

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

Pada penelitian ini digunakan 4 kelompok perlakuan hewan coba yang masing-masing terdiri dari 6 ekor tikus. Namun, pada proses penelitian terdapat tikus yang mati sehingga jumlah tikus tiap kelompok berbeda. Kelompok kontrol negatif (PN) yang mendapatkan akuades berjumlah 5 ekor, kelompok kontrol positif yang mendapatkan glibenklamid 0,45 mg/kg BB berjumlah 5 ekor, kelompok perlakuan 1 (P1) yang mendapatkan non-nanopartikel ekstrak biji jintan hitam 48 mg/kg BB berjumlah 6 ekor, dan kelompok perlakuan 2 (P2) yang mendapatkan nanopartikel PLGA ekstrak biji jintan hitam 48 mg/kg BB berjumlah 6 ekor.

5.1 Uji Fitokimia Ekstrak Biji Jintan Hitam

Ekstraksi biji jintan hitam dilakukan di Balai Materia Medika Batu Malang Jawa Timur. Metode yang digunakan adalah soxhletasi menggunakan alat Extraction Unit E-816. Sebanyak 150 gram serbuk diekstraksi menggunakan 900 mL pelarut etanol 95% selama 3 jam. Ekstrak dipisahkan dari pelarutnya dengan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak cair biji jintan hitam sebanyak 75,3 gram.

Uji fitokimia kualitatif dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Dilakukan uji fitokimia kualitatif untuk mengetahui kandungan senyawa dalam ekstrak biji jintan hitam dan memastikan

adanya kandungan senyawa *thymoquinone* yang diduga memiliki aktivitas sebagai antidiabetes dan antioksidan. Hasil uji fitokimia kualitatif dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil Uji Fitokimia

Jenis Uji	Metode	Hasil	Keterangan
Minyak atsiri	Penambahan reagen Sudan III	Warna merah	+
Alkaloid	a. Penambahan reagen Mayer	a. Tidak membentuk krim	-
	b. Penambahan reagen Wagner	b. Terbentuk endapan cokelat kemerahan	
	c. Penambahan reagen Dragendorf	c. Tidak terbentuk endapan kuning atau jingga	
Saponin	Pengocokan	Terbentuk buih setinggi 1 cm dan stabil selama 10 menit	+
Flavonoid	a. Penambahan ammonia encer dan H ₂ SO ₄	a. Terbentuk warna kuning	+
	b. Penambahan larutan Al 1%	b. Terbentuk warna kuning	
	c. Penambahan etil asetat dan ammonia encer	c. Terbentuk warna kuning	
Tanin	Penambahan gelatin, NaCl, dan FeCl ₃	Terbentuk endapan berwarna biru kehitaman	+
Terpenoid	Penambahan kloroform dan H ₂ SO ₄	Terbentuk warna cokelat kemerahan pada permukaan	+
<i>Thymoquinone</i>	Kromatografi lapis tipis (KLT)	Didapatkan R _f sebesar 0,77 yaitu sama dengan R _f <i>thymoquinone</i>	+
Keterangan:	(+) = positif mengandung zat yang diuji (-) = negatif/tidak mengandung zat yang diuji		

5.2 Nanopartikel PLGA Ekstrak Biji Jintan Hitam

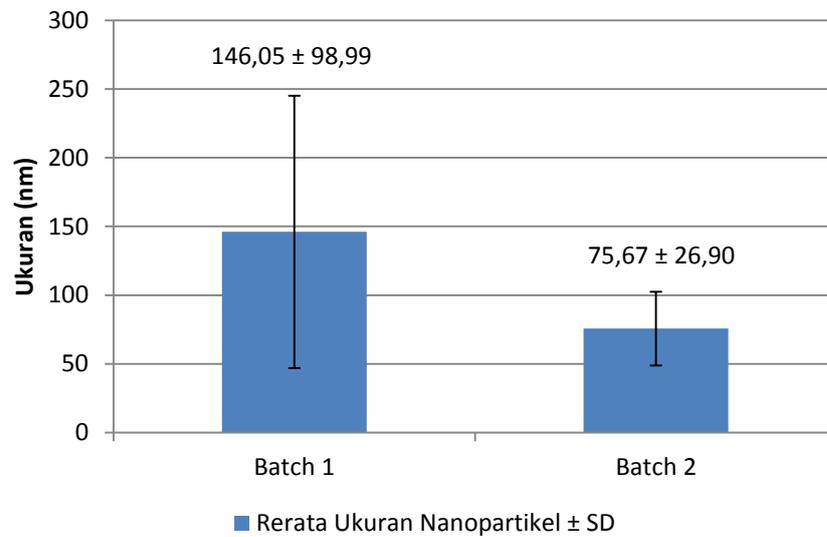
Pembuatan nanopartikel PLGA ekstrak biji jintan hitam dilakukan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya. Nanopartikel dibuat berdasarkan formula Paul *et al.* (2011) dengan perbandingan PLGA : ekstrak : *propylene*

carbonate : pluronic F68 1% = 50 mg : 10 mg : 3 mL : 200 mg/20 mL. Pembuatan nanopartikel dilakukan sebanyak 5 kali. Selain karena waktu pembuatan yang cukup lama, pembuatan nanopartikel secara bertahap dilakukan untuk meminimalisir degradasi zat aktif dalam ekstrak yaitu *thymoquinone* yang sangat sensitif terhadap cahaya. Pellet yang dihasilkan berwarna putih keruh. Hasil berat pellet nanopartikel dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Hasil Pembuatan Nanopartikel

Waktu Terapi	Berat Ekstrak (gram)	Berat Pellet (gram)	Berat Pellet untuk Terapi 1 Hari (gram)
5 hari	0,5760	0,87	0,17
5 hari	0,5760	1,10	0,22
3 hari	0,3456	0,74	0,25
5 hari	0,5760	0,81	0,16
3 hari	0,3456	0,57	0,19
Rerata Berat Pellet untuk Terapi 1 Hari			0,20 ± 0,03
Keterangan: Nanopartikel untuk terapi 1 hari diberikan untuk 6 ekor tikus dengan BB 400 gram			

Karakterisasi nanopartikel dilakukan di Laboratorium FMIPA Universitas Negeri Malang dengan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) FEI Inspect-S50. Berdasarkan Mohanraj *and* Chen (2006), nanopartikel memiliki ukuran 10-1000 nm. Pemeriksaan ukuran nanopartikel dilakukan dengan cara mengambil beberapa sampel lalu diukur. Nanopartikel yang dapat diamati ukurannya adalah granul dengan permukaan kasar, sedangkan granul dengan permukaan halus tidak dapat diamati dikarenakan distribusi partikelnya yang padat. Karakterisasi nanopartikel ini dilakukan pada 2 sediaan yang berbeda waktu pembuatannya untuk membandingkan hasil pengukurannya. Hasil pengukuran nanopartikel tercantum pada lampiran 9. *Batch* 1 memiliki rerata ukuran $146,05 \pm 98,99$ nm, sedangkan *batch* 2 memiliki rerata ukuran $75,67 \pm 26,90$ nm. Hasil rerata ukuran nanopartikel dapat dilihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Histogram Rerata Ukuran Nanopartikel

Keterangan: Hasil pengukuran nanopartikel berdasarkan pengambilan sampel secara acak

5.3 Pengukuran Berat Badan

Pengukuran berat badan (BB) dilakukan setiap hari selama proses penelitian untuk mengetahui peningkatan atau penurunan BB tikus dan menentukan dosis terapi hewan coba berdasarkan BB pada fase terapi. Sebelum dilakukan induksi HFD, BB tikus berkisar antara 179-350 gram. Setelah 40 hari diberikan HFD, BB tikus pada semua kelompok perlakuan meningkat menjadi 276-455 gram. Tiga hari setelah tikus diinduksi STZ BB tikus menurun menjadi 233-447 gram. Setelah pemberian terapi glibenklamid, non-nanopartikel ekstrak biji jintan hitam, dan nanopartikel PLGA ekstrak biji jintan hitam, BB yang terukur pada akhir periode terapi mengalami penurunan pada semua kelompok perlakuan menjadi 188-450 gram (Tabel 5.3).

Tabel 5.3 Hasil Pengukuran Berat Badan

Kelompok Perlakuan	Berat Badan (gram)			
	Hari ke-0	Hari ke-40 setelah induksi HFD	Hari ke-3 setelah injeksi STZ	Hari ke-26 setelah terapi
PN	179-350	320-445	233-447	235-450
PP	196-253	325-439	304-400	209-316
P1	195-229	280-414	247-361	188-315
P2	190-346	276-455	244-380	199-392

Keterangan: Hasil pengukuran berat badan ditampilkan dalam bentuk rentang

Kelompok perlakuan yang mengalami peningkatan BB terbesar selama induksi HFD adalah P1, sedangkan kelompok perlakuan dengan peningkatan BB paling rendah adalah PN. Penurunan BB terbesar setelah tikus mengalami DM terjadi pada kelompok perlakuan P1, sedangkan penurunan berat badan paling rendah terjadi pada kelompok perlakuan PN (Tabel 5.4).

Tabel 5.4 Nilai Peningkatan Berat Badan Selama Induksi DM Tipe 2 dan Penurunan Berat Badan selama Terapi

Kelompok Perlakuan	N	Δ Rerata BB hari ke-40 HFD dengan hari ke-0 HFD (gram) \pm SD	Δ Rerata BB hari ke-26 terapi dengan hari ke-0 terapi (gram) \pm SD
PN	5	130,60 \pm 92,35	-85,40 \pm 60,39
PP	5	145,40 \pm 102,81	-110,00 \pm 77,78
P1	6	160,33 \pm 113,37	-139,50 \pm 98,64
P2	6	138,00 \pm 97,58	-115,67 \pm 81,79

Keterangan: (-) = penurunan berat badan

Dari uji normalitas *Shapiro-Wilk* didapatkan distribusi data sebagai berikut (Tabel 5.5).

Tabel 5.5 Hasil Uji Normalitas Data Berat Badan

Fase Induksi	Nilai p	Keterangan
Hari ke-0	0,000	Distribusi tidak normal
Hari ke-40 setelah induksi HFD	0,417	Distribusi normal
Hari ke-3 setelah injeksi STZ	0,353	Distribusi normal
Hari ke-26 setelah terapi	0,002	Distribusi tidak normal

Keterangan: $p > 0,05$ = distribusi normal
 $p < 0,05$ = distribusi tidak normal

Dari uji homogenitas didapatkan data memiliki variansi yang homogen ($p > 0,05$) dengan nilai $p = 0,743$. Dari hasil uji *Kruskal-Wallis* didapatkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna. Untuk mengetahui kelompok yang mempunyai perbedaan dilakukan uji *Mann-Whitney*. Berdasarkan hasil uji *Mann-Whitney*, semua pengukuran memiliki perbedaan yang bermakna (Tabel 5.6). Hasil uji statistik dapat dilihat pada Lampiran 18.

Tabel 5.6 Hasil Uji *Mann-Whitney* terhadap Berat Badan

Nilai p	Hari ke-0	Hari ke-40 setelah induksi HFD	Hari ke-3 setelah injeksi STZ	Hari ke-26 setelah terapi
Hari ke-0	-	0,000*	0,000*	0,013*
Hari ke-40 setelah induksi HFD	0,000*	-	0,014*	0,000*
Hari ke-3 setelah injeksi STZ	0,000*	0,014*	-	0,000*
Hari ke-26 setelah terapi	0,013*	0,000*	0,000*	-

Keterangan: (*) nilai $p < 0,05$ = signifikan secara statistik

5.4 Pengukuran Kadar Glukosa Darah Puasa

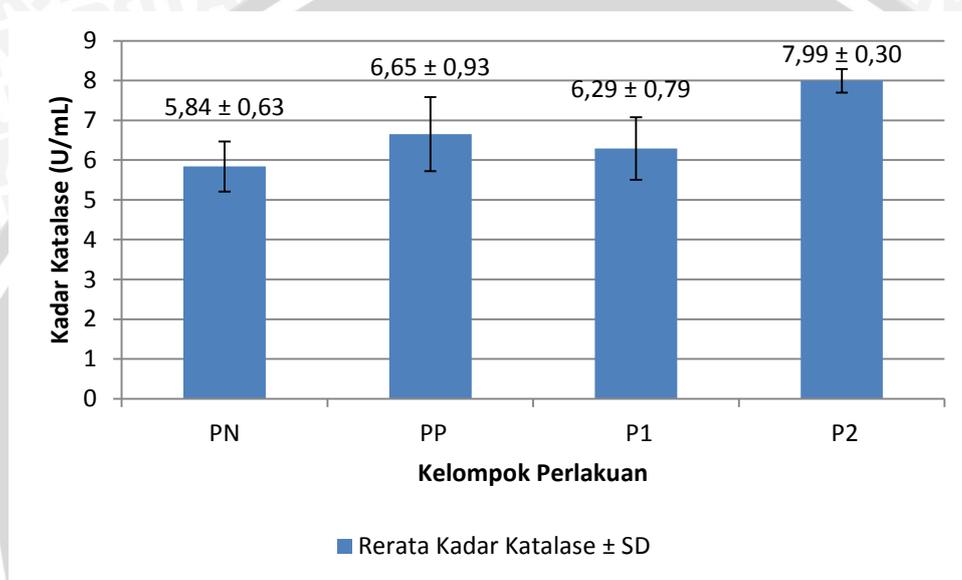
Pengukuran glukosa darah puasa (GDP) dilakukan sebelum perlakuan, 40 hari setelah induksi HFD, 3 hari setelah induksi STZ, dan 26 hari setelah terapi sehingga selama perlakuan didapatkan 4 data GDP. Hasil pengukuran GDP ini tidak dapat diuji secara statistik maupun ditampilkan dalam histogram karena beberapa data menunjukkan hasil GDP yang sangat tinggi hingga kadar yang melampaui kapasitas pengukuran alat (Lampiran 11). Dari hasil pengukuran GDP sebelum perlakuan dan 1 bulan setelah induksi HFD didapatkan peningkatan kadar GDP pada semua kelompok perlakuan, namun ada 1 tikus pada kelompok perlakuan PN dengan kadar GDP yang tetap. Berdasarkan Jung *et al.* (2011), tikus didefinisikan DM jika kadar GDP > 126 mg/dL. Dari hasil induksi HFD, hanya 7 ekor tikus dari total 22 ekor tikus mengalami DM yang tersebar pada semua kelompok perlakuan. Setelah 3 hari dilakukan induksi STZ, kadar GDP tikus meningkat tajam bahkan tidak dapat dideteksi oleh alat yang menandakan bahwa semua tikus mengalami DM. Setelah 26 hari diberikan terapi, sebagian besar tikus pada semua kelompok perlakuan tidak mengalami penurunan kadar GDP melainkan cenderung meningkat atau tetap.

5.7 Pengukuran Kadar Katalase Pankreas

Pengukuran kadar katalase pankreas menggunakan *StressXpress® Catalase Activity Kit*. Kit ini berisi *bovine catalase standard* untuk pembuatan kurva standar. Pada pengukuran katalase, *Horseradish peroxidase* (HRP) bereaksi dengan substrat (*Colorimetric Detection Reagent*) dengan adanya hidrogen peroksida untuk mengubah substrat tidak berwarna menjadi produk yang berwarna merah muda. Peningkatan kadar katalase pada sampel

menyebabkan penurunan kadar hidrogen peroksida. Absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 570 nm.

Kadar katalase diperoleh dengan memasukkan nilai absorbansi sampel ke dalam persamaan kurva baku $y = -0,1320x + 1,2353$ dan nilai $R = 0,9998$. Rerata kadar katalase dapat dilihat pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Histogram Rerata Kadar Katalase

Keterangan:

PN = tikus model DM tipe 2, diberikan HFD (*High Fat Diet*) selama 40 hari dan akuades selama 26 hari.

PP = tikus model DM tipe 2, diberikan HFD selama 40 hari dan glibenklamid 0,45 mg/kg BB selama 26 hari.

P1 = tikus model DM tipe 2, diberikan HFD selama 40 hari dan non-nanopartikel ekstrak biji jintan hitam 48 mg/kg BB/hari selama 26 hari.

P2 = tikus model DM tipe 2, diberikan HFD selama 40 hari dan nanopartikel PLGA ekstrak biji jintan hitam 48 mg/kg BB/hari selama 26 hari.

Dari uji normalitas *Shapiro-Wilk* didapatkan bahwa data memiliki distribusi yang normal (Tabel 5.7).

Tabel 5.7 Hasil Uji Normalitas Data Kadar Katalase

Kelompok Perlakuan	Nilai p	Keterangan
PN	0,066	Distribusi normal
PP	0,301	Distribusi normal
P1	0,337	Distribusi normal
P1	0,223	Distribusi normal

Keterangan: $p > 0,05$ = distribusi normal
 $p < 0,05$ = distribusi tidak normal

Hasil uji homogenitas varian menunjukkan bahwa data mempunyai varian yang sama ($p > 0,05$) dengan nilai $p = 0,068$. Selanjutnya dilakukan uji *One-way ANOVA* diperoleh nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Dari hasil uji tersebut dapat ditarik kesimpulan bahwa paling tidak terdapat perbedaan kadar katalase yang signifikan pada 2 kelompok. Untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan dilakukan analisa *Post Hoc* dari uji *One-way ANOVA* menggunakan *Least Significant Difference* (LSD) Uji LSD menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) pada kelompok P2 dengan PN, PP, dan P1 (Tabel 5.8). Hasil uji statistik dapat dilihat pada Lampiran 18.

Tabel 5.8 Hasil Uji LSD terhadap Kadar Katalase

Nilai p	PN	PP	P1	P2
PN	-	0,079	0,295	0,000*
PP	0,079	-	0,397	0,005*
P1	0,295	0,397	-	0,000*
P2	0,000*	0,005*	0,000*	-

Keterangan: (*) nilai $p < 0,05$ = signifikan secara statistik