

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Seluruh prosedur yang dilakukan dalam penelitian ini telah dinyatakan laik etik oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya No. 193/EC/KEPK-S1-FARM/03/2014 (lampiran 20).

#### 6.1 Ekstraksi Serbuk Biji Jintan Hitam

Proses ekstraksi yang dipilih adalah ekstraksi maserasi dengan prinsip difusi zat aktif berdasarkan perbedaan konsentrasi. Ekstraksi dimulai dengan menimbang serbuk biji jintan hitam sebanyak 300 gram dimaserasi dengan menggunakan 900 mL pelarut etanol 80% (1 : 3), lalu didiamkan selama 24 jam. Setelah itu dilakukan penyaringan hingga diperoleh maserat dan residu. Residu dimaserasi kembali dengan etanol 80% sebanyak 900 mL dan didiamkan selama 24 jam, dilakukan maserasi kembali hari berikutnya. Kemudian maserat diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu  $< 40^{\circ}\text{C}$ . Hasil dari proses evaporasi selanjutnya di oven pada suhu  $< 40^{\circ}\text{C}$  selama 12 jam untuk mendapatkan ekstrak yang lebih pekat.

Hasil dari proses ekstraksi tersebut, diperoleh ekstrak dengan 2 fase yaitu fase padat dan minyak. Hasil ekstraksi yang diperoleh telah sesuai dengan literatur yang dirujuk yaitu jurnal Andaloussi tahun 2011, dimana dari hasil ekstraksi diperoleh ekstrak dengan 2 fase yaitu fase padat dan minyak dengan komposisi 30% berupa padatan dan 70% berupa minyak. Proporsi tersebut berbeda dengan yang diperoleh pada penelitian ini, dari hasil ekstraksi diperoleh fase padat yang lebih banyak dibandingkan fase minyak. Hal ini dapat disebabkan oleh perbandingan jumlah antara serbuk biji jintan hitam dengan

pelarut etanol yang berbeda, pada penelitian Andaloussi tahun 2011 tidak disebutkan perbandingan jumlah serbuk dengan pelarut yang digunakan. Peneliti menggunakan perbandingan 1 : 3 karena merupakan hasil optimasi dari penelitian sebelumnya dan merujuk pada proses ekstraksi serbuk biji jintan hitam dengan pelarut etanol yang dilakukan oleh Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada (LPPT UGM).

## 6.2 Uji Fitokimia

Berdasarkan jurnal Al-Attar and Al-Taisan tahun 2010 biji jintan hitam mengandung minyak atsiri, alkaloid, dan saponin. Oleh karena itu, dilakukan uji fitokimia secara kualitatif untuk mengetahui adanya zat-zat tersebut pada ekstrak yang digunakan untuk penelitian ini. *Essential oil* merupakan salah satu komponen dari biji jintan hitam dengan kandungan utamanya adalah *thymoquinone* yang diketahui dapat berperan sebagai antiinflamasi, dimana inflamasi merupakan salah satu penyebab terjadinya resistensi insulin (Harzallah *et al.*, 2012). Oleh karena itu perlu dilakukan uji minyak atsiri dan hasilnya ekstrak biji jintan hitam positif mengandung minyak atsiri. Hasil tersebut menunjukkan kemungkinan adanya *thymoquinone* yang terkandung di dalam ekstrak biji jintan hitam yang digunakan untuk terapi hewan coba dengan DM tipe 2, sehingga menghasilkan perbedaan konsentrasi GLUT-4 jaringan otot antar kelompok. Namun, keberadaan *thymoquinone* belum dapat dipastikan karena tidak dilakukan uji kualitatif lain yang lebih spesifik seperti GC-MS atau KLT.

Uji alkaloid dilakukan dengan reagen Mayer (*Potassiomeric iodide*) dan Wagner (*Iodo-potassium iodide*). Hasil positif pada uji Mayer ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna kuning. Endapan tersebut merupakan kompleks yang terbentuk dari kalium dan alkaloid. Alkaloid

mengandung nitrogen yang memiliki pasangan elektron bebas sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam, nitrogen tersebut akan bereaksi dengan ion logam kalium dari kalium tetraiodomerkurat sehingga akan terbentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Marliana *et al.*, 2005). Hasil positif terdapat alkaloid dengan menggunakan reagen Wagner ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna merah kecoklatan. Endapan tersebut adalah kompleks kalium-alkaloid, ion logam kalium akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen pada alkaloid sehingga membentuk kompleks yang mengendap (Marliana *et al.*, 2005).

Pada uji saponin yang dilakukan menunjukkan ekstrak biji jintan hitam positif mengandung saponin. Timbulnya busa pada uji saponin menunjukkan adanya glikosida yang memiliki kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Marliana *et al.*, 2005). Hasil positif terhadap minyak atsiri, alkaloid, dan saponin pada ekstrak biji jintan hitam ini telah sesuai dengan kandungan biji jintan hitam yang terdapat pada literatur.

### **6.3 Efek Pemberian Pakan Tinggi Kalori dan Injeksi STZ terhadap Kadar Glukosa Darah Puasa**

Berdasarkan penelitian Wang tahun 2007 tentang induksi DM tipe 2 secara efektif pada hewan coba, diketahui bahwa pemberian pakan tinggi kalori dan injeksi STZ 30 mg/kgBB. Induksi DM tipe 2 dengan pakan tinggi kalori ini membutuhkan lemak babi dan sukrosa, dimana 20% kebutuhan kalori hewan coba diperoleh dari sukrosa dan 10% kebutuhan kalori hewan coba diperoleh dari lemak babi. Pemberian pakan tinggi kalori ini dilakukan selama dua bulan dengan tujuan menginduksi resistensi insulin, resistensi insulin ditandai dengan hiperglikemia ringan (117-144 mg/dL) dan peningkatan BB. Setelah itu, dilakukan

injeksi STZ dengan dosis rendah yaitu 30 mg/kgBB untuk menghasil kerusakan sel  $\beta$  pankreas parsial sehingga dapat menekan sekresi insulin, kerusakan sel  $\beta$  pankreas tersebut tergantung pada dosis STZ yang digunakan.

Induksi pakan tinggi kalori selama dua bulan mengakibatkan peningkatan BB dan nilai GDP. Peningkatan BB terjadi karena konsumsi pakan yang kaya akan energi yaitu dalam bentuk lemak jenuh (lemak babi) dan lemak tersebut terdeposisi di berbagai bantalan lemak tubuh. Peningkatan nilai BB yang terjadi pada penelitian ini memiliki standar deviasi yang cukup besar (tabel 5.3), hal ini dapat disebabkan oleh perbedaan aktivitas dari masing-masing hewan coba.

Konsumsi pakan tinggi kalori mengakibatkan peningkatan kadar trigliserida (TG) karena asupan lemak yang berlebihan, hal ini merupakan sumber peningkatan ketersediaan asam lemak (Srinivasan *et al.*, 2005). Peningkatan ketersediaan asam lemak di sirkulasi akan menurunkan proses glikolisis akibatnya terjadi peningkatan konsentrasi glukosa intraseluler dan penurunan ambilan glukosa oleh otot (Cahova *et al.*, 2007). Oleh karena itu, pemberian pakan tinggi kalori dapat meningkatkan kadar GDP hewan coba, namun tidak semua hewan coba mengalami hiperglikemia ringan (lampiran 11). Hal tersebut terjadi karena durasi pemberian konsumsi pakan tinggi kalori kurang lama, sehingga pemberian pakan tinggi kalori selama dua bulan masih belum cukup untuk mengakibatkan hiperglikemia ringan.

Berdasarkan penelitian Wang tahun 2007, pemberian pakan tinggi kalori selama satu bulan belum mengakibatkan hiperglikemia ringan, namun telah terjadi perubahan ekspresi gen yang mengarah pada kondisi resistensi insulin seperti penurunan kadar mRNA ADIPOR1 dan ADIPOR2 pada liver. ADIPOR1 dan ADIPOR2 merupakan reseptor untuk adiponektin, penurunan kadar atau

gangguan fungsi pada ADIPOR1 dan ADIPOR2 mengakibatkan terjadinya resistensi insulin di jaringan perifer.

Kemudian induksi DM tipe 2 dilanjutkan dengan injeksi STZ 30 mg/kgBB yang mengakibatkan penurunan BB pada hewan coba, hal ini dikarenakan proses proteolisis yaitu pemecahan protein menjadi asam amino karena tubuh tidak mampu mengambil glukosa sebagai sumber energi, selain itu penurunan BB terjadi karena proses lipolisis dan glikogenolisis (Almeida *et al.*, 2012). STZ memiliki struktur yang mirip dengan glukosa, STZ masuk ke dalam sel  $\beta$  pankreas melalui transporter GLUT-2 yang mengakibatkan kerusakan DNA dan mengakibatkan kematian sel, sehingga kehilangan fungsinya untuk menghasilkan insulin (Ventura-Sobrevilla *et al.*, 2011). Setelah dilakukan injeksi STZ diperoleh nilai GDP  $\geq 200$  mg/dL pada seluruh hewan coba (lampiran 11), sehingga seluruh hewan coba telah mengalami DM tipe 2.

#### **6.4 Efek Pemberian Ekstrak Biji Jintan Hitam terhadap Perbedaan Konsentrasi GLUT-4 di Jaringan Otot**

Setelah dilakukan pengukuran ELISA, diperoleh nilai absorbansi dari masing-masing sampel (lampiran 14). Hasil absorbansi sampel yang diperoleh dibawah rentang normal yaitu 0,2-0,8 sehingga konsentrasi GLUT-4 jaringan otot yang diperoleh kecil pula. Namun, konsentrasi yang diperoleh berada dalam rentang deteksi ELISA yaitu 2  $\mu\text{g/L}$ -48  $\mu\text{g/L}$ .

Injeksi STZ menginduksi penurunan ekspresi mRNA GLUT-4 (Olson, 2012). Hal ini mengakibatkan ambilan glukosa ke dalam jaringan otot menurun sehingga terjadi peningkatan kadar glukosa dalam darah. Kelompok hewan coba yang diberi terapi metformin memiliki konsentrasi GLUT-4 di jaringan otot paling besar diantara kelompok lainnya (tabel 5.5). Metformin merupakan obat yang

efektif untuk menurunkan kadar glukosa darah dengan cara menurunkan produksi glukosa hepatic dan meningkatkan penyimpanan glukosa di otot polos dengan cara meningkatkan aktivitas AMPK (Musi *et al.*, 2002). Peningkatan aktivitas AMPK tersebut dapat mengakibatkan terjadinya peningkatan sintesis dan translokasi GLUT-4 di jaringan otot. Namun tidak ada perbedaan konsentrasi GLUT-4 yang signifikan antara kelompok kontrol postif dengan kelompok lainnya, hal ini dapat terjadi karena durasi terapi yang kurang lama, karena berdasarkan jurnal Musi tahun 2002, metformin dapat menginduksi peningkatan aktivitas AMPK di jaringan otot secara signifikan dengan lama terapi 10 minggu.

Nilai rerata konsentrasi GLUT-4 pada kelompok tikus yang diberi ekstrak biji jintan hitam, baik dengan dosis 24, 48, atau 96 mg/kgBB/hari berada diatas kelompok kontrol negatif, namun tidak signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak biji jintan hitam dapat meningkatkan sintesis GLUT-4 pada jaringan otot. Hasil tersebut sesuai dengan jurnal Andaloussi tahun 2011, dimana dengan pemberian ekstrak biji jintan hitam selama satu bulan dapat meningkatkan konsentrasi total GLUT-4 di jaringan otot tikus. Komponen utama ekstrak biji jintan hitam yang berperan dalam sintesis GLUT-4 di jaringan otot adalah *thymoquinone* yang termasuk dalam golongan minyak atsiri, dimana zat tersebut berfungsi sebagai antiinflamasi. *Thymoquinone* tidak bekerja langsung pada aktivitas AMPK yang berperan dalam sintesis dan translokasi GLUT-4 sehingga konsentrasi total GLUT-4 di jaringan otot yang diperoleh setelah dilakukan terapi selama satu bulan dengan ekstrak biji jintan hitam tidak berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan lainnya.

## 6.5 Efek Pemberian Ekstrak Biji Jintan Hitam terhadap Perbedaan Kadar Glukosa Darah Puasa

Ekstrak biji jintan hitam dapat menurunkan kadar GDP (tabel 5.2), pemberian dosis ekstrak biji jintan hitam 24 mg/kgBB/hari memberikan penurunan GDP yang paling besar. Pada jurnal Alimohammadi tahun 2013 tentang efek ekstrak biji jintan hitam terhadap konsentrasi glukosa darah, terdapat beberapa mekanisme jintan hitam dalam memperbaiki glukosa darah diantaranya adalah peningkatan sensitivitas insulin, penurunan stress oksidatif sehingga dapat menjaga sel  $\beta$  pankreas yang mengakibatkan peningkatan kadar insulin, selain itu dapat meregenerasi sebagian sel-sel islet yang disebabkan oleh injeksi STZ. STZ menginduksi terjadinya degenerasi pankreas dengan menurunkan ukuran dan jumlah islet Langerhans, karena kemampuan jintan hitam dalam menjaga dan meregenerasi sel islet tersebut sehingga dapat menurunkan GDP lebih besar dibandingkan kelompok kontrol yang diberi metformin.

Metformin tidak dapat mengakibatkan pelepasan insulin dari pankreas, cara kerja metformin dalam menurunkan kadar glukosa darah adalah dengan meningkatkan ambilan glukosa perifer, menurunkan pelepasan glukosa hepatic, dan mengganggu absorpsi glukosa di usus (Bastaki, 2005). Penurunan GDP paling besar terjadi pada kelompok P<sub>1</sub> hal ini dikarenakan semakin besar dosis *thymoquinone* yang diberikan, maka akan terjadi penurunan *glutathione* (GSH) yang merupakan antioksidan utama yang dapat mengikat radikal bebas. Berdasarkan jurnal Mansour tahun 2001, *thymoquinone* sebanyak 2 g/kgBB dan 3 g/kgBB yang diberikan secara oral dapat mengakibatkan penurunan GSH.

Pada penelitian ini dosis terbesar yang diberikan adalah 96 mg/kgBB/hari ekstrak biji jintan hitam, sehingga jauh dari dosis yang dapat menurunkan kadar GSH. Oleh karena itu, ketidaksesuaian ini dapat dikarenakan oleh berbagai faktor, yaitu:

1. Tingkat *stress* yang dialami masing-masing hewan coba berbeda-beda, dimana *stress* dapat meningkatkan kadar glukosa darah.
2. Perbedaan aktivitas dari masing-masing hewan coba. Semakin tinggi aktivitas maka dapat menurunkan kadar glukosa darah lebih banyak.
3. Perbedaan genetik yang mempengaruhi respon tikus, akibatnya terdapat variasi nilai GDP meskipun berada dalam satu kelompok perlakuan yang sama.

Pada kelompok  $P_n$  terdapat dua tikus yang masih hidup hingga akhir perlakuan, satu tikus mengalami peningkatan GDP sedangkan tikus lainnya mengalami penurunan GDP. Berdasarkan studi pustaka tidak ditemukan adanya efek 10% tween 80 dalam menurunkan kadar glukosa darah, satu tikus mengalami penurunan kadar GDP meskipun tidak diberi terapi kemungkinan karena respon kompensasi dari tubuh hewan coba tersebut untuk menurunkan kadar glukosa darah misalnya dengan meningkatkan sekresi insulin, meningkatkan penyimpanan glukosa baik pada otot maupun liver, atau karena aktivitas yang berbeda dengan tikus lainnya.

#### 6.6 Keterbatasan Penelitian

Induksi DM tipe 2 yang dilakukan pada penelitian ini mengakibatkan 13 hewan coba mati, sehingga jumlah hewan coba berbeda pada setiap kelompok. Tingkat kematian hewan coba yang tinggi dapat disebabkan oleh induksi DM tipe



2 yang kurang sesuai pada tikus yang sudah tua yaitu 12 bulan, sehingga lebih rentan terjadi kematian.

Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Abukhader tahun 2012 tentang efek rute pemberian terhadap toksisitas *thymoquinone* pada tikus jantan dan betina, disebutkan bahwa pada pemberian *thymoquinone* secara oral selama 5 hari terjadi *adynamic ileus*, hal tersebut terjadi 48 jam setelah diberikan *thymoquinone* sebanyak 300 dan 500 mg/kgBB.

Pada penelitian ini beberapa hewan coba yang mendapat terapi ekstrak biji jintan hitam dosis 24 mg/kgBB-96 mg/kgBB juga mengalami *adynamic ileus* yang dapat mengakibatkan kematian. Tidak dilakukan uji kuantitatif terhadap *thymoquinone* di dalam ekstrak biji jintan hitam yang digunakan, sehingga tidak dapat mengetahui berapa kadar *thymoquinone* yang terkandung di dalam ekstrak yang dapat mengakibatkan kondisi *adynamic ileus* pada beberapa hewan coba.

Selain itu, *adynamic ileus* dapat disebabkan oleh kondisi diabetik ketoasidosis (Debas, 2004). Diabetik ketoasidosis dapat terjadi pada pasien yang mengalami DM tipe 2, dengan kriteria sebagai berikut: hiperglikemia ( $> 250$  mg/dL), ketosis (anion gap  $> 10$ ), dan asidosis (pH arteri  $\leq 7,25$ ). Tanda dan gejala yang terjadi adalah mual, muntah, dehidrasi, polidipsi, poliuri, dan lemas (Cook *et al.*, 2008). Pada penelitian ini terdapat beberapa hewan coba yang memiliki nilai GDP  $> 250$  mg/dL setelah dilakukan terapi, dengan tanda dan gejala polidipsi, poliuri, dan lemas. Namun tidak dilakukan pengukuran elektrolit dan pH darah sehingga belum dapat memastikan terjadinya diabetik ketoasidosis yang menjadi penyebab *adynamic ileus*.