BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes mellitus (DM) adalah suatu sindroma gangguan metabolisme dan ditandai dengan hiperglikemia yang disebabkan oleh defisiensi sekresi insulin dan atau gangguan kerja insulin. Diabetes mellitus 1 (DM 1) atau *Insulin Dependent Diabetes Mellitus* (IDDM) terjadi karena adanya kerusakan pada sel - β pankreas yang memproduksi insulin (LeRoith *et al.,* 2004). Diabetes mellitus 1 dapat disebabkan oleh adanya infeksi virus, pemberian senyawa toksin, diabetogenik (streptozotosin serta aloksan), atau secara genetik *(wolfram syndrome)* (Nugroho, 2006).

Prevalensi kejadian diabetes mellitus pada hewan menurut *Center for Disease Control and Prevention* (CDCP) tahun 2008 di Amerika Serikat terdapat sekitar 1 dari 500 anjing dan 1 dari 200 kucing didiagnosis terjangkit diabetes mellitus. Diabetes mellitus pada hewan peliharaan seperti anjing disebabkan oleh pemberian pakan yang tinggi lemak maupun pemberian pakan melebihi kebutuhan tubuhnya (Hess *et al.,* 2000). Faktor – faktor yang dapat memicu terjadinya diabetes pada hewan, antara lain umur, jenis kelamin, ras, dan lingkungan (Fall *et al*., 2007).

Pada penderita diabetes mellitus, hiperglikemia dapat menimbulkan berbagai komplikasi kronik pada hepar, ginjal, dan pembuluh darah (Frances *et al*., 2010). Hiperglikemia adalah kondisi dimana tingginya kadar gula dalam darah yang dapat disebabkan karena jumlah insulin yang dihasilkan sel β pankreas

kurang dari jumlah yang dibutuhkan. Hiperglikemia kronis akan menyebabkan peningkatan aktifitas sitokin seperti TNF-α dan IL. *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF-α) merupakan sitokin pro-inflamasi yang memegang peranan patogenik dalam penyakit inflamasi kronik seperti kanker, penyakit jantung, dan diabetes mellitus (Esposito *et al*., 2002). Peningkatan kadar TNF-α berhubungan dengan komplikasi penyakit pada penderita diabetes mellitus, sehingga peningkatan ekspresi TNF-α dapat berfungsi sebagai biomarker inflamasi pada diabetes mellitus (Rajarajeswari *et al.*, 2011).

Diabetes mellitus dapat menyebabkan perubahan fungsi biokimia di hepar seperti perubahan metabolisme karbohidrat, lipid, protein, dan perubahan status antioksidan (Wellen and Hostamigil, 2005). Dilaporkan bahwa hiperglikemia dapat meningkatkan radikal bebas yang menyebabkan stres oksidatif dan peradangan di hepar pada hewan model tikus diabetes mellitus yang diinduksi streptozotocin (Frances *et al.*, 2010). *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan TNF-α merupakan penyebab utama yang berperan dalam proses kematian sel hepar.. Peningkatan radikal bebas di hepar secara langsung dapat menyebabkan kerusakan lain seperti kerusakan sistem membran sel, apoptosis, degenerasi dan nekrosa sel hepar (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

Pada penderita diabetes mellitus tipe, untuk mengontrol level glukosa dikonsumsi obat anti hiperglikemik, atau insulin. Akan tetapi, dilaporkan adanya efek samping. Pengembangan penelitian tentang tanaman anti hiperglikemi sangat dibutuhkan untuk pengobatan alternatif DM. Beberapa tanaman berpotensi secara

empiris, telah terbukti secara ilmiah, salah satunya adalah *Ruellia tuberosa L.* (Pletekan) (Dean *et al*, 2005).

Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) merupakan tanaman tropis yang tersebar di seluruh Asia Tenggara. Dalam pengobatan herbal, *Ruellia tuberosa* L. telah digunakan sebagai anti diuretik, anti diabetes, anti piretik, analgesik, dan anti hipertensi (Chwan *et al.*, 2006 ; Fu-an *et al.*, 2006). Menurut Ullah *et al.*, (2012) ekstrak metanol dari daun pletekan memiliki aktivitas penurunan gula darah pada kelinci yang diinjeksi *alloxan monohydrate* (150 mg/kg BB). Aktifitas penurunan gula darah diperoleh dari ekstrak *Ruellia tuberosa* L. yang mengandung flavonoid. Flavonoid memiliki aktivitas antioksidan, antiinflamasi, inhibitor enzim pencernaan, dan antihiperlipidemi. Ekstrak *Ruellia tuberosa* L. dapat berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi pada sel hepar saat terjadi kerusakan hepar (Agnieszka *et al.*, 2011).

Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak metanol daun pletekan (*Ruellia tuberossa* L.) yang diberikan secara sonde lambung sebagai terapi diabetes mellitus 1 pada model tikus *(Rattus novergicus)* hasil induksi Streptozotocin terhadap ekspresi TNF-α dan histopatologi hepar.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan berikut :

1. Apakah terapi ekstrak metanol daun pletekan *(Ruellia tuberossa* L.*)* dapat menurunkan ekspresi TNF-α pada hepar tikus *(Rattus novergicus)* diabetes mellitus 1 hasil induksi streptozotocin ?
2. Apakah pemberian ekstrak metanol daun pletekan *(Ruellia tuberossa* L.*)* memperbaiki jaringan hepar yang diamati pada gambaran histopatologi hepar pada tikus *(Rattus novergicus)* diabetes mellitus 1 hasil induksi streptozotocin ?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan model diabetes mellitus 1 yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan, umur 2.5 bulan dan berat badan antara 150 – 200 gram sebanyak 18 ekor yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penggunaan hewan coba telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No: 250-KEP-UB. **(Lampiran 1)**.
2. Pembuatan keadaan diabetes mellitus 1 pada hewan model tikus dilakukan dengan cara injeksi streptozotocin secara intraperitonial dengan dosis

streptozotocin 20 mg/kg BB per hari selama 5 hari berturut – turut. Kriteria Diabetes mellitus kadar gula darah puasa > 200mg /dl (Lukiati *et al*., 2012).

3. Ekstrak *Ruellia tuberossa* L. didapatkan dengan ekstraksi dengan cara maserasi dan pemekatan (Chwan *et al.*, 2006).
4. Terapi ekstrak metanol daun pletekan (*Ruellia tuberossa* L.) sebanyak 450 mg/kgBB yang dilarutkan dengan minyak jagung selama 10 hari (10 hari berturut-turut dosis tunggal). Pemberian terapi dilakukan dengan cara per oral (sonde) sebanyak 2 mL sesuai dengan berat badan tikus putih DM 1.
5. Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF-α yang diukur menggunakan immunohistokimia dan kerusakan organ hepar menggunakan pewarnaan HE.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak metanol daun pletekan *(Ruellia tuberossa* L.*)* sebagai terapi diabetes mellitus 1 pada model tikus *(Rattus novergicus)* hasil induksi streptozotocin dalam menurunkan ekspresi TNF-α pada organ hepar.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak metanol daun pletekan *(Ruellia tuberossa* L.*)* sebagai terapi diabetes mellitus 1 pada model tikus *(Rattus novergicus)* hasil induksi Streptozotocin dalam memperbaiki jaringan hepar yang diamati pada gambaran histopatologi hepar.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang manfaat senyawa bioaktif dari ekstrak metanol daun *Ruellia tuberossa* L. sebagai agen antidiabetes sehingga dapat dijadikan dasar terapi alternatif untuk memperbaiki kerusakan jaringan hepar akibat diabetes mellitus 1.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes mellitus (DM)

2.1.1 Definisi

Diabetes mellitus adalah penyakit kelainan metabolik yang dikarakteristikkan dengan hiperglikemia kronis serta kelainan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang diakibatkan oleh kelainan sekresi insulin, kerja insulin maupun keduanya (John, 2006). Hiperglikemia kronis pada diabetes mellitus akan disertai dengan kerusakan, gangguan fungsi beberapa organ tubuh khususnya mata, ginjal, saraf, jantung, dan pembuluh darah. Walaupun pada diabetes mellitus ditemukan gangguan metabolisme semua sumber makanan tubuh, kelainan metabolisme yang paling utama ialah kelainan metabolisme karbohidarat. Oleh karena itu diagnosis diabetes mellitus selalu berdasarkan tingginya kadar glukosa dalam plasma darah (WHO, 2006).

2.1.2 Etiologi

Diabetes mellitus (DM) dapat dibagi menjadi DM 1, DM tipe 2 dan DM dalam kehamilan. DM 1 atau yang dulu dikenal dengan nama *Insulin Dependent Diabetes Mellitus* (IDDM), terjadi karena kerusakan sel β pankreas (reaksi autoimun). Sel β pankreas merupakan satu-satunya sel tubuh yang menghasilkan insulin yang berfungsi untuk mengatur kadar glukosa dalam tubuh. Bila kerusakan sel β pankreas telah mencapai 80-90% maka gejala DM mulai muncul (Nugroho, 2006).

Diabetes Mellitus (DM) Tipe II merupakan penyakit hiperglikemi akibat insensivitas sel terhadap insulin. Kadar insulin mungkin sedikit menurun atau berada dalam rentang normal. Karena insulin tetap di hasilkan oleh sel-sel beta pankreas, maka diabetes mellitus tipe II dianggap sebagai non insulin Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM) (Corwin, 2009). Pada diabetes ini terjadi penurunan kemampuan insulin bekerja di jaringan perifer *(insulin resistance)* dan disfungsi sel β. Akibatnya, pankreas tidak mampu memproduksi insulin yang cukup untuk mengkompensasi *insulin resistance*. Kedua hal ini menyebabkan terjadinya defisiensi insulin relatif. Kegemukan sering berhubungan dengan kondisi ini (Soegondo, 2007).

Diabetes mellitus dalam kehamilan (*Gestational Diabetes Mellitus - GDM*) adalah kehamilan yang disertai dengan peningkatan *insulin resistance* (ibu hamil gagal mempertahankan *euglycemia*). Pada umumnya mulai ditemukan pada kehamilan trimester kedua atau ketiga. Faktor risiko GDM yakni riwayat keluarga DM, kegemukan dan glikosuria (Soegondo, 2007).

Diabetes mellitus merupakan gangguan endokrin yang paling sering terjadi. Kondisi ini terjadi karena kerusakan sel β pankreas, sehingga insulin tidak terbentuk dan mengakibatkan penumpukan glukosa dalam darah. Gejala akut yang pada penderita DM diakibatkan oleh efek insulin yang tidak adekuat, karena insulin adalah satu – satunya hormon yang berfungsi menurunkan gula darah. Gejala klinis diabetes mellitus antara lain : poliuria, polidipsi dan polifagi disertai dengan gula darah sewaktu ≥200 mg/dL dan gula darah puasa ≥126mg/dL.

Peningkatan gula darah (hiperglikemia) merupakan salah satu indikator utama penyakit diabetes mellitus (Smeltzer, 2001).

2.1.3 Patofisiologi Diabetes mellitus 1

Diabetes mellitus 1 merupakan diabetes mellitus yang diperantarai oleh degenerasi sel beta langerhans pankreas akibat infeksi virus, pemberian senyawa toksin, diabetogenik *(*streptozotocin, aloxan*)*, atau secara genetik *(wolfram syndrome)* yang mengakibatkan produksi insulin sangat rendah atau berhenti sama sekali (Nugroho, 2006). Dari sekian banyak jenis sel pankreas hanya sel beta yang dihancurkan oleh sistem imun. Kerusakan sel beta dapat diperantai oleh proses autoimun. Sel beta peka terhadap efek toksik dari beberapa sitokin seperti *Tumor Necrosis Factor* α (TNF-α), interferon γ (IFN-γ), dan interleukin 1 (IL-1). Mekanisme dari proses kematian sel beta belum diketahui dengan pasti, namun proses ini dipengaruhi oleh pembentukan metabolit *nitric oxide* (NO), apoptosis dan sitotoksisitas dari sel T CD8+. Petanda destruksi imun yang dapat diperiksa adalah *autoantibody islet cell, autoantiboy insulin, autoantibody glutamic acid decarboxylase* (GAD65). Satu atau lebih antibodi tersebut terdeteksi pada 80-85% penderita hiperglikemia saat awal deteksi (Ahrens, 2011).

Dasar dari abnormalitas imun pada DM 1 adalah kegagalan dari *self-tolerance* sel T. Kegagalan toleransi ini dapat disebabkan oleh defek delesi klonal pada sel T *self-reactive* pada timus, defek pada fungsi regulator atau resistensi sel T efektor terhadap supresi sel regulator. Hal – hal tersebut membuat sel T autoreaktif bertahan dan siap untuk merespon terhadap *self-antigens*. Aktivasi awal dari sel tersebut terjadi pada nodus limfe peripankreatik sebagai respon

terhadap antigen yang dilepaskan dari sel Pulau Langerhans yang rusak. Sel T yang teraktivasi bergerak ke pankreas kemudian merusak sel β. Sel T yang dapat menyebabkan kerusakan tersebut adalah sel TH_1 (dengan cara mensekresi sitokin seperti IFN-γ and TNF-α) dan CD8+ CTLs (Kleemann *et al*., 2008).

Menurut Lawrence dalam Nugroho (2006), pada tikus DM 1, kadar glukosa darah sangat tinggi tetapi tubuh tidak dapat memanfaatkannya secara optimal untuk membentuk energi. Oleh karena itu, energi diperoleh melalui peningkatan katabolisme protein dan lemak. Terjadi perangsangan lipolisis serta peningkatan kadar asam lemak bebas dan gliserol darah. Dalam hal ini terjadi peningkatan produksi asetil-KoA oleh hepar, yang pada gilirannya diubah menjadi asam asetoasetat dan pada akhirnya direduksi menjadi asam β-hidroksibutirat atau mengalami dekarboksilasi menjadi aseton. Pada kondisi normal, konsentrasi benda-benda keton relatif rendah karena insulin dapat menstimulasi sintesis asam lemak dan menghambat lipolisis. Hanya dibutuhkan kadar insulin yang kecil untuk menghambat lipolisis.

Diabetes mellitus yang tidak dikontrol dengan baik dapat menyebabkan stres oksidatif, dimana produksi radikal bebas (oksidan) yang melebihi kemampuan antioksidan tubuh untuk meredamnya. Sumber stres oksidasi pada diabetes disebabkan perpindahan keseimbangan reaksi redoks karena perubahan metabolisme karbohidrat dan lipid yang akan meningkatkan pembentukan ROS dari reaksi glikasi dan oksidasi lipid sehingga menurunkan sistem pertahanan antioksidan (Nugroho, 2006). ROS akan meningkatkan pembentukan ekspresi *Tumour necrosis factor-α* (TNF-α) dan memperparah stres oksidatif.

2.2 Hewan coba Tikus (*Rattus novergicus*) Model Diabetes Mellitus 1

Tikus yang digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian yaitu tikus putih *Rattus norvegicus* strain wistar. Sistem klasifikasi tikus *Rattus norvegicus* menurut Armitage (2004) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Genus	: *Rattus*
Spesies	: *Rattus norvegicus*
Galur	: Wistar

Gambar 2.1 Tikus Putih strain Wistar *(Rattus norvegicus)* (Gultom, 2003).

Hewan coba merupakan hewan yang sengaja dipelihara yang digunakan sebagai hewan model untuk mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan penelitian. Tikus putih (*Rattus norvegicus)* umum digunakan sebagai hewan model diabetes mellitus dikarenakan memiliki beberapa keunggulan yaitu sistem metabolismenya yang

hampir sama dengan manusia (terutama metabolisme glukosa), sehingga memudahkan dalam melakukan penelitian (Ress and Alcolado, 2005). *Rattus norvegicus* memiliki ciri antara lain rambut tubuh berwarna putih dan mata yang merah, panjang tubuh total 440 mm, panjang ekor 205 mm, bobot *Rattus norvegicus* pada usia dewasa adalah sekitar 200 - 500 gram (Sirois, 2005).

Pembuatan hewan model diabetes mellitus dilakukan dengan pemberian diabetogenik. Diabetogenik yang sering digunakan adalah aloksan, streptozotosin, dithizone, 8-hidroksikuinolon dan vacor (Rees and Alcolado, 2005). Hewan yang diberi diabetogenik akan mengalami gejala seperti glikosuria sebagai tanda telah mengalami diabetes. Pada tikus diabetes mellitus terjadi kelainan metabolisme karbohidrat dan lemak. Noortiningsih (2004) menyatakan penyakit diabetes mellitus merupakan penyakit menahun yang ditandai dengan peningkatan kadar gula darah (hiperglikemia).

Streptozotosin merupakan derivat nitrosuria yang diisolasi dari *Streptomyces achromogenes* yang mempunyai aktivitas anti-neoplasma dan antibiotik spektrum luas. Streptozotosin dapat secara langsung merusak masa kritis sel β Langerhans atau menimbulkan proses autoimun terhadap sel β sehingga lebih banyak digunakan dalam pembuatan hewan uji DM. DM 1 juga dapat dirancang pada hewan uji melalui pankreatektomi total ataupun secara genetik sehingga mengakibatkan disfungsi pankreas dalam mensekresi insulin (Alcolado, 2005).

Aloksan merupakan bahan kimia yang digunakan untuk menginduksi diabetes pada binatang percobaan. Pemberian aloksan adalah cara yang cepat

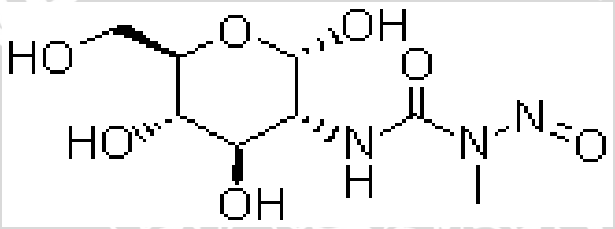
untuk menghasilkan kondisi diabetik eksperimental (hiperglikemik) pada binatang percobaan (Lenzen, 2008). Aloksan dapat diberikan secara intravena, intraperitoneal, atau subkutan pada binatang percobaan. Aloksan dapat menyebabkan diabetes mellitus tergantung insulin pada binatang tersebut (aloksan diabetes) dengan karakteristik mirip dengan diabetes mellitus 1 pada manusia. Aloksan bersifat toksik selektif terhadap sel beta pankreas yang memproduksi insulin karena terakumulasinya aloksan secara khusus melalui transporter glukosa yaitu GLUT2 (Kram and Keller, 2001). Aloksan merupakan senyawa hidrofilik dan tidak stabil yang diperantarai oleh oksidasi senyawa dengan gugus SH, penghambatan glukokinase, pembangkiran radikal bebas dan gangguan homestatis ion kalsium intraseluler (Nugroho, 2006).

2.3 Mekanisme Streptozotocin (STZ)

Streptozotocin **(Gambar 2.2)** merupakan *N-nitroso* derivate *D-glucosamine* digunakan secara luas untuk menginduksi model hewan coba diabetes mellitus 1 maupun tipe 2, disintesis dari *Streptomycetes achromogenes*. Beberapa penelitian menggunakan STZ untuk menginduksi diabetes mellitus 1 dengan dosis rendah tunggal (40-60 mg/kg BB), atau dosis tinggi, tetapi penggunaan STZ dosis rendah kurang dari 40 mg/kg BB tidak efektif. STZ juga dapat diberikan dalam dosis rendah ganda 20mg/kg BB (*Multiple low dose*) (Arunachalam and Parimelazhagan, 2013).

Streptozotocin menembus sel β melalui transporter glukosa (GLUT 2), intraseluler melalui nitrosourea akan menyebabkan alkilasi DNA melalui aktivitas poly ADP ribosilasi yang mengakibatkan penekanan NAD+ dan ATP seluler.

Selanjutnya peningkatan defosforilasi ATP yang menghambat sekresi dan sintesis insulin serta akan memacu peningkatan substrat untuk reaksi katalis xanthine oxidase yang akan menghasilkan radikal superoksidase, menyebabkan kerusakan sel beta pankreas. Metabolisme STZ juga menghasilkan *Nitric Oxide* (NO) melalui peningkatan aktivitas guanilil siklase dan pembentukan cGMP serta mengakibatkan oksigen reaktif yang memiliki kontribusi dalam kerusakan sel β (Nugroho, 2006).



Gambar 2.2 Struktur STZ (Szkudelski, 2001).

Pembentukan anion superoksida dan peningkatan aktivitas xanthine oksidase akan menghambat siklus kreb dan menurunkan konsumsi oksigen mitokondria, akibatnya produksi ATP mitokondria terbatas menyebabkan pengurangan secara drastis nukleotida sel beta pankreas yang berujung pada kerusakan sel tersebut (Nugroho, 2006). Sel yang mengalami nekrosis, meningkatkan respon proinflamasi dari makrofag dan menginduksi reaksi imun dengan melepaskan sitokin pro-inflamasi seperti TNF-α. Pada DM 1, keabnormalan sistem imun dipicu oleh kematian sel secara nekrosis, kemudian menyebabkan kematian sel secara apoptosis. Apoptosis sel β pankreas menyebabkan defisiensi insulin yang mendorong hiperglikemi. Kondisi ini

menurunkan kemampuan jaringan untuk menggunakan glukosa, sehingga menimbulkan gangguan metabolisme lemak dan protein (Je *et al.*, 2001).

2.4 *Ruellia tuberossa* L. (Pletekan)

Tanaman *Ruellia tuberossa* L. **(Gambar 2.3)** secara taksonomi mempunyai klasifikasi sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Divisio	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Subclass	: Asteridae
Ordo	: Scrophulariales
Famili	: Ancanthaceae
Genus	: Ruellia
Species	: *Ruellia tuberose L*

Gambar 2.3 Tanaman *Ruellia tuberossa* L (Ullah *et al.*, 2011)

Ruellia tuberossa L. bernama lain pletekan, pletikan, ceplikan (Jawa), *minnieroot, watercannon* berupa semak yang berasal dari Amerika yang telah

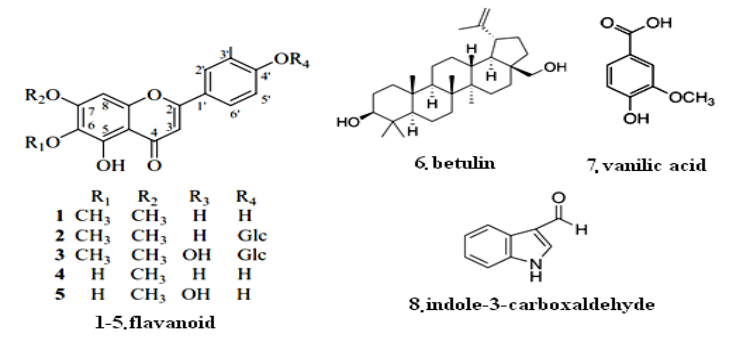
lama ternaturalisasi di Jawa. Morfologi tanaman batang segiempat tumpul, helaian daun bentuk memanjang hingga bulat telur terbalik dengan tepi daun bergigi, mahkota berwarna ungu cerah, kelopak bunga berbentuk segitiga (Rajan *et al.*, 2012).

Ruellia tuberrossa L. secara tradisional digunakan untuk pengobatan sebagai diuresis, antidiabetes, antipiretik, antihipertensi, antiinflamasi dan bahan antidot (Wulan *et al*, 2014). Berdasarkan uji aktivitas ekstrak etil asetat daun pletekan secara signifikan menurunkan gula darah dan ekstrak heksana cukup baik menurunkan kadar gula darah pada dosis pemberian 100 dan 150 mg/kgBB terhadap kelinci diabetes yang diinduksi aloksan (Ullah *et al.,* 2011). Ekstrak air daun *R. tuberossa L*. berpengaruh terhadap SGOT, SGPT dan gambaran histologis hepar tikus diabetes (Ardiani dan Lestriana, 2008). Ekstrak 50% hidroetanol dari *R. tuberrosa L* dosis 500mg/kgBB tidak hanya mengontrol tingkat lipid peroksida tetapi juga membantu meningkatkan potensi antioksidan. Bersifat non toksik pada dosis 5000 mg/kgBB pada tikus dan kelinci yang diinduksi aloksan (Ullah *et al.*, 2011; Rajan *et al.*, 2012).

2.5 Kandungan *Ruelia tuberrosa* L.

Studi fitokimia dari fraksi etil asetat menunjukkan adanya triterpenoid dan flavanoid, sedangkan pada fraksi n-heksan menunjukkan senyawa fitosterol. Kemungkinan mekanisme penurunan aktivitas kadar gula darah disebabkan kandungan flavanoid dan fitosterol (Wulan *et al.,* 2014). Flavanoid bertindak sebagai *quenching free radical*, sedangkan fitosterol bertindak merangsang sekresi insulin (Ullah *et al.,* 2011).

Menurut Chwan *et al.*, (2006) dari 12,5 kg simplisia bagian batang dan daun pletekan, menghasilkan ekstrak metanol pletekan (ekstraksi panas pada 50° C) yang mengandung 5 flavanoid yaitu: cismaritin (1, 54,2 mg), cirsimarin (2, 195 mg), cirsiliol 4'-glucoside(3, 252 mg), sorbifolin(4, 0,7 mg), pedalitin(5, 0,5 mg), dan beberapa senyawa lain yaitu terpenoid berupa betulin (fitosterol) (6, 487 mg), asam vanilat (7, 4,2 mg), dan indole-3-karboxaldehid (8, 0,8 mg) **Gambar 2.4**.



Gambar 2.4 Struktur flavanoid dan metabolit sekunder lainnya pada ekstrak metanol pletekan (Chwan *et al*., 2006)

2.6 Hubungan TNF-α dengan Diabetes Mellitus

Tumor nuclear factor dibentuk atas 212 asam amino diatur pada homotrimers yang stabil dengan berat molekul 51 kDal. TNF-α adalah suatu sitokin yang bersifat pleiotropik yang sebagian besar dihasilkan oleh monosit, makrofag dan sel T. Seperti sitokin pro-inflamasi yang lain, ekspresi dan sintesa dari TNF-α tidak hanya dihasilkan oleh sel-sel hematopoetik saja (Ahrens, 2011). Dalam beberapa penelitian memperlihatkan bahwa TNF-α dapat disimpan di dalam sel dalam bentuk proaktif dan enzim dapat merubah TNF-α secara cepat dapat meningkatkan kadar TNF-α yang aktif (Navarro and Mora., 2008).

Meningkatnya kadar TNF-α terdapat pada keadaan inflamasi akut dan kronik (Popa *et al.*, 2007).

Tumor nuclear factor alpha (TNF-α) mempunyai kemampuan besar terhadap efek pro-inflamasi pada atherosklerosis, penyakit metabolik dan kelainan inflamasi seperti obesitas dan resistensi insulin (Wellen and Hostamigil, 2005). Keterlibatan TNF-α dalam patogenesis diabetes mellitus 1 didukung dengan efek toksik terhadap sel β pulau langerhans. Terjadi kerusakan selektif dari sel-sel beta pankreas penghasil insulin melalui mekanisme *cellular mediated autoimmune*. Suatu penyusupan sel-sel inflamatori ke dalam pulau langerhans, yaitu insulitis, yang diikuti oleh kematian sel beta karena proses fagositosis oleh makrofag. Kadar TNF-α dalam sirkulasi berhubungan dengan penurunan kadar insulin dalam darah (Kleemann *et al*., 2008). Studi in vitro dan in vivo pada tikus dan mencit menunjukkan bahwa efek merusak dari makrofag pada sel-β dapat dimediasi melalui produksi TNF-α dan IL (Palsamy *et al.*, 2010).

Rangsangan endotoxin yang mengandung lipopolisakarida pada makrofag akan mengekspresikan sitokin proinflamasi (TNF-α, IL-1, IL-6) yang akan menimbulkan reaksi inflamasi. Ekspresi sitokin proinflamasi tersebut juga dapat terjadi akibat stimulasi dari interferon-γ (IFN-γ) yang dikeluarkan sel TH-1 (Guntur, 2004). Pada saat terjadi ikatan antara diabetogenik dengan sel β pankreas, sel T berperan dalam kematian sel β pankreas. Sel T $CD8^+$ dapat merusak sel β pankreas melalui MHC *class 1* dengan sitotoksisitas. Sel $CD4^+$ dan $CD8^+$ memproduksi sitokin seperti IFN-γ yang menginduksi ekspresi reseptor kematian FAS (yang dikenal CD95) dan produk *chemokine* dari sel β. Aktifasi

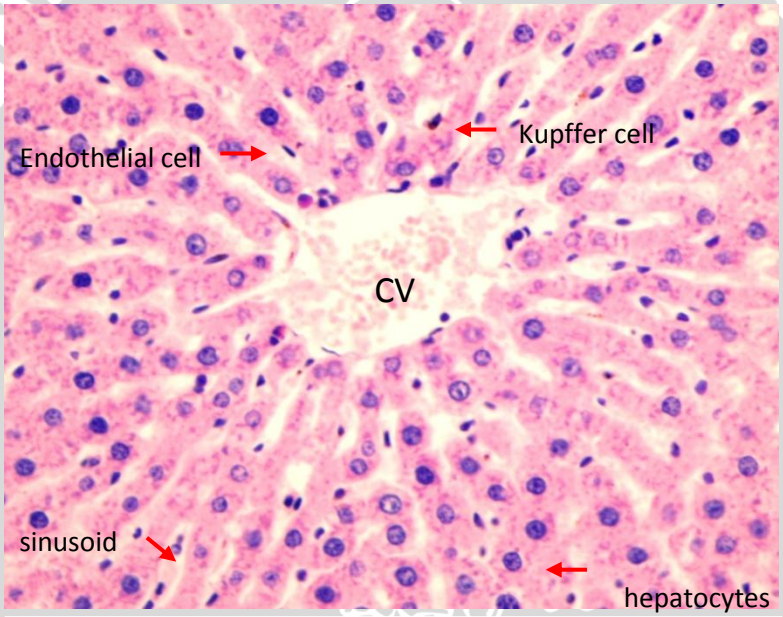
dari FAS oleh FASl (FAS ligand) yang menginisiasi apoptosis sel β (Wellen and Hostamigil, 2005).

Produk *chemokine* yang dihasilkan sel β merekrut sel mononuklear ke dalam target, sehingga meningkatkan inflamasi. IFN-γ dapat mengaktifkan makrofag dan menginduksi peningkatan produksi sitokin pro inflamasi seperti Interleukin- 1a dan *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF-α). Peningkatan TNF-α akan memperburuk stress imun pada sel β dan menginduksi proses kematian sel hepar dengan berikatan dengan resptor TNF-R1. Ikatan antara TNF-α dan TNF-R1 mengaktifkan NFκB untuk menginisiasi kematian sel hepar melalui aktifitas serangkaian gen sel hepar dibawah kontrol faktor - faktor transkripsi (Romagnoli *et al.*, 2010).

2.7 Struktur dan Fungsi Hepar

Hepar terletak di bawah diafragma kanan dan dilindungi bagian bawah tulang iga kanan. Lobus kiri hepar berada di dalam epigastrium, tidak dilindungi oleh tulang iga. Hepar normal mempunyai struktur kenyal dengan permukaan yang licin (Chandrasoma, 2005). Hepar merupakan kelenjar tubuh yang paling besar dan merupakan pusat metabolisme tubuh dengan fungsi yang sangat kompleks.Lobulus hepar dibagi lagi menjadi lobulus yang merupakan unit fungsional. Setiap lobulus merupakan bentuk heksagonal yang terdiri dari lembaran sel hepar yang berbentuk kubus yang tersusun radial mengelilingi vena sentralis. Diantara lembaran sel hepar terdapat kapiler yang dinamakan sinusoid, yang merupakan cabang vena porta dan arteria hepatica. Sinusoid dibatasi oleh sel *kupffer* yang merupakan sistem retikuloendotel **(Gambar 2.5)**.

Hepar memegang peranan penting pada metabolisme karbohidrat, protein, lemak, vitamin dan memproduksi energi. Zat tersebut dikirim ke hepar melalui vena porta setelah diabsorpsi oleh usus (Hushada, 2004). Hepar dan otot menyimpan glukosa sebagai glikogen, sedangkan jaringan adipose mengubah glukosa menjadi lemak (Bradburry, 2006). Setelah glukosa dikeluarkan dari darah, glukagon akan memberi sinyal ke sel-sel hepar untuk meningkatkan hidrolisis glikogen, mengubah asam lemak dan asam amino menjadi glukosa dan memulai pelepasan glukosa secara perlahan-lahan ke sirkulasi (Bai *et al*., 2003).



Gambar 2.5 Histologi normal hepar, perbersaran 400 X (Junquiera and Coneiro, 2007)

Fungsi hepar sebagai sistem *buffer* glukosa darah sangat penting. Salah satu fungsi hepar adalah menjaga homeostasis glukosa. Hepar merupakan organ yang dapat memenuhi kebutuhan glukosa di jaringan dalam tubuh (Ellis, 2006). Hepar juga mengubah glukosa dan fruktosa dalam makanan menjadi glikogen dan disimpan atau glukosa yang berlebihan dalam hepar diubah menjadi lemak. Selain

itu glikogen yang ada dapat diubah oleh sel hepar menjadi glukosa jika dibutuhkan dan mengubah asam amino menjadi glukosa (glukoneogenesis). Selama tidak ada asupan makanan diantara asam-asam amino yang ditransport dari otot ke dalam hepar, alanin yang paling dominan dan menghasilkan siklus glukosa alanin yang menyebabkan daur glukosa dari hepar ke otot dengan pembentukan piruvat yang diikuti dengan transaminasi menjadi alanin, kemudian alanin ditransport ke hepar dan diikuti oleh glukoneogenesis menjadi glukosa kembali. Energi yang diperlukan untuk sintesis glukosa di hepar dari piruvat berasal dari oksidasi asam-asam lemak (Bradburry, 2006).

2.8 Histopatologi Hepar pada Diabates Mellitus

Penyakit hepar mungkin timbul karena adanya diabetes mellitus atau diabetes mellitus yang timbul akibat penyakit hepar. Penderita diabetes mudah mengalami hiperlipidemia (kadar lemak tinggi), sedangkan penderita penyakit hepar yang lemaknya tinggi juga cenderung mengidap diabetes. Selain itu gula dan lemak bisa menyebabkan komplikasi pada jantung, otak, dan pembuluh darah. Penderita diabetes sering mempunyai trigliserida yang tinggi dan bisaanya disertai dengan kolesterol HDL yang rendah (Groop *et al.*, 2007).

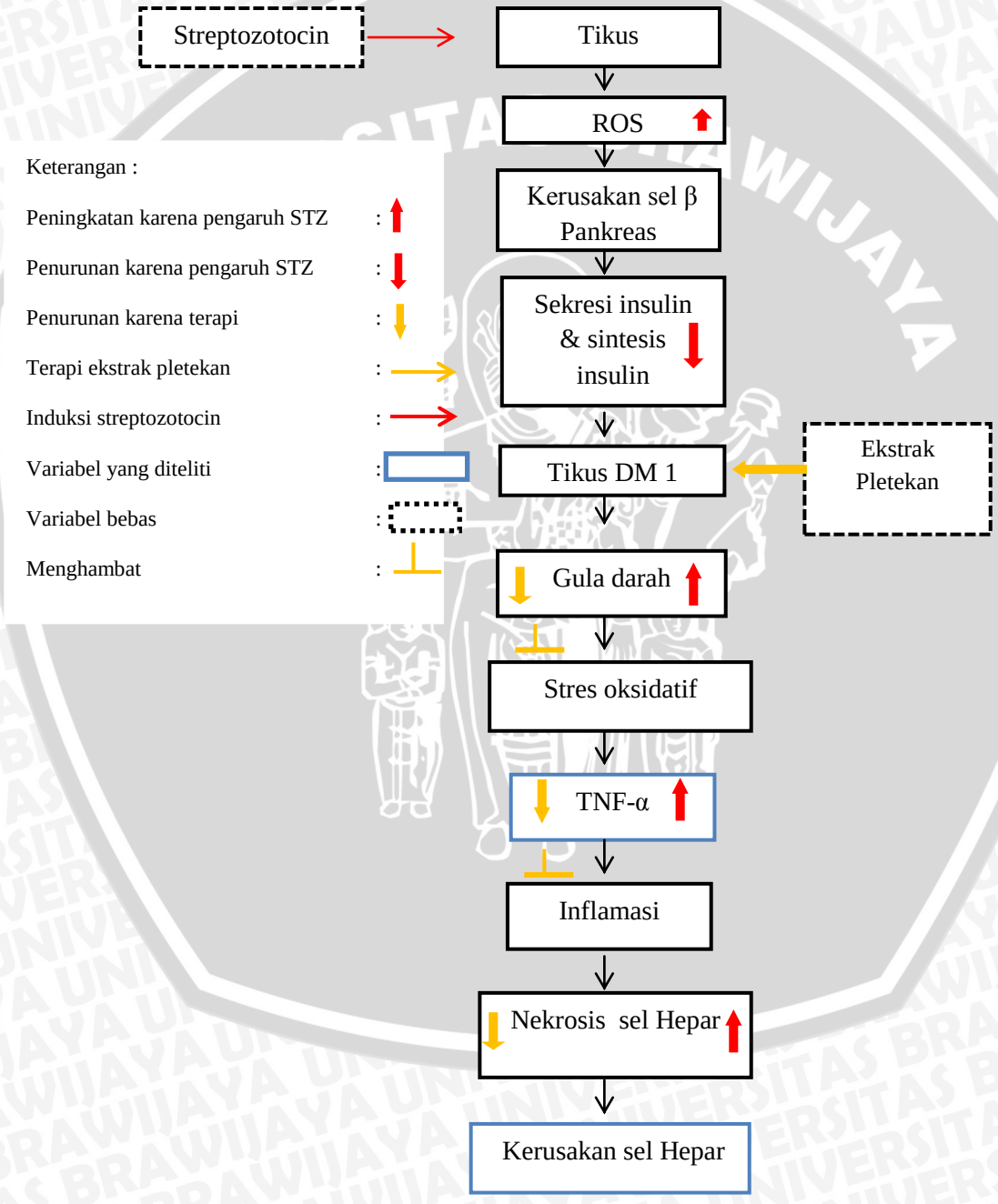
Gangguan metabolisme lipid pada diabetes menyebabkan adanya kelainan pada sel-sel hepar. Patogenesis kelainan pada sel hepar ini muncul karena adanya resistensi insulin yang dihasilkan oleh lipolisis. Lipolisis ini akan meningkatkan sirkulasi asam lemak bebas yang kemudian diambil oleh hepar. Asam lemak dihepar ini akan menyebabkan pembentukan radikal bebas akibat peroksidasi lipid (Tolman *et al.*, 2006).

Salah satu manifestasi klinis akibat gangguan metabolisme lemak adalah perlemakan hepar, dimana dalam keadaan normal lemak dihepar hanya 5% dari berat seluruh hepar. Sebagian besar lemak dihepar dalam bentuk trigliserida, fosfolipid, asam lemak, kolesterol, dan ester-kolesterol. Perlemakan hepar adalah keadaan dimana lemak dihepar melebihi 5% dari beratnya hepar (Heslet, 2004).

Pada tubuh penderita diabetes mellitus terjadi stress oksidatif yang menyebabkan radikal bebas dalam tubuh meningkat. Radikal bebas ini dapat merusak berbagai jaringan tubuh seperti sel hepar. Hepar adalah organ yang potensial mengalami kerusakan karena merupakan organ pertama setelah saluran pencernaan yang terpapar oleh bahan yang bersifat toksik. Proses metabolisme oleh hepar akan mendetoksifikasi bahan tersebut, tetapi proses tersebut dapat menghasilkan metabolit yang bersifat lebih toksik dari bahan dasarnya (Handajani, 2008). Pada kondisi hiperglikemia, dapat memicu tingginya produksi ROS pada hepar sehingga terjadi peroksidasi lipid dan stres oksidatif di dalam sel maupun membran sel yang akan merusak jaringan hepar. Kadar antioksidan alami di dalam tubuh yang tidak dapat menetralisir ROS yang terlalu tinggi kemudian menyebabkan kerusakan dan kematian sel berupa nekrosis pada sel hepatosit (Agnieszka *et al*., 2011).

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Penelitian



Gambar 3.1. Kerangka Konseptual

Streptozotocin (STZ) merupakan agen diabetogenik hewan model tikus yang dapat membangkitkan oksigen reaktif sehingga menyebabkan peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Peningkatan ROS dapat menyebabkan kerusakan sel β pankreas. Kerusakan sel β pankreas mengaktivasi poli ADP-ribosilasi yang kemudian mengakibatkan penekanan NAD^+ seluler, yang selanjutnya terjadi penurunan jumlah ATP sehingga terjadi penghambatan sekresi dan sintesis insulin yang menyebabkan tikus model menderita diabetes mellittus 1. Penurunan NAD^+ mengakibatkan penurunan ATP sehingga terjadi kematian pada sel- β pankreas berupa nekrosis dan apoptosis. Sel yang mengalami nekrosis, meningkatkan respon pro-inflamasi dari makrofag dan menginduksi peningkatan sitokin pro-inflamasi TNF-α. Apoptosis sel β pankreas menyebabkan defisiensi insulin yang menyebabkan hiperglikemi.

Diabetes mellitus 1 menyebabkan stres oksidatif, dimana produksi radikal bebas (oksidan) melebihi kemampuan antioksidan tubuh. Sumber stres oksidatif pada diabetes mellitus 1 disebabkan perpindahan keseimbangan reaksi redoks karena perubahan metabolisme karbohidrat dan lipid dalam hepar yang dapat meningkatkan pembentukan ROS dari reaksi glikasi dan oksidasi lipid sehingga menurunkan sistem pertahanan antioksidan. Peningkatan ROS dalam hepar akibat stres oksidatif menyebabkan teraktivasinya limfosit T terutama $CD4^+$ yang menghasilkan interferon-γ (IFN-γ). Interferon-γ akan mengaktivasi sel makrofag (*kupffer*) yang menstimulasi peningkatan produksi sitokin (TNF-α) serta memproduksi radikal bebas seperti superperoksida (O_2^-), hydrogen peroksida

(H_2O_2) dan *nitrit oxide* (NO). Radikal bebas yang berikatan dengan sel hepar kemudian akan merespon sel *kupffer* untuk mengekspresikan sitokin pro-inflamasi (TNF-α, IL-1, IL-6) untuk menimbulkan reaksi inflamasi. Radikal bebas yang diproduksi hasil aktivasi makrofag dapat memicu terjadinya kerusakan sel hepar dengan adanya ikatan antara superperoksida (O_2^-) dan *nitrit oxide* (NO) menjadi peroxinitrite ($ONOO^-$). Peroxinitrite menyebabkan fragmentasi DNA, kerusakan membran sel, dan menginduksi terjadinya nekrosis sel hepar.

Ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol daun pletekan *(Ruellia tuberosa* L.*)* yang didalamnya mengandung senyawa flavonoid. Flavonoid merupakan suatu bahan aktif yang memiliki fungsi untuk aktivitas antioksidan, antiinflamasi, inhibitor enzim pencernaan, dan antihiperlipidemi (Ullah *et al.*, 2011). Mekanisme flavonoid sebagai antioksidan melalui pemutusan reaksi berantai radikal bebas dengan cara mendonorkan atom hidrogen dari gugus hidroksil fenolik. Flavonoid dapat memberikan atom hidrogen secara cepat pada radikal bebas (R^*, ROO^*), sementara radikal antioksidan yang terbentuk memiliki keadaan yang lebih stabil dibandingkan radikal bebas. Flavonoid dapat memutus rantai reaksi propagasi dengan menyumbang elektron pada peroksi radikal dalam sel.

Kandungan Flavonoid dalam *Ruellia tuberosa* L. dapat bekerja sebagai antiinflamasi dengan cara menekan aktivasi dari *nuclear factor kappa B* (NF- κB) yang merupakan faktor transkripsi eukariotik yang meliputi regulasi inflamasi, proliferasi selular, tranformasi dan tumorigenesis. Senyawa-senyawa flavonoid seperti flavonol terbukti menghambat produksi TNF-α dan NO oleh makrofag

yang teraktivasi. Aktivasi NF-κB yang ditekan oleh flavonoid akan melemahkan respon autoimun dan respon inflamasi. Penurunan kadar TNF-α akan memacu regenerasi sel β pankreas dan sel hepar.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut :

1. Terapi ekstrak metanol daun pletekan *(Ruellia tuberosa* L.*)* dapat menurunkan ekspresi TNF-α hepar pada tikus *(Rattus norvegicus)* diabetes mellitus 1.
2. Terapi ekstrak metanol daun pletekan *(Ruellia tuberosa* L.*)* dapat memperbaiki kondisi hepar pada tikus *(Rattus norvegicus)* diabetes mellitus 1 yang diamati berdasarkan gambaran histopatologinya.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan September 2014 sampai April 2015 di Laboratorium Biokimia, dan Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya Malang serta pembuatan preparat di Laboratorium Patologi Klinik RS Dr. Soetomo Surabaya.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bak pemeliharaan hewan coba 20 x 30 x 40 cm, gunting, pinset, spuit 30 cc, sonde yang dipasang diujung spuit, plastik bedah, *multi-channel pipette*, *vortex* (Guo Huq Touch Mayer), tabung mikrotube 1,5 mL, rak tabung, mikropipet (20 - 1000 µL), tabung propilen, pengangas air, neraca analitik (Mettler Lotedo AL 204), sentrifuge, spektrofotometri UV-Vis, kamera digital, gelas kimia, maserator, rotari evaporator, seperangkat alat destilasi, tabung reaksi, rak tabung, pipet volume 1,3,5 mL, corong pisah, labu takar 10,50,100 mL, pipet tetes, tip 200 µL, tip 1000 µl, *glucostick one touch ultra* dan glukometer digital (*One Touch Lifescan*), kertas saring, oven, penjepit (*block holder*), *skalpel* dan alat bedah, pisau mitokrom *Braun* no.21, termometer 0-100^{0}C, cawan petri, mortar dan *pestle*, *freezer* suhu -20 ^{o}C, kulkas 4^{o}C, *hot plate*, mikropipet, *timer*. penyaring minyak jagung (Sartorius Minisart® single use filter unit non-pyrogenic),

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Ruellia tuberossa* L., tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain Wistar umur 2 bulan dengan berat rata-rata 150 - 200 gram sebanyak 18 ekor (tiap kandang 6 ekor tikus), aquades, metanol, Streptozotocin, NaCl fisiologis (0,9%), *phosphate buffer saline-azida* (PBS-azida), PBS pH 7, PBS pH 7.4, pati, buffer sitrat pH 4.5, 3.5-*dinitrosalicylic acid* (DNS), PFA 4%, Alkohol 70%, HCl 1M. *Diamino* B*enzidine* (DAB), 5% *Fetal Bovine Serum* (FBS), *Strep avidin - Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP), H_2O_2 (3%), antibody primer *anti rat* TNF-α, *anti rabbit biotin* (Santa Cruz), Dako LSAB +, minyak jagung (Sigma Pcode 1000925370 C8267, USA), pakan komersial AD II (Comfeed Pakan Ternak Bermutu A.D. II Pakan Lengkap Ayam Aduan umur 9-22 minggu, PT. Japfa Comfeed, Indonesia), sekam padi untuk alas kandang, air minum tikus berupa air reverse osmosis (RO),

4.3 Tahapan Penelitian

Skema kerja pada penelitian ini dapat dilihat dengan tahapan penelitian sebagai berikut :

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba
2. Pembuatan senyawa bioaktif ekstrak metanol daun *Ruellia tuberossa* L.
4. Penentuan kadar glukosa darah dengan glukometer
5. Pembuatan larutan Strepzotocin (STZ) dan injeksi pada tikus
6. Terapi hewan coba DM 1 dengan ekstrak *Ruellia tuberossa* L.
7. Pembedahan hewan coba dan isolasi organ hepar.

8. Pembuatan preparat immunohistokimia
9. Pembuatan preparat histopatologi hepar
10. Pengukuran ekspresi TNF-α hepar
11. Pengamatan histopatologi hepar
12. Analisis data

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan coba

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang digunakan mempunyai berat badan 130-150 g dengan umur 2,5 bulan sebanyak 18 ekor. Hewan coba dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan, yaitu kelompok (I) tikus kontrol negatif yaitu kelompok tikus tanpa perlakuan kelompok (II) tikus kontrol positif yaitu kelompok tikus diabetes mellitus 1 tanpa diberi terapi ekstrak metanol daun pletekan, dan kelompok (III) tikus diabetes mellitus 1 diterapi ekstrak metanol daun pletekan dengan dosis 450 mg/kg BB. Masing – masing kelompok perlakuan terdiri dari enam ekor tikus sebagai ulangan.

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Streptozotocin dan ekstrak metanol daun pletekan

Variabel yang diteliti : Ekspresi TNF-α dan histopatologi hepar

Variabel kendali : Berat badan tikus, umur tikus, dan jenis kelamin tikus, suhu, pakan.

Penelitian ini digunakan adalah 3 kelompok perlakuan, sehingga jumlah sampel tikus masing-masing kelompok dapat dihitung berdasarkan rumus (Notoatmojo, 2002): n = (15 + p) :p

= (15 + 3) : 3

= 6

Keterangan: n = jumlah sampel, dan p = kelompok perlakuan. Tiap kelompok digunakan 6 tikus.

Adapun ketiga kelompok perlakuan yaitu:

1. Kelompok I, kelompok kontrol negatif
2. Kelompok II, kelompok kontrol positif, diinjeksi MLD-STZ dosis 20 mg/Kg B.B sebanyak 5 kali yang dilakukan berturut-turut
3. Kelompok III, kelompok terapi, dengan treatment ekstrak metanol daun pletekan dosis 450 mg/kg BB./hari selama 10 hari.

Pada penyiapan hewan coba, tikus yang digunakan mempunyai berat badan 150 - 200 g dengan umur 2,5 bulan sebanyak 18 ekor yang dibagi dalam tiga kelompok. Kondisi tikus dalam keadaan sehat yang ditandai oleh gerakan aktif dan mata cemerlang. Tikus dipelihara dalam kandang di laboratorium Biologi Molekuler. Kotak kandang berukuran 20 x 30 x 40 cm pada temperatur 25±3°C dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap. Kandang diberi alas berupa sekam padi agar kandang tidak lembab. Sebelum percobaan, tikus diaklimatisasi selama 1 minggu. Pakan untuk hewan coba menggunakan pakan komersial AD II yang mengandung 12% air, 15% protein kasar, 3-7% lemak kasar, 6% serat kasar, 0,9- 1,1% kalsium, dan 0,6-0,9% phosphor. Minum yang

diberikan secara *ad libitum.* Selama percobaan, tikus ditangani sesuai *etical guidelines* yang dikeluarkan oleh komite etik.

4.4.2 Pembuatan Senyawa Bioaktif Ekstrak metanol daun *Ruellia tuberossa* L.

Diambil 4 pucuk daun teratas pletekan yang diperoleh di sekitar kecamatan Lawang-Malang, kemudian diidentifikasi di jurusan Biologi Universitas Brawijaya. Daun dibersihkan, setelah itu dikeringkan pada suhu ruang dengan menghindari panas matahari langsung (*dried in shade*) selama ±5 hari atau sampai kering. Daun pletekan yang telah kering kemudian diblender untuk memperkecil ukurannya.

Serbuk Pletekan kering (± 500 g) diekstraksi menggunakan pelarut metanol (3 L x 3) selama 72 jam. Ekstrak metanol dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada tekanan rendah. Ekstrak metanol pekat ditimbang dan dicatat. Ekstrak metanol kental dilarutkan dalam air dan dipartisi dengan n-heksan (1:1) menggunakan corong pisah, dilakukan beberapa kali ekstraksi cair-cair dengan n-heksan hingga flavonoid terekstraksi optimal. Fraksi n-heksan diambil, dipekatkan dengan vakum rotary evaporator dan dicatat beratnya. Kandungan flavonoid dari fraksi n-heksan dikonfirmasi dengan LC-MS. Ekstrak kental dari fraksi n-heksan dapat disimpan pada botol coklat pada temperatur 4°C untuk pengujian selanjutnya.

4.4.3 Penentuan Kadar Glukosa Darah dengan Glukometer

Proses pengukuran kadar glukosa darah dilakukan sebanyak 4x, yaitu sebelum injeksi *Multiple Low Dose-Streptozotocin* (MLD-STZ) sebagai data kadar glukosa darah awal, diukur 2 kali setelah injeksi MLD-STZ bagi kelompok

kontrol positif (B) dan kelompok terapi (C) sebagai data glukosa darah untuk memastikan bahwa hewan coba telah mengalami DM, setelah terapi ekstrak metanol daun *Ruelia tuberossa* L., atau sebelum pembedahan sebagai data kadar glukosa akhir. Darah tikus putih yang akan diukur glukosa darahnya didapat dari pemotongan ujung ekor (vena lateralis). Pengukuran glukosa darah mengggunakan *kit glucometer*. Alat diset kodenya sesuai dengan kode *glucostick* yang digunakan, selanjutnya darah yang didapatkan diteteskan pada stik yang terhubung dengan *glucometer* dibiarkan selama 60 detik dan dibaca skala yang terlihat pada layar, skala pengukuran yang terbaca dalam satuan mg/dL.

Kriteria DM 1 didapatkan apabila kadar gula darah > 200 mg/dl. Pengukuran glukosa darah dilakukan setelah tikus dipuasakan 12 jam. Uji pengukuran gula darah dilakukan pada hari ke-0 sebelum induksi STZ, hari ke-5 setelah induksi STZ, hari ke-14 setelah induksi STZ, dan hari ke- 10 setelah terapi.

4.4.4 Pembuatan Larutan STZ Dan Induksi Pada Hewan Coba.

Streptozotocin (STZ) sebanyak 100 mg dilarutkan pada 3 mL buffer sitrat pH 4.5 kemudian divortex hingga homogen. Larutan STZ stok disimpan pada suhu 4°C. Larutan STZ stok digunakan untuk injeksi dengan dosis volume pengambilan yang disesuaikan dengan berat badan tikus. Campuran larutan dimasukkan dalam tabung dan siap untuk diinjeksikan.

Digunakan dosis 20 mg/kgBB sebanyak 5 kali yang dilakukan berturut-turut. Tikus diposisikan menghadap kearah frontal hingga terlihat bagian abdomennya. Pada bagian atas abdomen tikus disemprot dengan ethanol 70%,

kulit difiksasi hingga terasa bagian ototnya, spuit dimasukkan pada bagian abdomen dan dicoba digerakkan, apabila terasa berat maka sudah masuk pada daerah intraperitonial. Setelah yakin pada daerah intraperitonial maka STZ segera dimasukkan secara perlahan. Selanjutnya abdomen tikus disemprot dengan etanol 70% kembali. Setelah dilakukan injeksi 5 hari berturut-turut, dilakukan inkubasi selama 7-14 hari dalam kandang, dan dilakukan pengukuran kadar glukosa darah setelah injeksi. Tikus dinyatakan DM apabila kadar glukosa darahnya diatas 200 mg/dL.

4.4.5 Terapi Hewan Model DM 1 dengan Ekstrak Metanol daun *Ruellia tuberossa* L.

Setelah kelompok tikus kelompok II, dan III dinyatakan DM, maka tikus diterapi. Tikus kelompok I dan II diberi minyak jagung sebanyak 2 mL. Tikus DM kelompok III diterapi dengan ekstrak metanol sebanyak 2 mL (dengan dosis 450 mg/kg BB) yang telah dilarutkan dengan minyak jagung (Sigma Pcode 1000925370 C8267, USA) selama 10 hari (10 hari berturut-turut dosis tunggal). Pemberian terapi dilakukan dengan cara oral (sonde lambung). Volume agen terapi yang diinjeksikan sebanyak 2 mL berdasarkan ukuran rata-rata lambung tikus putih.

4.4.6 Pengamatan Gula Darah pada Tikus

Pengukuran gula darah dilakukan untuk mengetahui perkembangan gula darah pada tikus dengan cara pemotongan ujung ekor (vena lateralis). Pengukuran glukosa darah mengggunakan *kit glucometer*. Alat diset kodenya sesuai dengan kode *glucostick* yang digunakan. Selanjutnya darah yang didapatkan diteteskan

pada stick yang terhubung dengan *glucometer* dibiarkan selama 60 detik dan dibaca skala yang terlihat pada layar, skala pengukuran yang terbaca dalam satuan mg/dL.

4.4.7 Pembedahan Hewan Coba dan Pengambilan Organ Hepar

Sebelum dilakukan pembedahan tikus dilakukan euthanasi dengan cara dislokasi leher. Skalpel dan alat bedah disiapkan untuk membantu mengambil organ hepar. Setelah tikus mati, hewan coba diletakkan pada nampan bedah dan ditata pada posisi ventral diatas. Diambil organ hepar yang terletak dibawah diafragma kanan. Kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis dan direndam dalam PBS-azida dan diberi label kemudian disimpan dalam suhu 4^{o}C.

4.4.8 Metode Immunohistokimia TNF-α Hepar

Organ hepar yang telah memadat dalam blok *paraffin*. Bagian dipotong dengan menggunakan *microtome*. Hepar diiris dengan ukuran 5 µm. Potongan preparat dikeringkan diletakkan diatas hot plate 38-40^{o}C sampai kering 40^{o}C selama 24 jam.

Pengukuran ekspresi TNF-α dilakukan dengan menggunakan metode imunhistokimia. Pertama slide preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selanjutnya ditetesi dengan 3% H_2O_2 selama 20 menit. Kemudian preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali. Preparat diblok dengan 5% *Fetal Bovine Serum* (FBS) selama 1 jam kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali. Preparat kemudian diinkubasi dengan antibody primer *anti rat* TNF-α selama semalam pada suhu 4^{o}C, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali. Dilakukan inkubasi pada preparat dengan antibodi sekunder *anti rabbit*

biotin (Santa Cruz) selama 1 jam pada suhu ruang, dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali dan ditetesi dengan *Strep avidin- Horse Radin Peroxidase* (SA-HRP) untuk diinkubasi selama 40 menit. Selanjutnya preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali ditetesi dengan *Diamino Benzidine* (DAB) dan diinkubasi selama 10 menit kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali. *Counterstaining* dilakukan menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 10 menit, cuci dan keringkan. Preparat di *mounting* dengan *entellan* dan ditutup dengan *cover glass.* Preparat positif mengekspresikan TNF-α apabila terdapat warna coklat pada preparat (Baratawidjaja, 2004). Selanjutnya dilakukan penghitungan persen ekspresi TNF-α dengan menggunakan program *Axiovision*.

4.4.9 Pembuatan Preparat Histopatologi Hepar

Fiksasi dilakukan untuk mencegah kerusakan pada jaringan, menghentikan proses metabolisme, mengawetkan komponen sitologi dan histologi, dan mengeraskan materi yang lunak agar jaringan dapat diwarnai. Fiksasi dilakukan dengan cara memasukkan jaringan dalam larutan PFA 4% (Junquiera and Carneiro, 2007).

Dehidrasi dilakukan untuk mengeluarkan air dari jaringan agar jaringan tersebut dapat diisi oleh parafin sehingga jaringan dapat diiris tipis. Proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat mulai dari 70%, 80%, 90%, 95% dan 100% (Junquiera and Carneiro, 2007).

Tahap penjernihan dilakukan mulai pemindahan jaringan dari alkohol absolut III ke larutan penjernihan yaitu xylol I (1 jam), xylol II, dan Xylol III (30 menit pada suhu kamar dan 30 menit pada inkubator). Proses infiltrasi kemudian

dilakukan dalam parafin cair yang ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58-60°C (Junquiera and Carneiro, 2007).

Embedding dilakukan dengan cetakan yang didalamnya diisi paraffin cair, setelah membeku cetakan tersebut dipotong-potong dan ditempelkan pada blok kayu. Blok tersebut dipasang pada mikrotom dan diatur agar posisinya sejajar dengan posisi pisau. Blok parafin dipotong dengan ketebalan 4 µm. Awal pemotongan dilakukan *trimming* karena jaringan yang terpotong masih belum sempurna. Sediaan disimpan pada inkubator dengan suhu 37°C selama semalam lalu siap diwarnai dengan HE (Junquiera and Carneiro, 2007).

Pewarnaan HE dilakukan dengan menggunakan zat pewarna hematoksilin untuk memberi warna pada inti sel dan memberi warna biru (basofilik). Eosin yang merupakan *counterstaining* hematoksilin untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung dan memberi warna merah muda. Diawali dengan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol lalu dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan menggunkan alkohol absolut I, II dan III masing-masing 3 menit, alkohol 95%, 90%, 80% dan 70% secara berurutan selama 3 menit. Sediaan dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan dilanjutkan dengan air akuades selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna hematoksilin selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan air akuades selama 5 menit. Sediaan kemudian dapat diwarnai dengan pewarna eosin selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit dan air akuades selama 5 menit. Setelah sediaan terwarnai dilakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama beberapa detik lalu dilanjutkan

dengan alkohol proses *clearing* dengan xylol I, II dan III selama 3 menit kemudian dikering anginkan, selanjutnya dilakukan *mounting* (perekatan) dengan *entellan* (Junqiera and Carneiro, 2007).

4.4.10 Pengamatan Histopatologi Hepar

Pengamatan histopatologi hepar yaitu dengan menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX51 dengan perbesaran 400x. Gambar histopatologi diambil dengan menggunakan kamera setelah diperoleh gambar preparat yang di inginkan. Pengamatan histopatologi yang diamati yaitu perubahan jaringan hepar berupa adanya kerusakan sel hepar dalam lobulus hepar.

4.4.11 Analisa Data

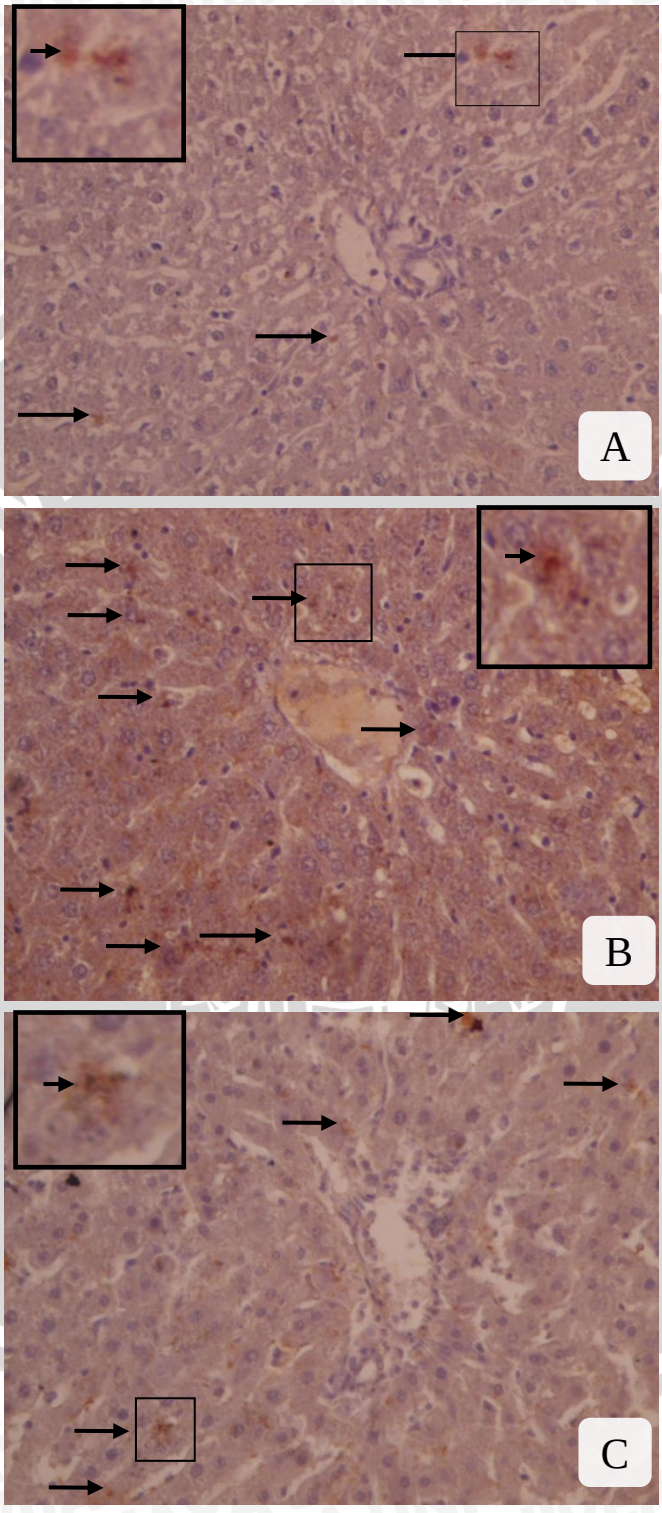
Analisa data histopatologi dilakukan secara kualitatif deksriptif sedangkan untuk ekspresi TNF- α dilakukan secara kuantitatif dengan menggunakan ANOVA dan dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Jujur (BNJ) α = 5%.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Pletekan *(Ruellia tuberossa* L.*)* Terhadap Ekspresi TNF-α Pada Hepar Tikus *(Rattus novergicus)* Diabetes Mellitus 1 Hasil Induksi Streptozotocin

Pengaruh pemberian ekstrak metanol daun pletekan *(Ruellia tuberossa L.)* terhadap ekspresi TNF-α dari hasil isolasi organ hepar tikus *Rattus norvegicus* diabetes mellitus hasil induksi Streptozotocin diamati menggunakan metode imunohistokimia. Hasil pewarnaan dengan metode imunohistokimia (IHK) menunjukkan bahwa terdapat ekspresi TNF-α pada setiap perlakuan yang terlihat dengan munculnya spot warna coklat yang ditunjukan tanda panah **(Gambar 5.1)**

Akumulasi bercak warna coklat menunjukkan adanya interaksi antara TNF-α pada jaringan hepar dengan antibodi primer (*Rat anti* TNF-α) selanjutnya dilabeli oleh antibodi sekunder (*Goat Anti Rat biotin labeled*). Setelah semua berikatan dilakukan penambahan enzim *Strep-Avidin Horse Radis Peroxidase* (SA-HRP) dan substrat *Diaminobenzidine* (DAB). Menurut Erica *et al.*, (2000) penambahan substrat kromagen DAB dan H_2O_2 oleh enzim peroksidase dalam *Strep-Avidin Horse Radis Peroxidase* (SA-HRP) menghasilkan warna coklat pada jaringan.



Gambar 5.1 Ekspresi TNF-α pada organ hepar tikus 400 X

Keterangan : A = Kontrol negatif (normal); B = Kontrol positif (DM1) ; C = Terapi ekstrak daun pletekan dosis 450 mg/kgBB. Perbesaran 400x ; ↑ menunjukkan ekspresi TNF-α dengan spot warna coklat ; *Insert* menunjukkan ekspresi TNF-α pada hepatosit.

Hasil dari ekspresi Tumor Nekrosis Faktor - Alpha pada **Gambar 5.1** menunjukkan warna kecoklatan paling banyak pada **Gambar 5.1-B** yang merupakan hati tikus kelompok kontrol positif (DM 1), sedangkan pada **Gambar 5.1-A dan Gambar 5.1-C** terlihat warna kecoklatan lebih sedikit. **Gambar 5.1-A** menunjukkan ekspresi TNF-α kelompok kontrol negatif. Ekspresi TNF- α kelompok tikus hasil terapi ekstrak metanol daun pletekan 450 mg/ Kg BB pada **Gambar 5.1-C** menunjukkan penurunan ekspresi TNF-α dibandingkan dengan ekspresi TNF-α kontrol positif (DM 1). Jumlah ekspresi TNF-α dihitung secara kuantitatif melalui pengukuran persentase area pada hepar yang menunjukkan ekspresi warna coklat menggunkanan *software axiovision*. Presentase area ekspresi TNF-α pada hepar dapat dilihat di **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Ekspresi TNF-α pada hepar tikus diabetes melitus 1 hasil induksi streptozotocin

Kelompok	Rata-rata Ekspresi TNF-α	% Ekspresi TNF-α	
		Peningkatan	Penurunan
Kontrol negatif	1,737 ± 0,085 [a]	-	-
Kontrol positif	3,157 ± 0,114 [b]	81,79	-
Terapi 450 mg/ kg BB	1,873 ± 0,078 [a]	-	40,67

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($p<0,05$). Persentase peningkatan terhadap kontrol negatif. Persentase penurunan terhadap kontrol positif.

Hasil analisa statistika dengan ANOVA menunjukkan bahwa terapi ekstrak metanol daun pletekan *(Ruellia tuberossa L.)* secara signifikan ($p<0,05$) menurunkan ekspresi TNF-α. Hasil uji BNJ menunjukkan bahwa terjadi perbedaan signifikan ($p<0,05$) antara ekspresi TNF-α pada kelompok kontrol

negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok terapi 450 mg/Kg BB (**Tabel 5.1**). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak metanol daun pletekan dosis 450 mg/kgBB mampu menurunkan ekspresi TNF-α organ hepar tikus model diabetes mellitus.

Pada kelompok kontrol negatif terdapat sedikit ekspresi TNF-α yang ditandai warna coklat pada sel hepatosit **(Gambar 5.1-A)**. Hal ini dikarenakan dalam keadaan normal terdapat sitokin didalam tubuh walaupun dalam jumlah sedikit yang berfungsi sebagai sistem kekebalan tubuh. Menurut Baratawidjaja (2004) TNF-α merupakan suatu protein yang dihasilkan leukosit untuk merangsang dan mengaktifkan sistem imun terhadap respon inflamasi, dimana dalam keadaan normal patogen pada sistem kekebalan tubuh memicu reaktivitas imun pada imunitas nonspesifik maupun spesifik. Dalam penelitian ini ekspresi TNF-α pada tikus kontrol digunakan sebagai acuan untuk mengetahui adanya peningkatan atau penurunan ekspresi TNF-α pada kelompok perlakuan lain.

Pada kelompok kontrol positif terjadi peningkatan rata-rata ekspresi TNF-α organ hepar tikus sebesar 81,79% dari kelompok kontrol negatif yang ditandai semakin banyaknya intensitas ekspresi TNF-α **(Gambar 5.1-B) (Tabel 5.1)**. Hal ini menunjukan bahwa kondisi diabetes mellitus 1 terjadi peningkatkan ekspresi TNF-α. Induksi streptozotocin pada pembuatan hewan model diabetes mellitus 1 akan meningkatkan kadar oksigen reaktif (ROS) pada pankreas yang menyebabkan kerusakan pada bagian sel β pankreas yang dapat mengakibatkan penghambatan sekresi dan sintesis insulin, sehingga tikus model menderita diabetes mellitus 1. Pada diabetes mellitus 1, kadar glukosa darah yang sangat

tinggi tidak dapat dimanfaatkan secara optimal untuk pembentukan energi, metabolisme karbohidrat, lipid, protein, dan terjadi perubahan status antioksidan pada organ hepar. Peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemia) pada kondisi diabetes mellitus 1 dapat menyebabkan kerusakan jaringan tubuh yang dapat menimbulkan berbagai komplikasi pada hepar, ginjal dan pembuluh darah karena jumlah insulin yang dihasilkan sel β pankreas kurang dari jumlah yang dibutuhkan (Nugroho, 2006).

Pada kondisi hiperglikemia akan terjadi peningkatan autoksidasi glukosa dan fosforilasi oksidatif, yang menyebabkan stres oksidatif. Hal ini juga ditetapkan bahwa hiperglikemia dapat meningkatan produksi ROS, karena terhambatnya proses oksidasi dan sistem respirasi mitokondria. Stres oksidatif kemudian akan memicu teraktivasinya limfosit T terutama $CD4^+$ yang menghasilkan interferon-γ (IFN-γ). Interferon-γ akan mengaktivasi sel makrofag (*kupffer*) yang menstimulasi peningkatan produksi sitokin pro-inflamasi TNF-α sehingga konsentrasi TNF-α pada sel hepatosit meningkat. Pelepasan TNF-α dapat mengaktifkan jalur sinyal NF-kB yang berhubungan dengan kelangsungan hidup sel, nekrosis, apoptosis, respon inflamasi dan diferensiasi sel (LeRoith, 2004).

Induksi respon yang dimediasi oleh TNF-α terjadi melalui pengikatan sitokin pada reseptor TNF-R1 dan TNF-R2. Kedua reseptor dapat memperantarai terjadinya kematian sel. TNF-R1 berisi domain kematian, sedangkan TNF-R2 akan meningkatkan efek sitotoksik TNF-R1. Pengikatan TNF-α pada TNF-R1 dapat meningkatkan aktivasi *nuclear factor kappa B* (NF-κB) atau memulai

aktivasi kaspase, yang memainkan peran utama dalam peradangan dan kematian sel di organ hepar (Frances *et al.*, 2010). NF-κB juga akan merangsang ekspresi gen yang mengkode sitokin (misalnya TNF-α, IL-1, IL-6, IL-2, IL-12,dan IFN-γ). Selanjutnya, sitokin dapat mengaktifkan iNOS dan menghasilkan *nitrit oxide* (NO) (Ahrens, 2011). Reaksi berantai radikal bebas yang diproduksi dari teraktivasinya makrofag juga memicu terjadinya kondisi stres oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan pada sel hepar. Menurut Nugroho (2006), adanya radikal bebas akan menyebabkan kerusakan sel yang diikuti dengan meningkatnya hasil peroksidasi lipid dan ROS akan menyebabkan perubahan pada ekspresi gen dan menimbulkan nekrosis sel. Peningkatan radikal bebas akan mengaktifkan NF-κB yang dapat meningkatkan sitokin - sitokin pro inflamasi yang berperan terhadap inflamasi pada organ hepar.

Daun pletekan (*Ruellia tuberosa L.*) merupakan salah satu sumber antioksidan eksogen karena mengandung senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid tersebut menyebabkan terjadinya penurunan rata-rata ekspresi TNF-α pada kelompok tikus yang diberikan terapi ekstrak metanol daun pletekan 450 mg/ kg BB sebesar 40,67% dari kelompok kontrol positif yang ditandai dengan berkurangnya intensitas ekspresi TNF- α pada (**Gambar 5.1-C**) **(Tabel 5.1)**. Hal ini membuktikan bahwa pemberian terapi ekstrak metanol daun pletekan yang mengandung senyawa aktif flavonoid mampu berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi sehingga menurunkan ekspresi TNF-α pada sel hepatosit tikus model diabetes mellitus 1. Kandungan bioaktif ekstrak metanol daun Pletekan

mengandung senyawa aktif flavonoid yaitu Apigenin dan Luteolin yang telah dikonfirmasi dengan hasil uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) **(Lampiran 3).**

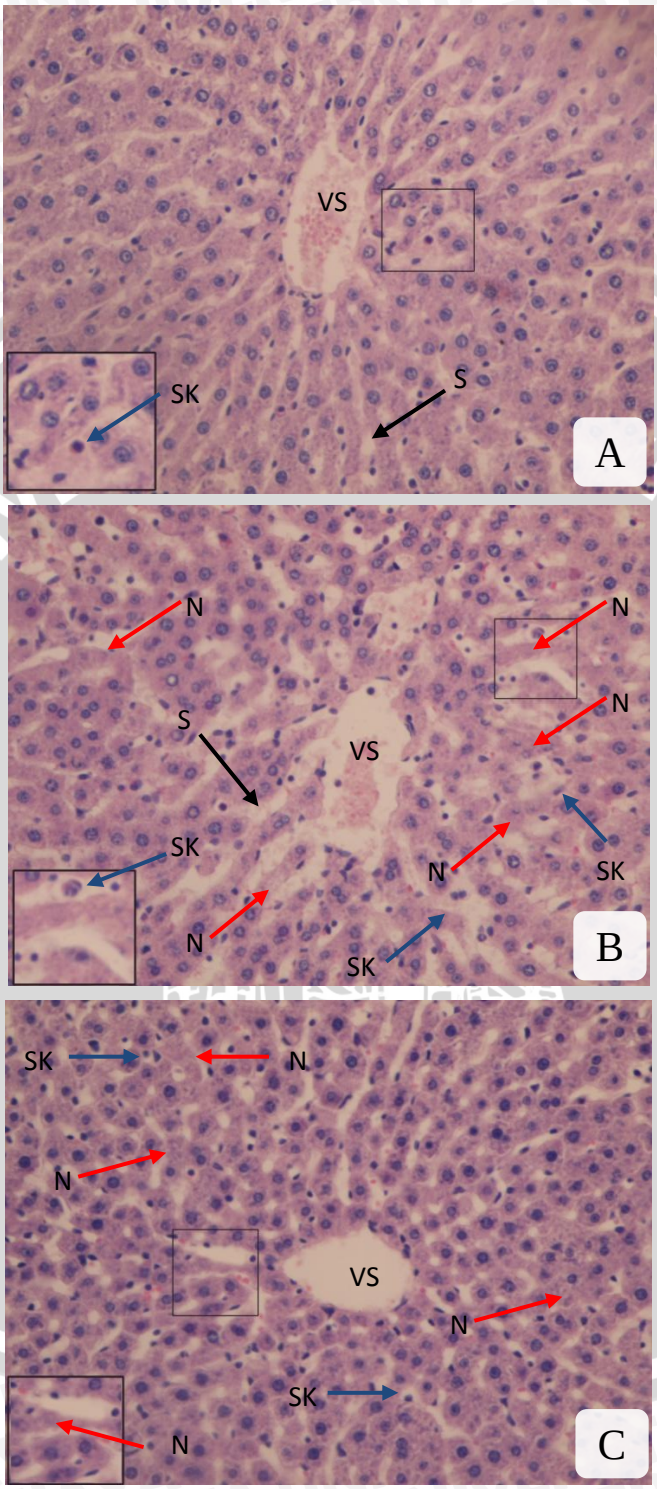
Flavonoid dalam *Ruellia tuberosa L.* berperan sebagai antioksidan akan menstabilkan radikal bebas yang terbentuk akibat hiperglikemia dan aktivasi makrofag. Flavonoid bekerja dengan cara mendonorkan atom hidrogen dari gugus hidroksil fenolik secara cepat pada radikal bebas dan mengubahnya menjadi bentuk yang lebih stabil. Sementara turunan radikal antioksidan yang dihasilkan memiliki keadaan yang lebih stabil dibandingkan radikal bebas karena akan terjadi delokalisasi perbaikan elektron dari ikatan rangkap pada cincin benzene sebagai indikasi oleh ikatan isomer (Aulanni'am *et al.*, 2012). Sebagai antiinflamasi, flavonoid akan menekan aktivasi dari *nuclear factor kappa B* (NF-κB) yang merupakan faktor transkripsi eukariotik yang meliputi regulasi inflamasi, proliferasi selular, tranformasi dan tumorigenesis. Aktivasi NF- κB yang ditekan oleh flavonoid akan melemahkan respon autoimun dan respon inflamasi serta menghambat produksi dari sitokin pro-inlamasi TNF-α yang terlibat pada proses inflamasi (Al-Qattan *et al.*, 2008).

Penelitian pengaruh terapi ekstrak metanol daun pletekan (*Ruellia tuberosa L.)* terhadap ekspresi TNF-α hepar tikus menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak daun pletekan dapat menurunkan ekspresi TNF-α hepar tikus diabetes mellitus 1. Dosis ekstrak metanol daun pletekan 450 mg/kg BB merupakan dosis yang efektif untuk terapi karena menunjukan hasil yang mendekati kontrol negatif.

5.2 Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Pletekan *(Ruellia tuberossa L.)* Terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Tikus *(Rattus novergicus)* Diabetes Mellitus Hasil Induksi Streptozotocin

Pemberian terapi ekstrak metanol daun pletekan terhadap jaringan hepar tikus *(Rattus novergicus)* model diabetes mellitus diamati melalui gambaran histopatologi. Perbandingan hasil pengamatan histopatologi organ hepar tikus pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, dan kelompok terapi ekstrak metanol daun pletekan dosis 450 mg/kgBB pada penelitian ini memperlihatkan adanya perbedaan pada bagian sinusoid dan terjadinya nekrosis sel hepatosit (**Gambar 5.2**).

Gambaran histologi organ hepar tikus pada penelitian ini menunjukkan bahwa pada keadaan normal (kontrol negatif) sel hepatosit berbentuk polihedral, tersusun rapi secara radier dalam lobulus hepar, inti yang teramati berbentuk bulat, sinusoid tersusun secara sentrifungal dari vena sentralis dan tidak mengalami penyempitan maupun dilatasi, beberapa sel hepatosit terlihat dekat dengan vena sentralis dan tidak terjadi infiltrasi sel-sel inflamasi atau peradangan (**Gambar 5.2-A**). Hal ini sesuai dengan Junquiera and Carneiro, (2007), bahwa gambaran normal sel pada organ hepar tikus yang sudah diwarnai dengan *Hemaxtocilin Eosin* (HE) menunjukkan sel hepatosit berbentuk polihedral (lebih dari 6 sisi), tersusun radier, inti sel bulat letaknya sentral. Sinusoid berbentuk irregular, ukurannya lebih besar dari kapiler, mempunyai dinding seluler, tidak terakumulasi lemak, tidak terdapat sel yang mengalami nekrosis dan sel hepar berwarna basofilik, sedangkan bagian sitoplasma mengambil warna asidofilik



Gambar 5.2 Histologi organ hepar tikus dengan (HE, 400x)

Keterangan : A = Kontrol negatif (normal); B = Kontrol positif (DM1) ; C = Perlakuan terapi ekstrak daun pletekan dosis 450 mg/KgBB. ▲ : menunjukkan nekrosis sel. ▲: menunjukkan sel Kupffer; N : Nekrosis; VS : Vena Sentralis; S : Sinusoid; SK : Sel Kupffer**;** *Insert* menunjukkan sel Kuppfer dan nekrosis sel hepatosit.

Gambaran histopatologi hepar tikus DM1 (kontrol positif) menunjukkan perubahan berupa sel hepatosit tersusun tidak teratur, batas tidak jelas, terjadi nekrosis sel yang ditandai dengan hilangnya inti sel hepatosit (kariolisis), pelebaran sinusoid dan bentuk yang tidak teratur apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Kondisi sinusoid mengalami dilatasi menunjukkan adanya aktivasi sistem kinik menyebabkan pembentukan bradikinin yang berefek peningkatan permeabilitas pembuluh darah (dilatasi). Pada beberapa bagian sel hepatosit juga terlihat mengalami nekrosis yang ditunjukkan tanda panah merah **(Gambar 5.2-B)**. Nekrosis sel menyebabkan mediator inflamasi meningkatkan permeabilitas pembuluh darah sehingga sel kupffer bergerak dan menempel ke dinding pembuluh darah (adhesi). Terjadinya adhesi dikarenakan sel kupffer teraktivasi setelah distimulasi mediator tertentu (IL-1 dan TNF-á).

Adhesi yang kuat antara sel kupffer dan endotel menyebabkan pembuluh darah menjadi kaku kemudian sel kupffer masuk diantara endotel dan menuju ke jaringan sehingga terjadi infiltrasi sel - sel peradangan (Arimbi dkk, 2013). Hal ini disebabkan karena pada kondisi diabetes mellitus 1, hiperglikemia dapat memicu tingginya produksi ROS pada hepar, sehingga terjadi peroksidasi lipid dan stres oksidatif di dalam sel maupun membran sel yang akan merusak jaringan hepar. Kadar antioksidan alami di dalam tubuh yang tidak dapat menetralisir ROS yang terlalu tinggi kemudian menyebabkan kerusakan dan kematian sel berupa nekrosis pada sel hepatosit (Agnieszka *et al*., 2011). Peningkatan radikal bebas akan mengaktivasi *nuclear factor* yang akan meningkatkan produksi *tumor necrosis*

factor (TNF-α) yang berperan terhadap nekrosis dan inflamasi pada hepar (Nugroho, 2006).

Diabetes mellitus 1 menyebabkan stres oksidatif, dimana produksi radikal bebas (oksidan) melebihi kemampuan antioksidan tubuh. Sumber stres oksidasi pada diabetes disebabkan perpindahan keseimbangan reaksi redoks karena perubahan metabolisme karbohidrat dan lipid dalam hepar yang dapat meningkatkan pembentukan ROS dari reaksi glikasi dan oksidasi lipid sehingga menurunkan sistem pertahanan antioksidan. Pada kondisi hiperglikemia stress oksidatif menyebabkan teraktivasinya limfosit T terutama $CD4^+$ yang menghasilkan interferon-γ (IFN-γ). Interferon-γ akan mengaktivasi makrofag yang menstimulasi produksi sitokin pro – inflamasi seperti IL – 1 dan TNF - α serta memproduksi radikal bebas seperti superperoksida ($O2^-$), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan *nitrit oxide* (NO) (LeRoith, 2004).

Interferon - γ juga mengaktivasi limfosit T CD8+ sitotoksik. Sitokin pro– inflamasi yang diproduksi akibat teraktivasinya makrofag menjadi sitotoksik ke sel hepatosit dengan mengirimkan sinyal kematian pada sel hepatosit. Radikal bebas yang diproduksi dari teraktivasinya makrofag juga memicu terjadinya nekrosis sel hepatosit dengan adanya ikatan antara superperoksida ($O2^-$) dan *nitrit oxide* (NO) menjadi *peroxinitrite* ($ONOO^-$). *Peroxinitrite* menyebabkan fragmentasi DNA pada sel hepatosit dan menginduksi terjadinya nekrosis sel (Nugroho, 2006). Pada kondisi hiperglikemia kejadian ini akan terjadi secara terus – menerus mengakibatkan meningkatnya nekrosis sel hepatosit pada kelompok kontrol positif.

Inflamasi disebabkan oleh mediator-mediator kimia dalam tubuh, seperti sitokin. Hepatosit juga dapat meningkatkan respon sitokin terhadap kerusakan hepar, termasuk juga kerusakan oleh radikal bebas. Inflamasi akan mengaktivasi sel makrofag (*kupffer*) dan merangsang NF-κB untuk mensekresikan IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α dan sitokin lainnya (Frances *et al.*, 2010). Pelepasan sitokin-sitokin ini merupakan respon tubuh untuk menyembuhkan inflamasi. Apabila inflamasi tersebut tidak hilang, sitokin akan terus menerus disekresikan sehingga terjadi peningkatan sitokin dan dapat menyebabkan nekrosis sel secara terus menerus (Abbas and Licthman, 2003).

Pada kelompok terapi ekstrak metanol daun pletekan dosis 450 mg/kgBB menunjukkan gambaran histopatologi mendekati kelompok tikus kontrol negatif yaitu berkurangnya sel yang mengalami nekrosis, sinusoid terlihat jelas, lebih teratur, tidak mengalami dilatasi dan terlihat tersusun rapi dari vena sentralis apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif **(Gambar 5.2-C).** Perbaikan gambaran histopatologi organ hepar terjadi karena adanya senyawa aktif flavonoid yang berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi dari ekstrak metanol daun pletekan dosis 450 mg/kgBB. Menurut Chwan *et al.* (2006), Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik, menghambat banyak reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif, baik secara enzim maupun non enzim. Kerja flavonoid menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tidak reaktif yang lebih stabil. Flavonoid bertindak sebagai penampung yang baik radikal hidroksil dan superoksida dengan demikian melindungi lipid membran terhadap reaksi yang

merusak. Flavonoid juga dapat mengurangi sitokin (IL-1 dan TNF- α) yang diproduksi oleh sel kupffer dan reseptor ekspresi sitokin, sehingga terjadi penurunan kerusakan jaringan hepar yang mengalami nekrosis dan mendorong perbaikan jaringan hepar.

Radikal bebas (prooksidan) di dalam tubuh dapat diinaktivasi oleh zat antioksidan. Antioksidan dapat diproduksi oleh tubuh secara fisiologis (endogen) maupun diperoleh melalui diet (eksogen). Kebanyakan sumber alami antioksidan eksogen berasal dari tumbuh-tumbuhan (Handajani, 2008). Salah satu tumbuhan yang mengandung antioksidan adalah pletekan (*Ruellia tuberosa* L.). Daun pletekan mengandung salah satu senyawa fenolik yaitu flavonoid yang dapat bekerja sebagai antioksidan dan anti-inflamasi (Chwan *et al.* 2006). Penelitian-penelitian mengenai peranan flavonoid pada tingkat sel, secara in vitro maupun in vivo, membuktikan pula adanya korelasi negatif antara asupan flavonoid dengan resiko munculnya penyakit tertentu (Redha, 2010).

Flavanoid dalam ekstrak metanol daun pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) berfungsi sebagai penangkap *(scavenger)* anion superoksida dan radikal hidroksil. Flavonoid mampu mendonorkan atom hidrogen ke radikal peroksida membentuk radikal flavonoid yang mudah bereaksi dengan radikal bebas sehingga reaksi radikal rantai berhenti (Aulanni'am *et al.*, 2012). Pemberian antioksidan berupa flavonoid dapat menetralisir radikal bebas yang ada di dalam sel hepar akibat dari hiperglikemia dan proses inflamasi yang terjadi di organ hepar sehingga nekrosis sel hepar oleh radikal bebas dapat dihambat dan tidak terjadi kerusakan yang lebih lanjut.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pemberian terapi ekstrak metanol daun pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) menurunkan ekspresi Tumor Nekrosis Faktor - Alfa (TNF-α).
2. Pemberian terapi ekstrak metanol daun pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) mampu memperbaiki gambaram histopatologi tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes mellitus yang ditunjukkan dengan adanya perbaikan pada sel hepatosit yaitu berkurangnya sel yang nekrosis, dan sinusoid terlihat jelas, lebih teratur dan tersusun rapi dari vena sentralis.
3. Dosis terapi 450 mg/kg BB adalah dosis efektif menurunkan ekspresi TNF-α pada tikus Diabetes mellitus hasil induksi streptozotocin.

6.2 Saran

Perlu dilakukan studi mengenai LD-50 ekstrak daun pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) terhadap hewan model.

DAFTAR PUSTAKA

Abbas, A.K., and A.H. Licthman. 2003. Immunity To Tumours. In : Cellular and Molecular Immunology. WB Saunders Co. 5th edition. Philadelphia..391-410.

Ahrens, B. 2011. Antibodies In Metabolic Diseases. *New Biotechnology*. Philadelphia. 28: 530-537.

Agnieszka S. C., K. Plewka, J. Daniluk, and M. K. Szerszeń. 2011. Betulin and Betulinic Acid Attenuate Ethanol-induced Liver Stellate Cell Activation by Inhibiting Reactive Oxygen Species (ROS), cytokine (TNF-α, TGF-β) Production and By Iinfluencing Intracellular Signaling. *Toxicology*. 280 (3) : 152-163.

Al-Qattan, K., M. Thomson and M.A Garli. 2008. (*Alliumsativum*) and Ginger (*Zingiber officinale*) Attenuate Structural Nephropathy Progression In Streptozotosin Induceddiabetic Rats. *Clin Nutrs and Metab*. 2 : 5 – 6.

Ardiani, F. dan W. Lestriana. 2008. Pengaruh Pemberian Ekstrak Air Ceplikan *(Reullia Tuberosa L)* Terhadap Kadar SGOT Dan SGPT Serta Gambaran Histologis Hepar Pada Tikus Putih *(Rattus Norvegicus)* Diabetes Mellitus [M.Sc.Thesis]. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

Ariza, M.A., G.V. Varsha, and J.L. Rosenzweig. 2010. The Economic Consequences Of Diabetes And Cardiovaskular Disease In The United States. Springer. USA. 1-10.

Armitage, D. 2004. *Rattus Norvegicus*. Animal Diversity Web. University of Michigan of Zoology. Michigan.

Arimbi, A. A., Darsono R., Plumeriastuti H., Widiyatno T., dan Legowo D. 2013. *Buku Ajar Patologi Umum Veteriner.* Airlangga University Press

Arunachalam, K., and T. Parimelazhagan. 2013. Antidiabetic Activity Of *Ficus Amplissima Smith*. Bark Extract In Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 147 : 302 – 310.

Aulanni'am, R, Anna and L.R. Nur. 2012. The Potency of *Sargasum duplicatum* Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy in (*Rattus novergicus*). *Journal Of Life Science.* 6 : 144 – 154. http://www.davidpublishing.com/DownLoad/?id=5021. [14 Mei 2015]

Bai, J. snd J. A. Odin. 2003. Apoptosis And The Liver: Relation To Autoimmunity And Related Conditions. *Auto- immunity Reviews.* 2: 36-42

Baratawidjaja K.G. 2004. *Imunologi Dasar: Sitokin*. Balai Penerbit FK-UI. Jakarta.128-131.

Boden, G., M. Mozzoli, P. Cheung and P. She. 2005. Free Fatty Acids Produce Insulin Resistance And Activate The Proinflammatory Nuclear Factor Kappa B Pathway In Rat Liver. Temple University School of Medicine. Philadelphia. 54 : 3458-3465.

Bradburry, M.W. 2006. Lipid Metabolism and Liver Inflammation I. Hepatic Fatty Acid Uptake: Possible Role in Steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 290:194-198.

Chandrasoma P. 2005. *Ringkasan Patologi Anatomi.* Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 121-124.

Center for Disease Control and Prevention. 2008. Diabetes Statistics: Diagnosed Diabetes Mellitus Rates Increase to 24 million from 21 million. http://www.nanasdiabetes.com/diabetes-statistics.php [20 September 2014].

Chwan, F.L., L.H Yu, Y.C. Lee, J.S. Shuenn, C.C. Chien. 2006. Bioactive Flavonoids From *Ruellia tuberosa*. *J Chinese Med.* China.

Corwin, E. J. 2009. *Buku Saku Patofisiologi*. Edisi 3. EGC. Jakarta.

Dannis L., L., Dan, B., Eugene, L., Stephen, J., Jameson and Harrison. 2005. *Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill. New York.

De Melo, C.L., M.G. Queiroz., A.C. Arruda Filho, A.M. Rodrigues, D.F. de Sousa, J.G. Almeida, O.D. Pessoa, E.R. Silveira, D.B. Menezes, T.S. Melo, F.A. Santos, and V.S. Rao. 2009. Betulinic Acid, A Natural Pentacyclic Triterpenoid, Prevents Abdominal Fat Accumulation In Mice Fed a High-Fat Diet. *J Agric Food Chem. Spain*. 57(19) : 8776-8781.

Dean, T. E., F.A. McAlister, D.F. Blackburn, S.R. Majumdar, J.A. Johnson, R.T. Tsuyuki, and J.Varney. 2005. Benefits and harms of antidiabetic agents in patients with diabetes and heart failure: systematic review. *BMJ*.

Dixon D., R. Goldberg, N. Schneiderman, and Delamater. 2004. Gender Differences In TNF-Alpha Levels Among Obese Vs Non Obese Latino Children. *European journal of clinical nutrition.* 58 : 696-699

Ellis, H. 2006. Clinical Anatomy. *A Revision and Applied Anatomy for Clinical Students.* 11th ed. Blackwell Publishing. Massachussets. 86 - 90.

Erica, S.B., A.D. Henn, H.L. Gurtoo, R.M. Wollman, J.L. Alderfer, E. Mihich and M.J. Ehrke. 2000. A Novel Tumor Necrosis Factor Alpha Inhibitory Protein, TIP-B1. *International journal of immunopharmacology*. 22(12):1137-42.

Esposito, K. and F. Nappo. 2002. Inflammatory Cytokine Concentrations Are Acutely Increased By Hyperglycemia In Humans. Role of oxidative stress. *Circulation*. 106 : 2067-2072

Fall, T., H.H. Hamlin, A. Hedhammar, O. Kampe and A. Egenvall. 2007. Diabetes Mellitus in a Population of 180.000 Insured Dogs: Incidence, Survival, and Breed Distribution. *J Vet Intern Med*. 21:1209-1216.

Fauci H. 2008. *Harrison's : Principles of Internal Medicine.* 17th edition. McGraw-Hill, inc. USA. 156 – 158.

Frances, D. E., P. I. Ingaramo, M. T. Ronco, and C. E. Carnovale. 2010. Diabetes, an Inflammatory Process: Oxidative Stress and TNF-alpha involved in Hepatic Complication. *J. Biomedical Science and Engineering*. 6 : 645-653

Fu-An, C., A. W. Bang, S. Pochuen, D. K. Huang, C.H. Ying. 2006. Evaluation of The Antioxidant activity of Ruellia tuberosa. *Food Chem*. 3 : 4-7.

Geneser. 2004. *Buku Teks Histologi*. Gramedia. Jakarta. 89 – 91.

Gultom, M.A. 2003. Penambahan Tepung Kunyit *(Curcuma domestica)* dalam Ransum untuk Meningkatkan Bobot Badan Tikus Putih *(Rattus norvegicus).*[Skripsi]. Program Studi Teknologi Produksi Ternak Jurusan Ilmu Produksi Ternak Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.

Guntur H, 2004. The Role Cytokine of the Pathogenesis of SIRS-SEPSIS. Perspektif Masa Depan Imunologi - Infeksi. *Sebelas Maret University Press*. 21-37.

Groop P.H., M. C. Thomas,V. Mills, S. Thomas, C. Forsblom, M. R. Taskinen, and G. Viberti. 2007. HDL Composition Predicts New-Onset Cardiovascular Disease In Patients With Type 1 Diabetes. *Brief report.* Diabetes care vol 30.

Handajani, F. 2008. Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Merah *(Pandanus conoideus lam*) Pada Kadar SGPT Dan Γ- GT Tikus Putih *(Rattus novergicus)* yang Diinduksi Parasetamol Dosis Tinggi,Tunggal Penelitian

Eksperimental Laboratoris. http://www.library@lib.unair.ac.id. [22 September 2014].

Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. 1999**.** *Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed*. Clarendon Press. Oxford.

Hess, R.S., P.H. Kass, C.R. Ward. 2000. Breed Distribution Of Diabetes Mellitus In Dogs Admitted To A Tertiary Care Facility. *J Am Vet Med Assoc.* 216:1414-1417

Heslet, L. 2004. *Kolesterol : Yang Perlu Anda Ketahui.* Terjemahan : Adiwiyoto, A. Megapoin. Jakarta. 20 – 22.

Hushada, Y. 2004. *Ilmu Penyakit Dalam Jilid 1*. Gaya Baru. Jakarta. 41 – 42.

Hussain, M. 2008. Biochemical and Histomorphological Study of Streptozotocin Induced Diabetes Mellitus in Rabbits. *Pakistan Journal of Nutrition* 7 (2): 359 – 364.

Ishige, K., D. Schubert, and Y. Sagara. 2001. Flavonoids Protect Neuronal Cells From Oxidative Stress By Three Distinct Mechanisms. Free Radic. *Biol. Med*. 30 : 433 – 446.

Jawi I.M, W.P. Sutirta, dan H. Saputra. 2007. Gambaran Histologis Hepar Serta Kadar SGOT dan SGPT Darah Mencit Yang Diberikan Alkohol Secara Akut dan Kronis. *Dexa Media.* 1(20) : 23-26

Je, H.D., C.Y. Shin, H.S. Park, I.H Huh., and U.D. Sohn. 2001. The Comparison of Vitamin C and Vitamin E On The Protein Oxidation Of Diabetic Rats. *J. Auton. Pharm.* 21: 231-36.

John, M.F. 2006. *Klasifikasi dan Kriteria Diagnosis Diabetes mellitus yang Baru*. Cermin Dunia Kedokteran. Jakarta. 37 – 40.

Junquiera, L.C. and J. Carneiro. 2007. *Basic Histology*. The McGraw-Hill Companies.

Kleemann R., S. Zadelaar, and T. Kooistra. 2008. Cytokines And Atherosclerosis: A Comprehensive Review Of Studies In Mice. *Cardiovascular Research.* 79, 360–376.

Kram D.J., and K.A Keller. 2001. *Use of Laboratory Animals in Toxicology Studies*. In: Toxicology testing handbook. Marcel Dekker. New York, USA. 1 – 17.

Lehuen A., J. Diana., P. Zaccone, and A. Cooke. Immune Cell Crosstalk in Type 1 Diabetes. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U986. France.

Lenzen S. 2008. The Mechanisms Of Alloxan And Streptozotocin Induced Diabetes. *Diabetologia*. 51:216-26.

LeRoith, D., S. Taylor and J.M. Olefsky. 2004. *Diabetes Mellitus : A Fundamentaland Clinical Text 3rd Edition.* Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 519-538.

Lukiati, B., Aulanni'am, and W. Darmanto. 2012. The Effects of *Curcuma heyneana* on the Superoxide Dismutase Activity and Histological Pancreas of Type 1 Diabetes Mellitus Rats. *International Journal of basic & aplied sciences.* Vol: 12 ; No: 2.

Maitra A, and A. K., Abbas. 2005. The Endocrine System. Pathologic Basis of Disease. Edisi ke-7. Elsevier Saunders. Philadelphia.

Navarro,G.J.F., and F.C. Mora. 2008. The Role of Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 19: 433–442.

Notoatmodjo, S. 2002. *Promosi Kesehatan dan Ilmu Pengetahuan*. Rinera Cipta. Jakarta. 60.

Nugroho, A. E. 2006. Animals Models Of Diabetes Mellitus: Pathology and Mechanism Of Some Diabetogenics. Laboratorium Farmakologi Dan Toksikologi. Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada.

Palsamy, P. and S. Subramanian. 2010. Ameliorative Potential Of Resveratrol On Proinflammatory Cytokines, Hyperglycemia Mediated Oxidative Stress, And Pancreatic Beta-Cell Dysfunction In Streptozotocin-Nicotinamide-Induced Diabetic Rats. *Journal Cell. Physiol*. 224: 423 - 432.

Popa C., M.G. Netea, M. van Riel, M. van der Meer, and A.F Stalenhoef. 2007. The Role Of TNF-A In Chronic Inflammatory Conditions, Intermediary Metabolism, And Cardiovascular Risk. *Journal Lipid Res.* 48: 751–762.

Rajarajeswari D., K. Ramalingam, M. Krishnamma and T.S. Krishna. Association Of Tnf-A With Obesity In Type2- Diabetes Mellitus. Department Of Biochemistry. Narayana Medical College And Hospital. Nellore. India.

Rajan M, V. Kishor Kumar, S. Kumar, K.R. Reddy Swathi, and S Haritha. 2012. Antidiabetic, Antihyperlipidaemic And Hepatoprotective Activity Of Methanolic Extract Of *Ruellia Tuberossa Linn* Leaves In Normal And

Alloxan Induced Diabetic Rats. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.* 4(6): 2860-2868.

Redha, A. 2010. Flavonoid : Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya Dalam Sistem Biologis. *Jurnal Belian*. 9(2): 196-202

Ress, D.A., and J.C., Alcolado. 2005. Animal Models of Diabetes Mellitus. *Diabetic Medicine*. 22: 359-370.

Romagnoli, M. And M.C Gomez Cabrera. 2010. Xanthine Oxidase-Induced Oxidative Stress Causes Active- Tion Of *NF-Kappab* And Inflammation In The Liver Of Type I Diabetic Rats. *Free Radical Biology and Medicine.* 49 : 171-177.

Ronco, M.T. and M.L. de Alvarez,. 2002. Modulation Of Balance Between Apoptosis And Proliferation By Lipid Peroxidation (LPO) During Rat Liver Regeneration. *Molecular Medicine.* 8 : 808-817.

Santoso, Singgih. 2003. Mengatasi Berbagai Masalah Statistik dengan SPSS Versi 11.5. Elex Media Komputindo. Jakarta.

Sirois, M. 2005. Laboratory Animal Medicine : Principles and Procedures. Elsevier Mosby.St. Louis. Missouri. 22 – 24.

Szkudelski, T., 2001, The Mechanism Of Alloxan And Streptozotocin Action In β Cells Of The Rat Pancreas. *Physiology Research*. 50: 536 – 54.

Smeltzer, S. C., and B.G., Bare. 2001. Buku Ajar Keperawatan Medikal Bedah Brunner & Suddarth (Vol. 2). EGC. Jakarta. 41 – 43.

Soegondo, S. 2007. Penatalaksanaan Diabetes Mellitus Terpadu. Balai Penerbit FKUI. Jakarta.

Tolman K.G., V. Fonseca, A. Dalpiaz and MengH. Tan. 2006. Spectrum of Liver Disease in Type 2 Diabetes And Management Of Pattient With Diabetes And Liver Disease http://care.diabetesjournals.org/cgi/content/full/30/3/734 [20 Desember 2014].

Ullah S., D. Shahwar, M.A.S. Ullah, N. Ahmad and M.A. Khan. 2011. Hypoglycemic Activity of *Ruellia tuberose Linn* (Acanthaceae) in Normal and Alloxan-Induced Diabetic Rabit. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Pakistan. 7(2): 107–115.

Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *Journal of Clinical Investigation*. 115 : 1111-1119

World Health Organization (WHO). 2012. Diabetes mellitus http:// www.who.int/mediacentre/ factsheet/fs138/en, [10 November 2014].

World Health Organisation (WHO). 2006. Diabetes Mellitus : Report of a WHO Study Group. World Health Organisation. Geneva – Switzerland. S5-36.

Wulan, D.R., E. P.Utomo, and C., Mahdi. 2014. Molecular Modeling Of *Ruellia Tuberosa* L Compounds As A-Amylase Inhibitor: An *In Silico* Comparation Between Human And Rat Enzyme Model. *Bioinformation.* 10(4): 209-215

Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik

KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"

No:250-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (*ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE*)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL	: STUDI PEMBERIAN FRAKSI N-HEKSAN EKSTRAK METANOL DAUN *Ruellia tuberossa* L TERHADAP AKTIFITAS ENZIM α-AMILASE USUS TIKUS PUTIH *(Ratus norvegicus)* DAN KADAR MDA PADA TIKUS DIABETES MELITUS HASIL INDUKSI MLD-STZ
PENELITI	: MAYASHUDI DIAN FALENTINO
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT	: UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG
DINYATAKAN	: LAIK ETIK

Malang, 6 Agustus 2014
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya

Prof.Dr.drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 2. Identifikasi tanaman

LABORATORIUM TAKSONOMI, STRUKTUR DAN PERKEMBANGAN TUMBUHAN
JURUSAN BIOLOGI, FAKULTAS MIPA
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
JALAN VETERAN, MALANG 65145
Telepon/faks: 0341-575841

KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0103/Takso.Identifikasi/03/2013

Kepala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:

Nama : Dyah Ratna Wulan (NIM. 116090200111015)

Instansi : Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Brawijaya

Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1968), volume II, halaman 557, diidentifikasi sebagai:

Familia : **Acanthaceae**
Genus : ***Ruellia***
Species : ***Ruellia tuberosa* L.**

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 26 Agustus 2013

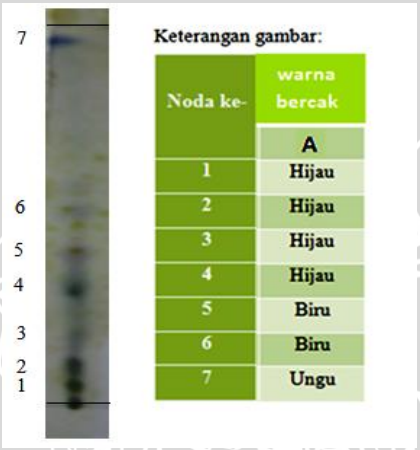
Kepala Laboratorium
Taksonomi, Struktur dan
Perkembangan Tumbuhan,

Dr. Serafinah Indriyani, M.Si.
NIP. 19630909 198802 2 001

Lampiran 3. Karakterisasi flavonoid dalam *Ruellia tuberosa L.*

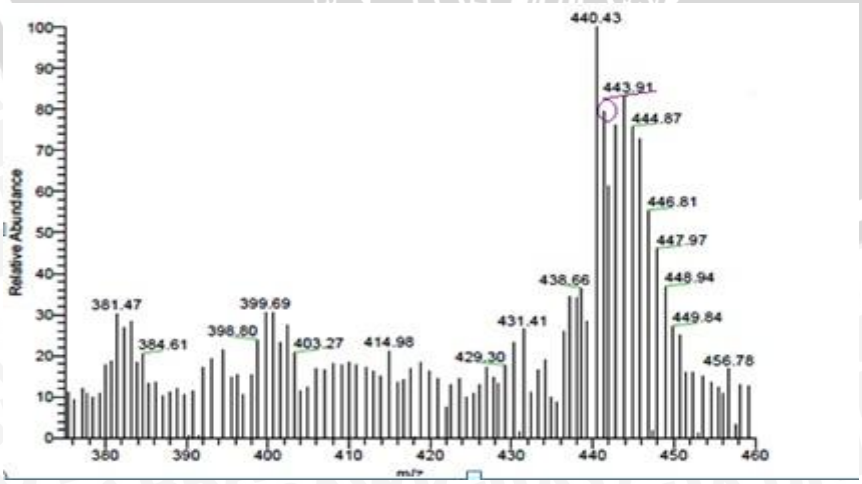
Untuk melihat gambaran komponen senyawa yang terkandung dalam ekstrak, dilihat profil kromatografi lapis tipis (KLT) ekstrak. KLT dilakukan dengan menggunakan fasa diam silica gel dan fasa gerak n-heksan: etil asetat (4:1) dengan jarak eluasi 10 cm. Setelah dieluasi, plat KLT disemprot dengan reagen pewarna Lieberman buchardat untuk mengetahui ada tidaknya steroid. Warna kuning hijau sampai biru menunjukkan adanya golongan flavonoid.

Dari profil KLT hasil penelitian terlihat 7 bercak senyawa, setelah disemprot penampak bercak, 3 diantaranya berwarna biru sampai ungu **(Gambar 3.1)**. Hal ini menunjukkan adanya flavonol pada pletekan.



Gambar 3.1 Profil KLT fraksi n-heksan ekstrak pletekan.
A: bercak setelah disemprot penampak bercak lieberman buchardat.

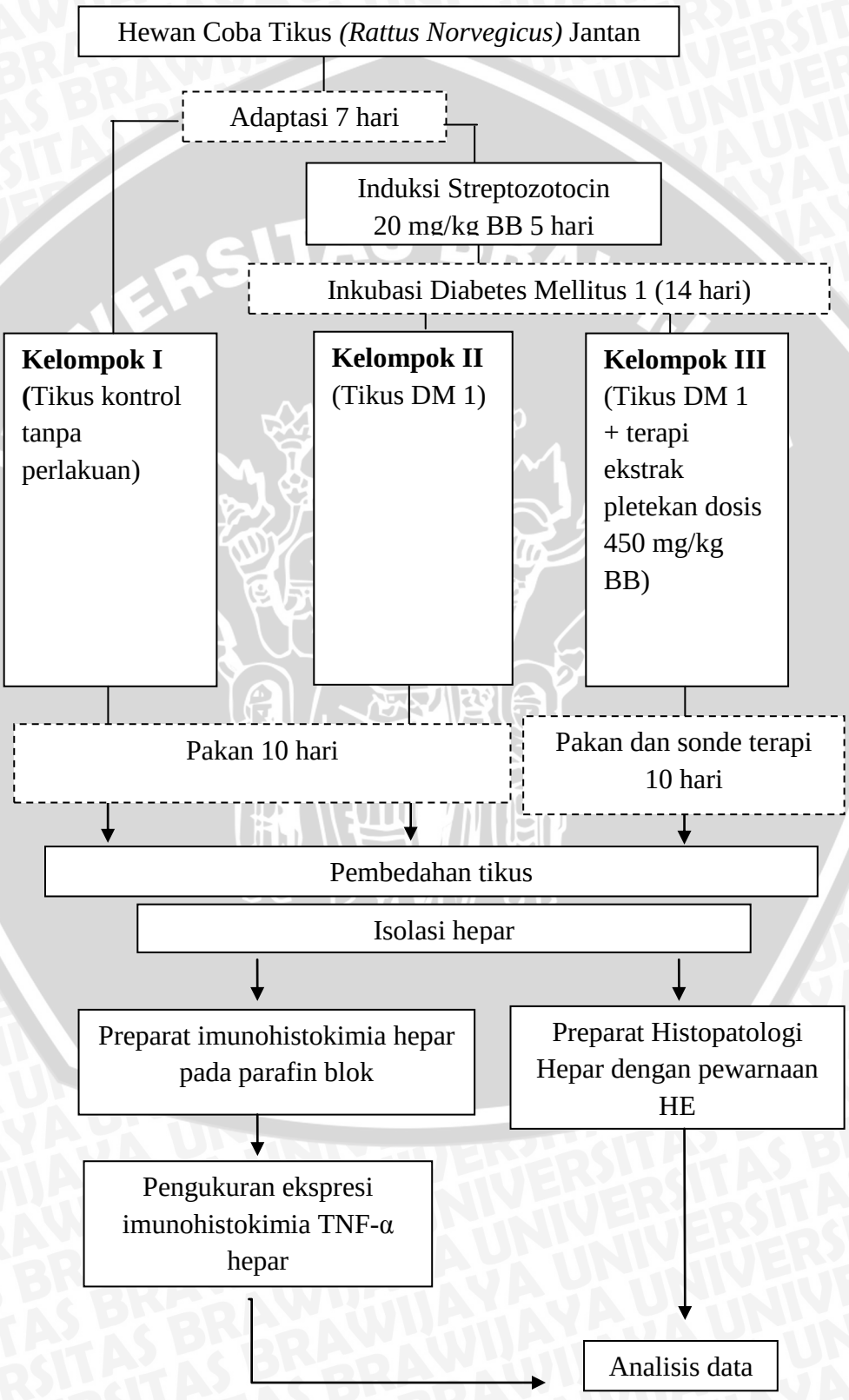
Profil kromatogram LC-MS menunjukkan beberapa komponen senyawa dalam fraksi n-heksan ekstrak pletekan.



Gambar 3.2 Profil kromatogram ekstrak pletekan. Sumbu y menunjukkan *relative abundane,* sumbu x menunjukkan m/z fragmen molekul.

Muncul m/z 449 [M-1] yang merupakan senyawa Apigenin-O-glukoside [M, 450] yang merupakan senyawa flavonol, sedangkan m/z 447 [M-1] kemungkinan adalah Luteolin-O-glukoside [M, 448]. Akan tetapi senyawa dengan m/z lain yang disebutkan diatas belum dapat diperkirakan karena terbatasnya penelitian mengenai identifikasi metabolit sekunder *Ruellia tuberosa L.*

Lampiran 4. Skema Kerja Penelitian



Lampiran 5. Pembuatan senyawa bioaktif ekstrak *Ruellia tuberossa L.*

Ruellia tuberossa L

- Diambil 4 pucuk daun teratas beserta batang pletekan
- Dicuci bersih dan dipotong kecil-kecil
- Dikeringkan dalam suhu ruang selama ±5 hari
- Diblender

Serbuk *Ruellia tuberossa L* kering

- Diambil sebanyak 500 g
- Diekstraksi dengan metanol (3L x 3) selama 72 jam
- Dipekatkan dengan rotary evaporator
- Ditimbang dan dicatat
- Ekstrak pekat dilarutkan dalam air
- Dipartisi dengan n-heksan (1:1) menggunakan corong pisah hingga Flavonoid terekstraksi optimal
- Diambil fraksi n-heksan dan dipekatkan dengan rotory evaporator
- Ekstrak dismpan dalam botol gelap pada temperature 4°C
- Ditimbang dan dicatat

Flavonoid

Lampiran 6. Penghitungan Dosis dan Pengenceran Ekstrak Pletekan

Contoh penghitungan dosis ekstrak pada tikus kelompok 3 dengan berat badan tikus adalah 181, 188, 180, 179, 189, dan 193 gram, serta tiap ekor tikus disonde dengan ekstrak sebanyak 2 mL adalah sebagai berikut :
Dosis yang diberikan 450 mg/Kg BB tikus.

BB tikus kelompok 3 = 181 + 188 + 180 + 179 + 189 + 193
= 1110 gram

$$\frac{450 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} : \frac{x \text{ mg}}{1100 \text{ g}}$$

$$x = \frac{459 \text{ mg} \times 1100 \text{ g}}{1000 \text{ g}}$$

= 499, 5 mg

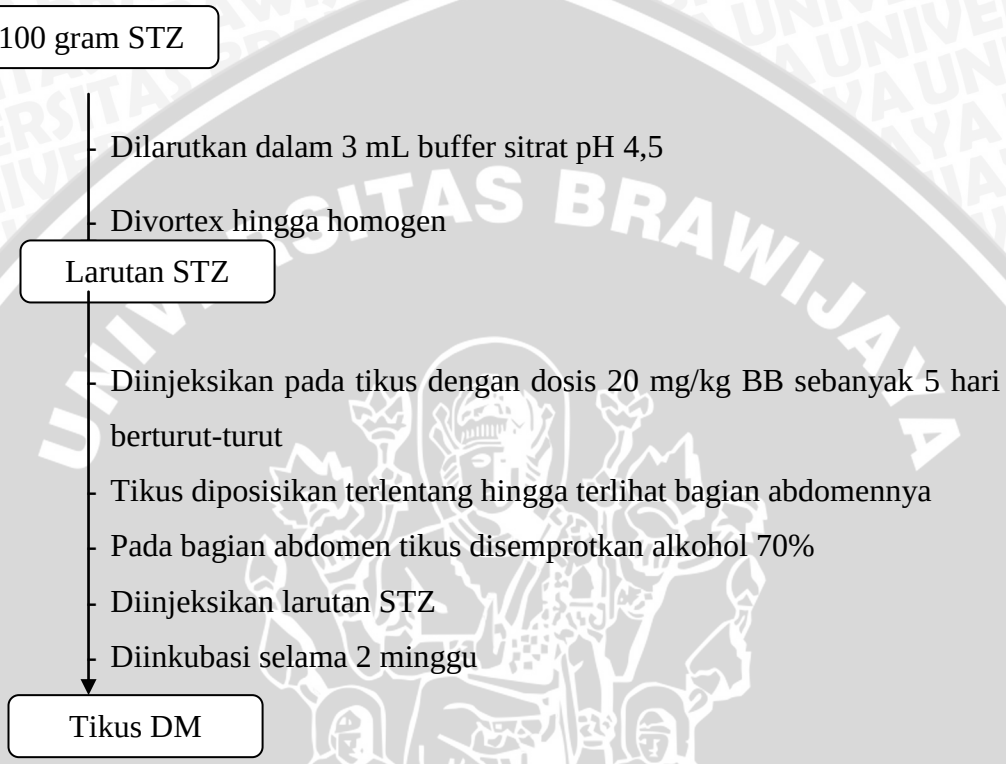
Jadi ekstrak pletekan yang diberikan pada tikus kelompok 3 adalah 0,5 gram ekstrak yang dilarutkan pada 12 mL minyak jagung

Ekstrak pletekan
- Ditimbang sebanyak 499,5 mg
- Dimasukkan ke dalam labu ukur
- Ditambah minyak jagung hingga volume menjadi 12 mL
- Diaduk hingga homogen

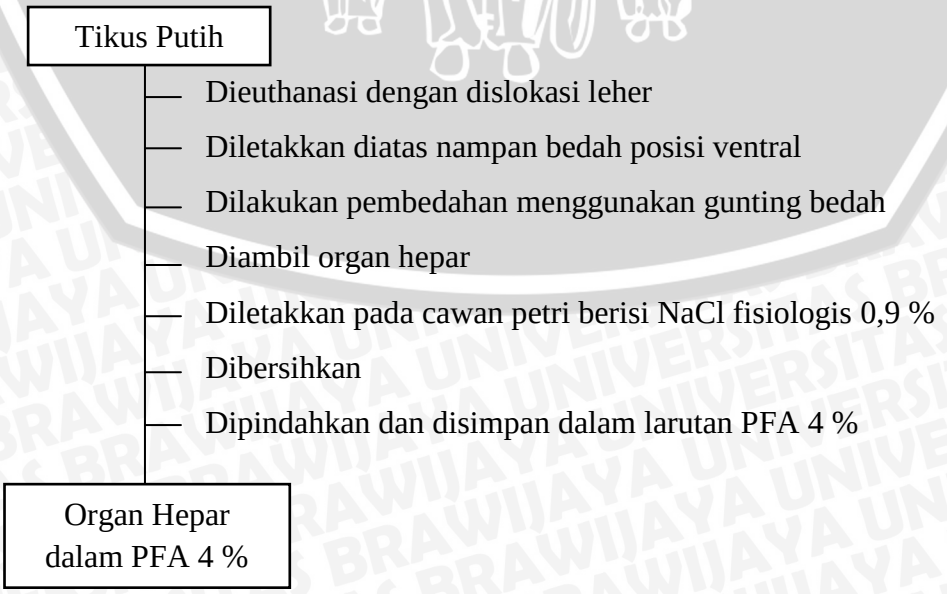
Hasil

Lampiran 7. Diagram Kerja Penelitian

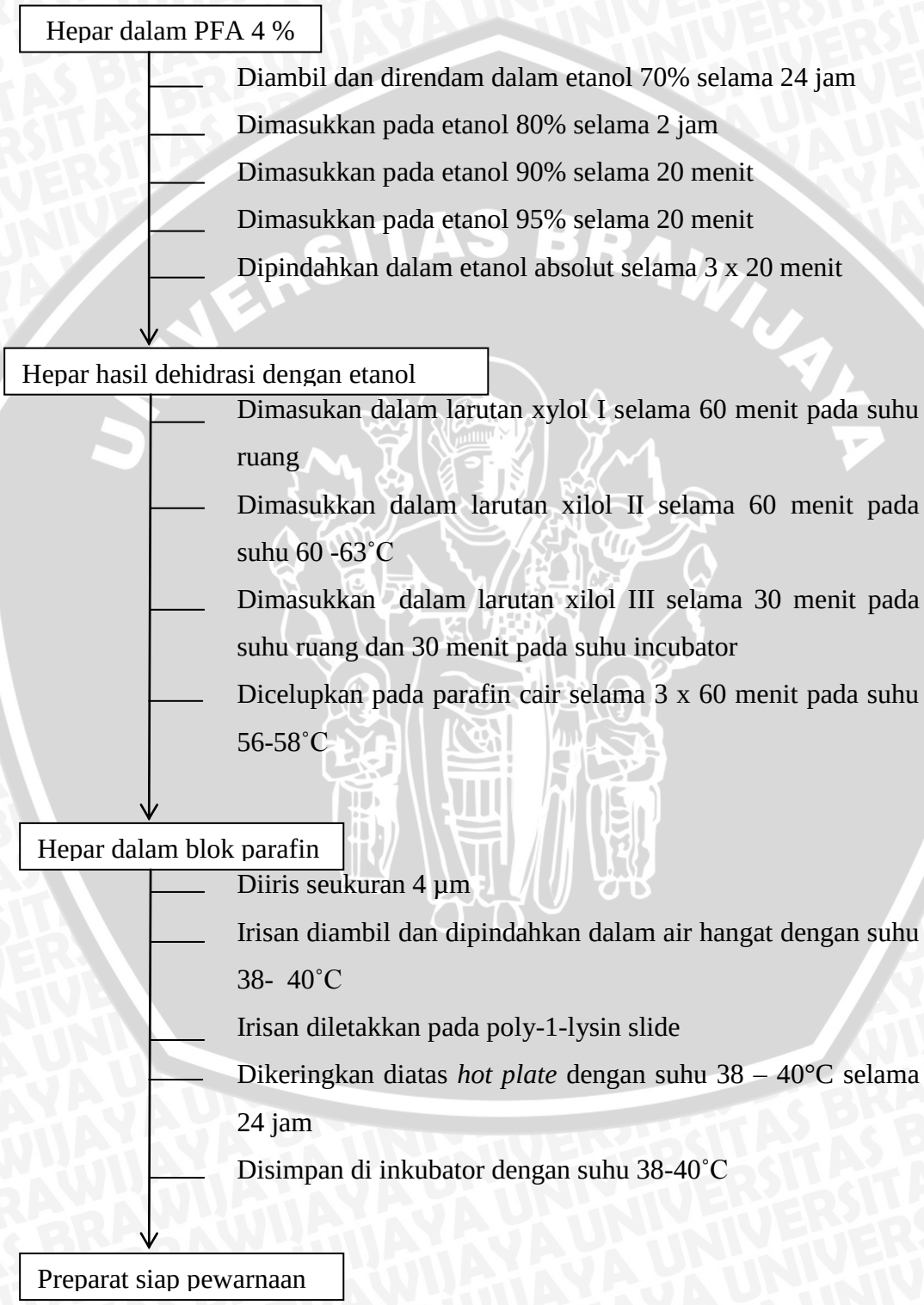
7.1 Pembuatan larutan STZ dan injeksi STZ



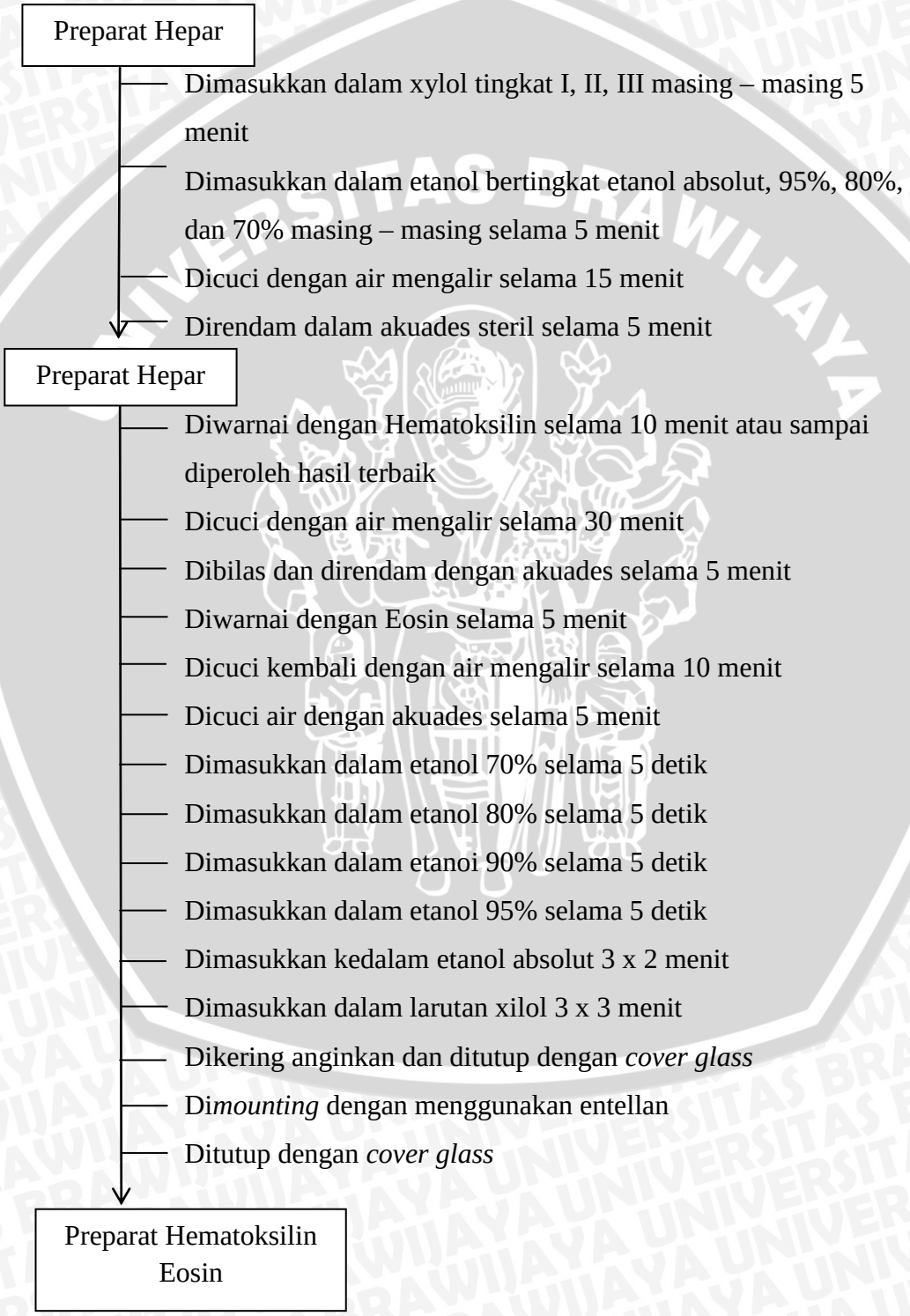
7.2 Pembedahan dan isolasi organ hepar



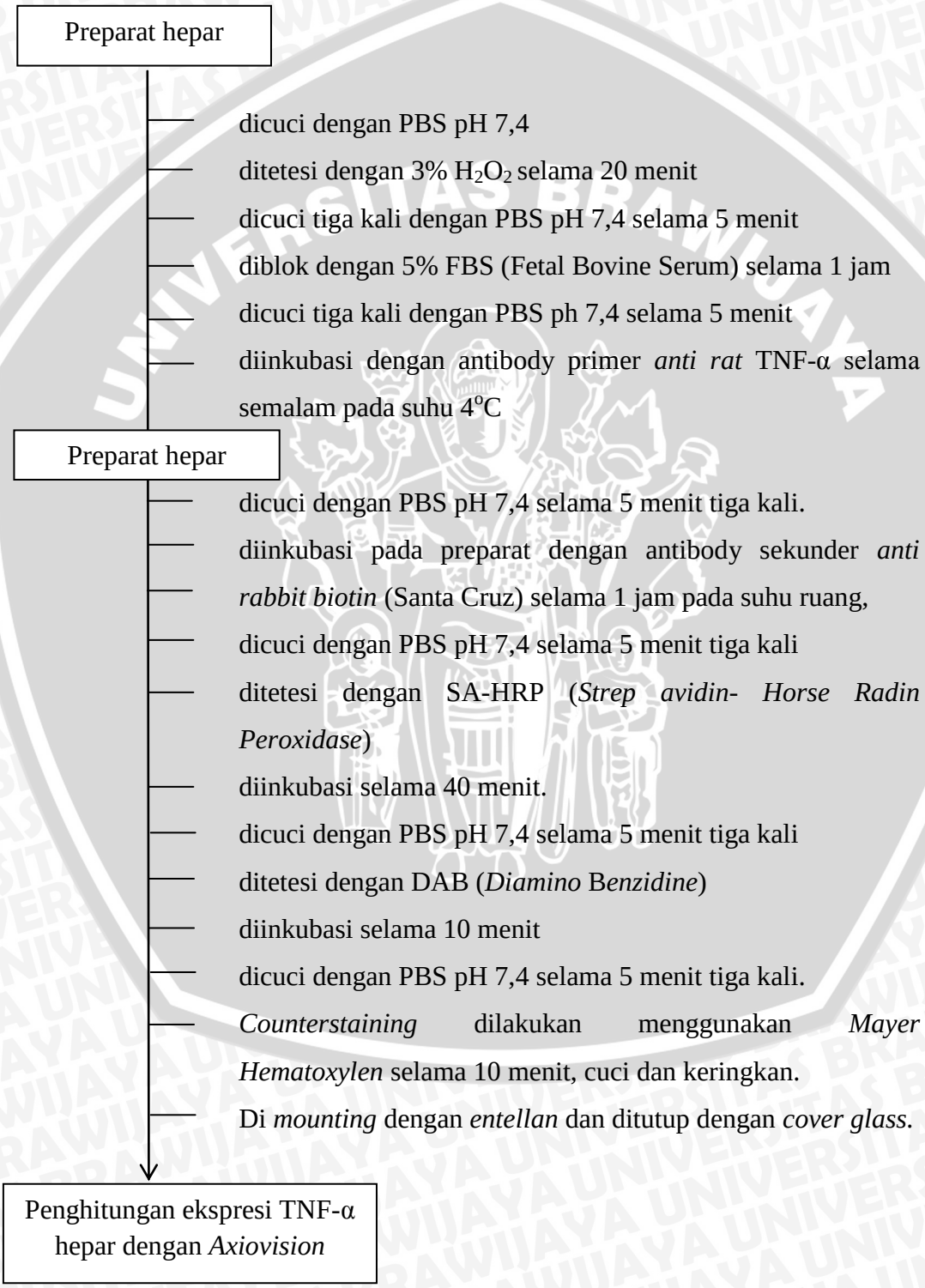
Lampiran 7.3 Pembuatan Preparat Hepar



Lampiran 8. Pewarnaan *Hematoksilin – Eosin* (HE)



Lampiran 9. Pengukuran ekspresi TNF-α (*Tumor necrosis factor alpha*) hepar dengan metode imunohistokimia



Lampiran 10. Kadar Gula Darah Tikus

Tabel L.10.1 Kadar gula darah sebelum dilakukan terapi

Kelompok Percobaan	Tikus	kadar gula darah mg/dL
Tikus Sehat	1	122
	2	114
	3	105
	4	119
	5	108
	6	102
Tikus DM	1	220
	2	256
	3	312
	4	540
	5	267
	6	398
Tikus DM + ekstrak metanol pletekan 450 mg/Kg BB	1	317
	2	286
	3	432
	4	403
	5	454
	6	502

Tabel L.10.2 Kadar gula darah setelah dilakukan terapi selama 10 hari

Kelompok Percobaan	Tikus	kadar gula darah mg/dL
Tikus Sehat	1	114
	2	122
	3	105
	4	108
	5	129
	6	102
Tikus DM	1	222
	2	405
	3	233

	4	459
	5	247
	6	321
Tikus DM + ekstrak metanol pletekan 450 mg/Kg BB	1	102
	2	105
	3	110
	4	98
	5	116
	6	156

Tabel L.10.3 Rata Kadar Gula Darah Tikus

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Kadar Gula Darah Sebelum Terapi (mg/dL)	Rata-rata Kadar Gula Darah Setelah Terapi (mg/dL)
Kontrol Negatif	126.6667±12.06.[a]	125.333±31.506 [a]
Kontrol Positif	372.1667±48.433 [b]	354.333±72.571 [b]
Terapi 450 mg/kg BB	399.1667±48.848 [b]	114.5±21.276 [a]

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($p<0.05$).

Lampiran 11. Hasil uji statistika terapi *Ruellia tuberosa L* terhadap ekspresi TNF- α hepar tikus diabetes mellitus 1.

Tabel L.11.1 Data Ekspresi TNF-α

No	Kelompok Perlakuan	Tikus 1	Tikus 2	Tikus 3	tikus 4	tikus 5	tikus 6	Rata-Rata Ekspresi TNF-α
1	Kontrol	1,725	1,633	1,659	1,771	1,764	1,868	1,737
2	DM 1	3.345	3.077	3.239	3.128	3.118	3.036	3.157
3	Terapi	1.978	1.826	1.791	1.918	1.797	1.928	1.873

Tabel L.11.2 Uji Normalitas Data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		kelompok	TNFalfa
N		18	18
Normal Parameters[a]	Mean	2.0000	2.25561
	Std. Deviation	.84017	.664358
Most Extreme Differences	Absolute	.216	.329
	Positive	.216	.329
	Negative	-.216	-.213
Kolmogorov-Smirnov Z		.918	1.394
Asymp. Sig. (2-tailed)		.368	.041

a. Test distribution is Normal.

Tabel L.11.3 Descriptives

TNF alfa

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol -	6	1.73667	.084958	.034684	1.64751	1.82582	1.633	1.868
kontrol +	6	3.15717	.114430	.046716	3.03708	3.27725	3.036	3.345
Terapi	6	1.87300	.078465	.032033	1.79066	1.95534	1.791	1.978
Total	18	2.25561	.664358	.156591	1.92523	2.58599	1.633	3.345

Tabel L.11.4 Uji Homogenitas Varian

TNF alfa

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.548	2	15	.589

Tabel L.11.5 Uji ANOVA

TNF alfa

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.371	2	3.685	417.717	.000
Within Groups	.132	15	.009		
Total	7.503	17			

Tabel L.11.6 Multiple Comparisons

TNF alfa
Tukey HSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol -	kontrol +	-1.420500*	.054231	.000	-1.56136	-1.27964
	Terapi	-.136333	.054231	.058	-.27720	.00453
kontrol +	kontrol -	1.420500*	.054231	.000	1.27964	1.56136
	Terapi	1.284167*	.054231	.000	1.14330	1.42503
Terapi	kontrol -	.136333	.054231	.058	-.00453	.27720
	kontrol +	-1.284167*	.054231	.000	-1.42503	-1.14330

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

Tabel L.11.7 Uji Turkey

Tukey HSD

kelompok	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
kontrol -	6	1.73667	
terapi	6	1.87300	
kontrol +	6		3.15717
Sig.		.058	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.