaktifasi tirosin kinase (Rhodes *et al.*, 2002).

Aktivasi pada tirosin kinase merupakan awal dari transduksi sinyal insulin yang berpengaruh pada kerja insulin. Tirosin kinase yang teraktivasi akan mengalami autofosforilasi atau penambahan gugus fosfat (Taha *et al.*, 1999; Thorell *et al.*, 1999; Rhodes *et al.*, 2002; Pessin *et al.*, 2000). Fosforilasi tirosin kinase terjadi melalui pendonoran gugus fosfat oleh ATP (*adenosin triphosphat*), sehingga ATP mengalami defosforilasi. Hasil kerja insulin tergantung pada sel yang teraktivasi dari transmisi sinyal. Pada jaringan otot dan lemak, insulin menstimulasi jalur *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI 3-kinase) yang meregulasi lokalisasi *glucose transporter* (GLUT-4) dan merangsang penyimpanan glukosa sebagai glikogen di otot atau sebagai trigliserida di jaringan adiposa. Pada sel -langerhan di pankreas, PI 3-kinase berfungsi untuk pertumbuhan dan metabolisme sel sehingga tidak mengalami kematian (Rhodes *et al.*, 2002).

Saat jalur PI 3-kinase teraktivasi maka PP (*Phosphat Protein*) menstimulasi GLUT-4 untuk berpindah ke permukaan sel sehingga menyebabkan masuknya glukosa ke dalam sel (Pessin *et al.*, 2000). Pemasukan

glukosa ke dalam sel mengakibatkan kadar glukosa di dalam darah menurun sehingga stimulasi untuk memproduksi insulin oleh sel β -langerhan berhenti (Pessin *et al.*, 2000).

2.3 *Glucose Transporter 4 (GLUT-4)*

Distribusi glukosa pada jaringan tubuh dilakukan oleh *protein transport* yang disebut GLUT (*glucose transporter*), yang bekerja sebagai pembawa glukosa melewati membran sel. Jenis GLUT bermacam-macam, sesuai dengan tipe sel (Bryant *et al.*, 2002). Pada sel di jaringan otot dan adiposa transport glukosa dilakukan oleh GLUT-4 dan GLUT-1 (Kraegen *et al.*, 1993). GLUT-2 memiliki afinitas rendah dan berlokasi di liver, usus halus, ginjal, dan sel pankreas sedangkan GLUT-5 berfungsi sebagai transporter fruktosa (Watson *et al.*, 2001). Pada jaringan neuron transport glukosa dilakukan oleh GLUT-3, pada kondisi basal stimulasi insulin menyebabkan peningkatan translokasi GLUT-1 16%, GLUT-4 63% dan GLUT-3 103% (Wilson *et al.*, 1995).

GLUT-4 ditemukan pada berbagai macam organel, seperti membran plasma, endosom. Sekresi insulin atau olahraga menyebabkan GLUT-4 berpindah ke membran sel (Bryant *et al.*, 2002). Bentuk transporter yang paling responsif terhadap insulin adalah GLUT-4, saat kondisi basal GLUT-4 bertranslokasi lambat ke membran sel, namun saat glukosa darah meningkat dan insulin disekresikan GLUT-4 bertranslokasi ke permukaan sel dengan cepat secara reversibel. Reversibel yang dimaksud adalah ketika kadar insulin menurun maka GLUT-4 akan hilang dari membran plasma melalui proses endositosis (Watson *et al.*, 2001).

2.4 Mekanisme Resistensi Insulin pada Diabetes Melitus Tipe 2

Mekanisme resistensi insulin dapat dijelaskan melalui beberapa jalur. Yang pertama resistensi yang diinduksi oleh inflamasi dan yang kedua resistensi yang diinduksi oleh obesitas (Sulistyoningrum, 2010).

Hubungan antara inflamasi dan resistensi insulin dijelaskan oleh Evi Sulistyoningrum tahun 2010 dalam sebuah penelitan, bahwa sitokin proinflamatori TNF- (Tumor Necrosis Factor) dapat menginduksi resistensi insulin. *Reactive Oxygen Species* (ROS) atau *Reactive Nitrogen Species* (RNS) dan berbagai isoform dari Protein Kinase C (PKC) dapat memicu aktivasi mediator proinflamasi.

Resistensi insulin diinduksi oleh sintesis beberapa sitokin proinflamatori diantaranya TNF- , IL-1 / , IL-6 (Shoelson *et al.*, 2007; Tilg *et al.*, 2007). Jumlah TNF- yang rendah dalam peredaran darah, menunjukkan sensitivitas insulin yang baik, begitu pula sebaliknya. Pada kondisi obesitas terdapat penumpukan jaringan adiposa yang meningkatkan ekspresi TNF- , akibatnya terjadi hambatan fosforilasi di IRS-1. TNF- merupakan penghubung antara inflamasi, obesitas dan IR (Tilg *et al.*, 2007).

IL-1 merupakan sitokin yang memiliki efek inflamasi besar dan memiliki fungsi yang berbeda dalam regulasi insulin. IL-1 meningkatkan resistensi insulin (Shoelson *et al.*, 2007). IL-1 menurunkan ekspresi IRS-1 sehingga berkontribusi terhadap resistensi insulin, secara sinergis IL-1 dan IL-6 meningkatkan resiko diabetes tipe 2 (Tilg *et al.*, 2007).

IL-6 diproduksi di jaringan adiposa abdominal tiga kali lebih banyak dibandingkan dengan jaringan adiposa subkutan. Sehingga, pada kondisi

obesitas terdapat peningkatan produksi IL-6. Dalam sebuah penelitian diketahui bahwa penurunan konsentrasi IL-6 di sirkulasi darah menyebabkan peningkatan sensitivitas insulin, khususnya di hepar. Begitu juga sebaliknya, tingginya konsentrasi IL-6 dalam sirkulasi darah secara terus menerus dapat menghambat autofosforilasi di IRS dan *downstream signaling* insulin (Shoelson *et al.*, 2007).

Resistensi insulin juga dapat diinduksi oleh kondisi obesitas. Mekanisme obesitas dalam menginduksi resistensi insulin dijelaskan oleh Barbara B. Kahn pada tahun 2000 dalam sebuah jurnal penelitian, bahwa obesitas memicu peningkatan ekspresi dan aktivitas beberapa *Protein Tyrosine Phosphorylation* (PTPs) yang berfungsi melakukan defosforilasi sehingga menghentikan semakin banyaknya fosforilasi tirosin. PTPs menunjukkan defosforilasi pada Insulin Reseptor (Kahn *et al.*, 2000).

Obesitas dan inflamasi menyebabkan penurunan ikatan insulin dan reseptor di jaringan otot dan lemak, sehingga berakibat pula pada penurunan fosforilasi dan aktivitas tirosin kinase. Penurunan ekspresi IR berakibat pada PI3K yang juga menurun fungsinya, akibat penurunan PI3K maka kadar GLUT-4 di permukaan sel menurun. Kurangnya kadar GLUT-4 ke permukaan sel berakibat pada penurunan pemasukan glukosa ke dalam sel (Choi *et al.*, 2010).

2.5 Klasifikasi dan Morfologi Jintan Hitam

Jintan hitam memiliki nama latin *Nigella sativa*, umumnya dikenal sebagai kalonji di India dan habbatus saudah di Timur Tengah. Selain juga dikenal sebagai *Upakunchika*, *Ajaji*, *Kalvanjika*, *Kalika*, *Kunchika*, *Kalaunji* dan *Black cumin* (Paraakh *et al.*, 2010). *N. sativa* merupakan *family* Ranunculaceae yang tumbuh di tepian laut Mediterania, Pakistan, Siria, Lebanon, Israel, India, Eropa

Selatan serta di wilayah tropis lainnya (Azadi *et al.*, 2010; Paraakh *et al.*, 2010).

Klasifikasi *Nigella sativa* adalah sebagai berikut (Sharma *et al.*, 2009):

- Kingdom* : *Plantae*
Division : *Magnoliophyta*
Orde : *Ranunculales*
Family : *Ranunculaceae*
Genus : *Nigella*
Species : *Nigella sativa*

Nigella sativa memiliki tinggi sekitar 45 cm, panjang daun sekitar 2.5 – 5.0 cm, bunga berwarna biru pucat dengan ukuran 2.0 – 22.5 cm. Biji kaku berbentuk busur rata, menyerupai corong, kecil dengan panjang sekitar 0.2 cm dan lebar 0.1 cm berwarna hitam (Gambar 2.1) dengan aroma biji sangat menyengat serta rasa pahit (Paarakh *et al.*, 2010).



Gambar 2.1 Biji Jintan Hitam
Paraakh *et al.*, 2010

2.6 Penggunaan Jintan Hitam Sebagai Obat Tradisional

Jintan hitam digunakan secara luas untuk pengobatan tradisional, selain itu bijinya digunakan untuk bumbu masakan, karminativum, serta pengaroma. Secara tradisional jintan hitam digunakan untuk mengobati diare, sendawa serta gangguan saluran pencernaan. Serbuk biji jintan hitam diberikan bersama mentega untuk meredakan cegukan, juga digunakan untuk meningkatkan nafsu makan, mengurangi muntah serta demam pada ibu setelah melahirkan (Gilani *et al.*, 2004). Jintan hitam dapat digunakan pula untuk penyakit yang lebih parah, seperti *ascites*, *jaundice* (sakit kuning), *paralysis*, disentri, perdarahan intrinsik serta amenorrhea (Paarakh *et al.*, 2010). Selain itu, jintan hitam juga digunakan sebagai antidiabetes oleh masyarakat daerah Maroko dan daerah Timur Tengah (Bilal, 2008).

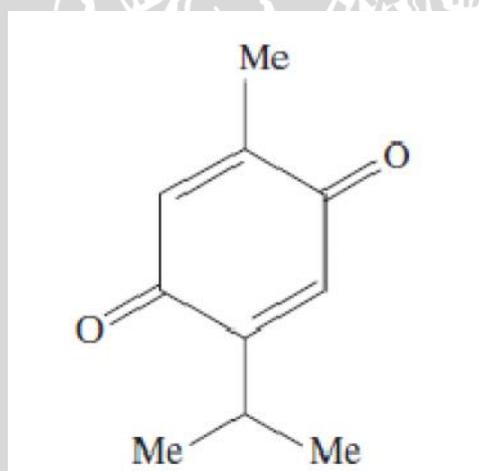
Penggunaan *Nigella sativa* sebagai antiinflamasi, antioksidan, dan penurun kolesterol yang digunakan di daerah Mediterania dan Timur Tengah menjadi dasar pengembangan penggunaannya secara modern (Benhoddou-Andaloussi *et al.*, 2011). Efek hipoglikemia dan antidiabetes jintan hitam telah dilaporkan pada beberapa studi sebelumnya (Benhoddou-Andaloussi *et al.*, 2011; Houchner *et al.*, 2007).

2.7 Kandungan Kimia Jintan Hitam

Berdasarkan uji kuantitatif yang dilakukan oleh Atef M. Al-Attar tahun 2010 terhadap biji *Nigella sativa* di Arab Saudi, diketahui kandungannya antara lain *fixed oil* 36%-38%, protein, alkaloid, saponin dan *essential oil* 0,4% - 2,5%. *Fixed oil* yang utama adalah asam lemak tak jenuh yang terdiri dari *arachidic* dan *asa, eicosadienoic*. Pengujian terhadap kandungan *essential oil* biji jintan hitam menggunakan Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS) diketahui

kandungan utamanya adalah *thymoquinone* 27,8% - 57,0 %, - *cymene* 7,1% - 15,5%, *caevacrol* 5,8% - 11,6%, *t-anethole* 0,25% - 2,3%, *4-terpineol* 2,0% - 6,69%, dan *longifenoline* 1,0% - 8,0% (Al-Attar *et al.*, 2010).

Essesial oil merupakan kandungan jintan hitam yang memiliki fungsi sebagai antidiabetes. Kandungan utama dalam *essensial oil* adalah *thymoquinone* (*2-isopropyl-5-methyl-benzoquinone*) yang merupakan dimer dari *dithymoquinone* (Gali-Muhtasib *et al.*, 2006; Bilal *et al.*, 2008; Al-Attar *et al.*, 2010). Struktur *thymoquinone* dapat dilihat pada gambar 2.3. Dalam beberapa penelitian disebutkan bahwa *thymoquinone* memiliki berbagai aktivitas seperti antiinflamasi, antioksidan, antimikroba, imunostimulan, dan antidiabetes (Gilani, 2004; Gali-Muhtasib, 2006; Boseila, 2011; El-Tahir, 2006).



Gambar 2.2 Struktur Thymoquinone
Gali-Muhtasib *et al.*, 2006

Thymoquinone memiliki titik leleh 44-47° C dan titik didih 230-232° C.

Selain *thymoquinone*, Jintan hitam juga mengandung *nigellone*, *thymol*, *carvacrol*, - dan -*pinene*, *d-limonene*, *d-citronellol*, serta *p-cymene*. Beberapa

mineral juga terdapat dalam *Nigella s.* diantaranya kalsium, fosfor, kalium, natrium dan besi (Aggarwal *et al.*, 2011).

2.8 Potensi Jintan Hitam sebagai Antidiabetes

Jintan hitam merupakan salah-satu tanaman yang digunakan untuk mengobati diabetes melitus secara tradisonal. Beberapa penelitian diantaranya dilakukan oleh Abeer M. Shady tahun 2010 dan Ali Benhaddou-Andaloussi tahun 2011 menunjukkan keefektifan penggunaan jintan hitam sebagai antidiabetes. 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).

Jintan hitam memiliki aktivitas antioksidan sehingga dapat mencegah terjadinya *stres oksidatif* yang menyebabkan ketidakseimbangan produksi radikal bebas intraseluler dan mekanisme pertahanan seluler. Protein, lipid dan DNA merupakan target yang peka terhadap radikal bebas, mekanisme pertahanan seluler berupa antioksidan natural tubuh juga akan menurun seiring dengan meningkatnya jumlah radikal bebas. Kedua hal tersebut menyebabkan peningkatan kematian sel dimana dalam kasus diabetes melitus sel yang mengalami kematian adalah sel β -langerhan pankreas sehingga produksi insulin menurun (Kanter, 2004; Kaleem, 2006). Selain itu jintan hitam juga bekerja sebagai insulinotropik, yang artinya memicu sekresi insulin. Selain mencegah kerusakan sel β -langerhan pankreas, jintan hitam dapat pula memicu perbaikan sel β -langerhan pankreas yang telah rusak sehingga terjadi efek insulinotropik (Houchner, 2007; Najmi, 2012).

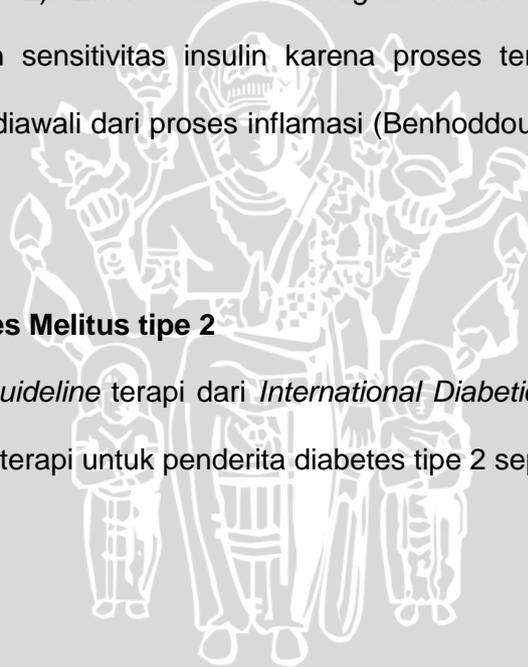
Peningkatan proses glukoneogenesis di hepar merupakan salah-satu penyebab hiperglikemia. *Nigella sativa* mengandung *thymoquinone* yang dapat

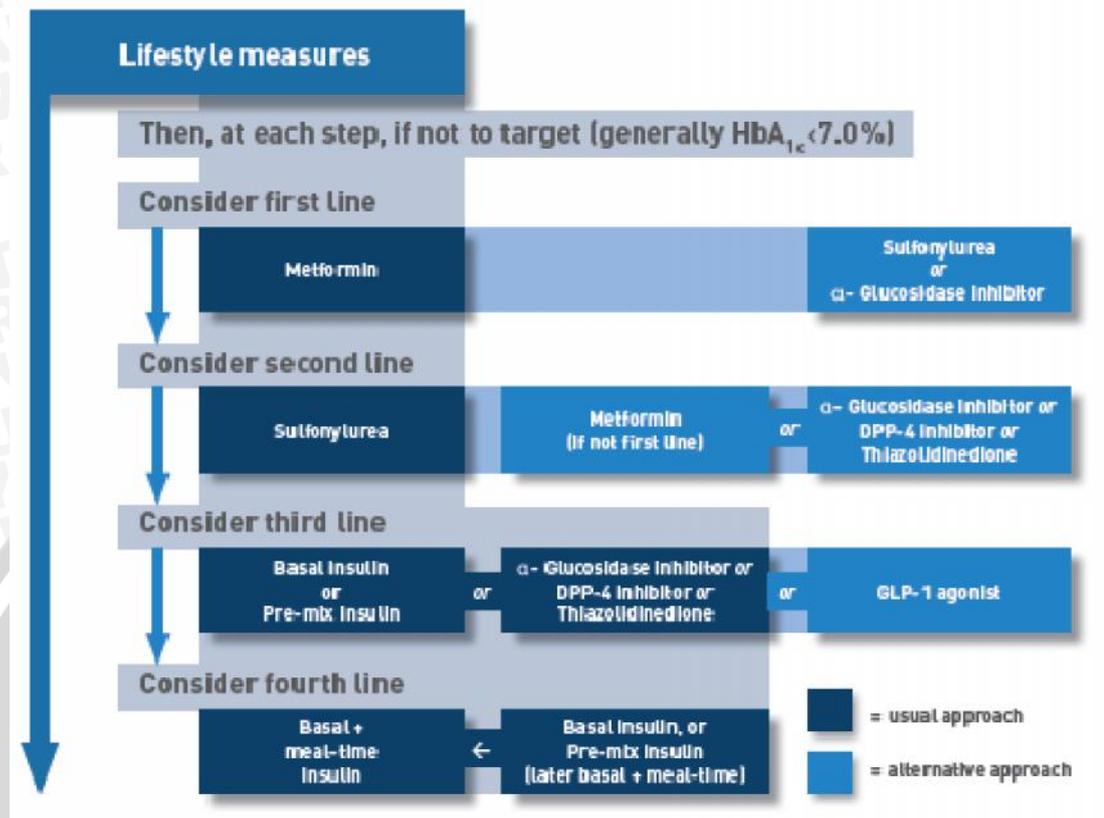
menurunkan proses glukoneogenesis di hepar. Mekanisme penurunan proses glukoneogenesis diduga melalui hambatan enzim yang berperan dalam proses glukoneogenesis yaitu *glucose-6-phosphatase* dan *fructose-1,6-biphosphatase*. Selain itu, *thymoquinone* juga meningkatkan pengangkutan *uptake* glukosa di jaringan perifer (Fararh, 2005; Houchner, 2007).

Secara *in vivo* diketahui bahwa *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 (Benhoddou-Andaloussi *et al.*, 2011).

2.9 Terapi Diabetes Melitus tipe 2

Berdasarkan *guideline* terapi dari *International Diabetic Federation* (IDF) tahun 2012, algoritma terapi untuk penderita diabetes tipe 2 seperti nampak pada gambar 2.4 berikut:





Gambar 2.3 Algoritma terapi diabetes tipe 2
IDF Global Guideline, 2012

Dari gambar diatas dapat diketahui terapi apa yang digunakan untuk pasien diabetes tipe 2, selanjutnya akan dijelaskan lebih rinci mekanisme kerja masing-masing obat.

a. Metformin

Metformin merupakan satu-satunya golongan biguanide, bekerja dengan 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). Karena alasan inilah, metformin merupakan terapi utama bagi penderita diabetes melitus tipe 2



dengan karakteristik resistensi insulin (IDF, 2012). Dosis lazim penggunaan metformin adalah 850 mg dua kali sehari (Bruton *et al.*, 2008).

b. Sulfonilurea

Mekanisme kerja utama golongan sulfonilurea adalah meningkatkan sekresi insulin oleh pankreas (IDF, 2012; Koda-Kimbel *et al.*, 2008; Dipiro *et al.*, 2008). Sulfonilurea berikatan secara spesifik dengan *Sulfonylurea Receptor* (SUR) pada sel β -langerhan pankreas. Ikatan yang terjadi terletak dekat dengan *adenosin triphosphate-dependent potassium ion* (K^+) *channel* sehingga menyebabkan efluks kalium dan terjadi depolarisasi membran, efluks kalium dari sel menyebabkan terjadinya influks Ca^{2+} . Kadar Ca^{2+} yang tinggi di dalam sel menyebabkan translokasi granul penyekresi insulin ke permukaan sel (Dipiro *et al.*, 2008).

c. Inhibitor α -glukosidase

α -glukosidase Inhibitor menurunkan absorpsi sakarida maupun disakarida di usus halus dengan menghambat kerja dari enzim α -glukosidase khususnya maltase, isomaltase, sucrase dan glucoamilase sehingga tidak terjadi peningkatan glukosa darah setelah makan. Yang termasuk golongan ini adalah miglitol dan acarbose, keduanya digunakan bersama dengan makanan (Dipiro *et al.* 2008).

d. Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor (DPP-4 Inhibitor)

DPP-4 merupakan enzim yang menginaktivasi *Glucagon-like Peptide* (GLP-1) dengan cara memotong rantai asam amino GLP-1, sehingga tidak memiliki aktivitas biologis (Shubrook *et al.*, 2011). Sedangkan GLP-1 memiliki fungsi menstimulasi sekresi insulin,

menurunkan sekresi glukagon, memperlambat pengosongan lambung dan menurunkan nafsu makan (Dipiro *et al.*, 2008; Shubrook *et al.*, 2011). DPP-4 inhibitor ini bekerja dengan menghambat enzim DPP-4 dalam menginaktivasi GLP-1, sehingga masa hidup GLP-1 dapat lebih panjang (Dipiro *et al.*, 2008). Oleh karena itu, dapat menurunkan glukosa *postprandial* atau setelah makan (Bruton *et al.*, 2008).

e. Tiazolidinedion

Merupakan agen selektif agonis dari *nuclear peroxisome proliferator-activated receptor-* (PPAR) yang merupakan gen peregulasi metabolisme karbohidrat dan lemak. Tiazolidinedion membutuhkan insulin saat bekerja. Pada dasarnya thiazolidinedion bekerja dengan meningkatkan sensitivitas insulin di jaringan perifer maupun di hepar. Terjadi peningkatan transport glukosa ke otot dan jaringan lemak karena terjadi pula peningkatan kadar glukosa transposter. Selain itu, tiazolidinedion juga mengaktifasi gen yang meregulasi metabolisme lemak di jaringan perifer (Bruton *et al.*, 2008).

f. Agonis GLP-1

Glucose-like peptide (GLP-1), merupakan satu dari dua enzim yang disekresikan dari usus untuk meningkatkan sekresi insulin saat terjadi konsumsi glukosa. Enzim lain yang juga disekresi oleh usus adalah *glucose-dependent insulintropic polypeptide* (GIP), namun tidak memiliki efek yang signifikan terhadap sekresi insulin pada penderita diabetes melitus tipe 2. GLP-1 dapat menurunkan sekresi glukagon, memperlambat pengosongan lambung dan menurunkan nafsu makan (Bruton *et al.*, 2008).

g. Hormon insulin

Pada tahap akhir terapi diabetes tipe 2, pemberian hormon insulin dari luar tubuh dilakukan sehingga jumlah insulin dalam tubuh cukup. Insulin memiliki peran penting dalam metabolisme karbohidrat dan lemak (Dipiro *et al.*, 2008; Bruton *et al.*, 2008). Terapi insulin diklasifikasikan berdasarkan onset dan durasi kerjanya, terdiri dari *short-rapid acting*, *intermediate acting*, *slow acting*. Penggunaannya sesuai dengan kebutuhan, *short-rapid acting* digunakan untuk mengontrol glukosa *postprandial*, sedangkan *intermediate* dan *slow acting* untuk glukosa basal (Bruton *et al.*, 2008).

2.10 ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

ELISA merupakan suatu teknik yang biasa digunakan untuk menentukan analit yang sudah diketahui, seperti alergen pada makanan, pestisida, residu obat pada hewan, dan sebagainya. Prinsip dasar deteksi ELISA adalah terbentuknya ikatan antara analit (antigen) dengan antibodi spesifik yang diproduksi oleh sistem imun tubuh (Thompson, 2010).

Immunoassay dalam ELISA menggunakan pelabelan enzim seperti *alkalin-fosfatase*, *horseradish peroksidase*, dan *-galaktosidase* yang dapat menghasilkan reaksi warna setelah bereaksi dengan kromogen sebagai substrat dari enzim tersebut. ELISA memiliki tiga parameter dasar yakni:

1. Reaktan yang melekat pada fase padat, yang biasanya berupa lempeng mikrotiter plastik dengan format 8 x 12 sumur.
2. Pemisahan antara reagen yang bebas dan terikat pada reaktan yang sudah dilekatkan pada fase padat dengan teknik pencucian sederhana.

3. Pembacaan hasil didapat melalui terbentuknya warna tertentu.

Ketiga parameter ini digunakan dalam berbagai jenis metode ELISA dasar, yang terdiri atas *direct*, *indirect*, dan *sandwich*. (Wibudi, 2008).

Metode *sandwich* ELISA digolongkan menjadi 2 sistem, yaitu *direct* dan *indirect*. Awalnya sampel yang akan diuji dimasukan terlebih dahulu ke dalam lempeng yang telah dilapisi dengan antigen yang spesifik untuk antibodi tertentu. Jika dalam sampel terdapat antigen yang spesifik, maka akan terbentuk ikatan antigen dan antibodi. Antigen sampel yang tidak terikat dihilangkan dengan teknik pencucian, kemudian antibodi spesifik kedua ditambahkan. Pada metode *direct sandwich* enzim ELISA akan berikatan dengan antibodi spesifik kedua, sedangkan pada *indirect sandwich* enzim ELISA tidak berikatan dengan antibodi kedua. Oleh karena itu pada *indirect* ditambahkan lagi antibodi ketiga untuk membentuk ikatan dengan antibodi kedua yang akan membentuk warna setelah ditambahkan substrat tertentu. Metode ini disebut *sandwich* karena terdapat dua buah antibodi-spesifik antigen yang berikatan dengan antigen di sampel (Koivunen *et al.*, 2006)

