

**Studi Ekstrak Metanol Biji Mahoni (*Swietenia mahagoni*)
terhadap SOD Serum dan Ekspresi E-kaderin pada Organ
Ginjal Tikus Putih (*Rattus novogicus*) Pasca Induksi MLD-STZ**

SKRIPSI

**Oleh:
DEASY LUANDAYANTI
0910910039**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**Studi Ekstrak Metanol Biji Mahoni (*Swietenia mahagoni*)
terhadap SOD Serum dan Ekspresi E-kaderin pada Organ
Ginjal Tikus Putih (*Rattus novercicus*) Pasca Induksi MLD-STZ**

SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh gelar Sarjana
Sains dalam Bidang Biologi**

Oleh:

DEASY LUANDAYANTI

0910910039



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

LEMBAR PENGESAHAN TUGAS AKHIR

**Studi Ekstrak Metanol Biji Mahoni (*Swietenia mahagoni*)
terhadap SOD Serum dan Ekspresi E-kaderin pada Organ
Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Pasca Induksi MLD-STZ**

Oleh:

**Deasy Luandayanti
0910910039**

**Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada Tanggal 18 Juli 2013 dan dinyatakan memenuhi syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi**

Pembimbing I

Pembimbing II

**Muhaimin Rifa'I Ph. D.Med.Sc
NIP. 196806261997021001**

**Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES
NIP. 196009031988022001**

**Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

**Rodliyati Azrianingsih.,MSc.PhD
NIP. 197001281994122001**

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Deasy Luandayanti
NIM : 0910910039
Jurusan : Biologi
Penulis Skripsi Berjudul : **Studi Ekstrak Metanol Biji Mahoni (*Swietenia mahagoni*) terhadap SOD Serum dan Ekspresi E-kaderin pada Organ Ginjal Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Pasca Induksi MLD-STZ**

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang Saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di Daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang Saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka Saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan Saya terima.

Demikian pernyataan ini Saya buat dengan segala kesadaran.

Malang,
Yang menyatakan

(Deasy Luandayanti)
NIM. 0910910039

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada pengarang. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



ABSTRAK

Studi Ekstrak Metanol Biji Mahoni (*Swietenia mahagoni*) terhadap SOD Serum dan Ekspresi E-kaderin pada Organ Ginjal Tikus Putih (*Rattus novvergicus*) Pasca Induksi MLD-STZ

Deasy Luandayanti^[1], Muhaimin Rifa'I^[1], Aulani'am^[2]

^[1]Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

^[2]Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

Diabetes mellitus (DM) merupakan suatu gejala yang timbul pada seseorang dimana keadaan hiperglikemia (kadar gula yang tinggi) yang kronik dengan disertai berbagai kelainan metabolik akibat gangguan hormonal. Salah satu tumbuhan yang digunakan masyarakat untuk pengobatan DM adalah mahoni (*Swietenia mahagoni*). Bagian yang digunakan dari tumbuhan tersebut adalah bijinya. Namun mekanisme ekstrak metanol biji mahoni belum banyak diketahui. Pada penelitian ini menggunakan tikus model DM dengan induksi MLD-STZ. Tikus dikelompokkan dalam 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan kelompok DM dengan terapi 100, 250 dan 400 mg/KgBB. Metode yang digunakan dalam penelitian ini meliputi pengekstrakan biji mahoni, induksi tikus DM dengan injeksi MLD-STZ secara intraperitoneal, uji aktivitas SOD dan perhitungan ekspresi E-kaderin menggunakan metode imunohistokimia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai SOD serum yang didapatkan berdasarkan kelompok, yaitu 98,99; 61,12; 70,05; 79,29 dan 84,49 unit/ml. Dosis optimum untuk meningkatkan ekspresi e-kaderin hingga mendekati kontrol negatif adalah 250 mg/KgBB. Pemberian terapi ekstrak metanol biji mahoni pada tikus model DM Tipe 1 mampu menaikkan aktivitas SOD dan meningkatkan ekspresi e-kaderin.

Kata Kunci: diabetes mellitus (DM), ekspresi E-kaderin, ginjal, SOD (superoksida dismutase), STZ (streptozotocin).

ABSTRACT

The Study of an Extract of Methanol Seeds Mahoni (*Swietenia mahagoni*) forward SOD Serum and Expressions of E-cadherin in the Renal Organs White Rat (*Rattus norvegicus*) after Inductions of MLD-STZ

Deasy Luandayanti^[1], Muhaimin Rifa'i^[1], Aulani'am^[2]

^[1]Biology Department, Faculty of Mathematics and Science,
Brawijaya University, Malang.

^[2]Chemistry Department, Faculty of Mathematics and Science,
Brawijaya University, Malang.

Diabetes mellitus (DM) is a symptom that occurs in a person where the chronic hyperglycemia condition (high blood sugar level) with various metabolic abnormalities disorders caused by hormonal disorders. One of the plant used for treatment of DM is mahogany (*Swietenia mahagoni*). This research are study about methanol extract of mahogany seeds not widely on DMT 1. Rats were grouped in 5 groups, which is the control negative, control positive, and DM group with therapy 100, 250, and 400 mg/KgWB. The methods used in this research include seed extraction, DM rats induced by injection MLD-STZ with intraperitoneal, activity SOD assay and calculation e-cadherin expression using immunohistochemistry method. The result showed that the value of serum SOD is 98,99; 61,12; 70,05; 79,29 dan 84,49 unit/ml. Optimum dose to increase e-cadherin expression to nearly negative control is 250 mg/KgWB. Therapy of methanol extract to DM type 1 rats model is able to raise the activity of SOD and increase expression of e-cadherin.

Keyword: diabetes mellitus (DM), expression of E-kaderin, kidney, SOD (superoksida dismutase), STZ (streptozotocin).

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Al Fattahil Haadi. Segala puji bagi Allah SWT yang selalu memberi rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Sholawat dan salam semoga selalu terlimpahkan kepada Rasulullah SAW, beserta keluarga dan ahli baitnya. Penelitian ini adalah bagian dari penelitian payung penelitian Prof. Dr. Aulanni'am, drh, DES pengganti terapi tubuh untuk penyakit diabetes mellitus (DM).

Penulis menyampaikan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini, diantaranya:

1. Muhaimin Rifa'I Ph.D., Med.Sc dan Prof. Dr. Aulanni'am, drh, DES sebagai pembimbing, atas segala bimbingan, saran, dan nasihatnya.
2. Widodo, S.Si., Ph.D., Med.Sc sebagai penguji dan Ketua Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya atas saran dan masukan yang bermanfaat demi perbaikan penelitian ini.
3. Nany Suryani, S.Si., M. Kes atas diskusi dan masukan yang membantu dalam keberhasilan penelitian ini.
4. Bapak Bambang Marianto, Ibu Sumrik, Amd., Mas Wawan, Cahyani, SE dan Agus Setiawan atas segala dukungan dan do'a yang tulus ikhlas.
5. Bapak Harmadji, dan rekan Laboratorium Biokimia, antara lain Rizka, S.Si, Elhaq Kebo, S.Si., Anita, M.Si., Ninik, M.Si., Anton, S.Si., Marissa, M.Si., Vivi, S.Si., Mega, S.Si., Santi, M.Si., dan Biologi Molekuler antara lain Susi., S.Si., M. Biomed atas masukan yang bermanfaat dan dukungannya.
6. Seluruh rekan Biologi angkatan 2009, terutama Putri, S.Si., Miggy, S.Si., Cholillia A, S.Si, Uwais, S.Si., Yustino, S.Si., Hardi, S.Si., Bunga, S.Si., atas motifasi, saran, masukannya dan dukungannya, serta semua pihak yang telah membantu dalam mendukung kelancaran skripsi ini.

Tidak ada manusia yang sempurna, tetap imanusia yang baik adalah yang bermanfaat bagi orang lain. Saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan untuk menjadikan karya ini semakin bermanfaat.

Malang, 18 Juli 2013

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN TUGAS AKHIR	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Diabetes Mellitus (DM)	5
2.1.1 Pengelompokan Diabetes Mellitus (DM)	7
2.1.2 Diabetes Mellitus Tipe 1 dan Patogenesisnya	8
2.2 Mahoni (<i>Swietenia mahagoni</i>)	9
2.2.1 Morfologi dan Kandungan Kimia	9
2.2.2 Kegunaan dan Aktivitas Biologi	10
2.3 Agen Diabetogenik Streptozotocin (STZ)	11
2.4 Radikal Bebas dan Antioksidan	12
2.4.1 Radikal Bebas	12
2.4.2 Peran Radikal Bebas dalam Patogenesis Diabetes Mellitus ...	12
2.4.3 Antioksidan	13
2.5 Superoksida Dismutase (SOD)	14
2.6 E-Kaderin	15
2.7 Ginjal	16
2.8 Kerangka Konsep	17
BAB III METODE PENELITIAN	20
3.1 Tempat dan Waktu	20
3.2 Konsep Penelitian	20
3.3 Cara Kerja	20
3.3.1 Pembuatan Ekstrak Biji Mahoni (<i>Swietenia mahagoni</i>)	20

3.3.2	Persiapan Hewan Coba	20
3.3.3	Pembuatan Larutan Streptozotocin (STZ) dan Injeksi Intra peritoneal	20
3.3.4	Terapi Tikus Diabetes dengan Ekstrak Biji Mahoni (Swietenia mahagoni)	21
3.3.5	Pengukuran Kadar Glukosa Darah	21
3.3.6	Isolasi Serum	22
3.3.7	Pengambilan Organ Ginjal	22
3.3.8	Penentuan Aktivitas SOD (Superoksida dismutase)	22
3.3.9	Embedding Organ	23
3.3.9	Pembuatan Preparat Ginjal	23
3.3.10	Ekspresi E-Kaderin dengan dengan Imunohistokimia	24
	BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1	Induksi MLD-STZ terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus DMT 1	25
4.2	Aktivitas Superoksida dismutase (SOD) pada Tikus DMT 1 yang Mendapat Terapi Ekstrak Metanol Biji Mahoni	27
4.3	Ekspresi E-kaderin pada Jaringan Ginjal Tikus Hasil Induksi MLD-STZ yang Mendapat Terapi Ekstrak Metanol Biji Mahoni	29
	BAB V PENUTUP	32
5.1	Kesimpulan	33
5.2	Saran	33
	DAFTAR PUSTAKA	34
	LAMPIRAN	37



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Regulasi kadar gula darah	6
Gambar 2.2. Biji mahoni (Swietenia mahagoni)	9
Gambar 4.1 Struktur dasar senyawa fenolik	10
Gambar 2.3. Struktur kimia Streptozotocin	12
Gambar 2.4. Karakteristik protein E-kaderin	15
Gambar 2.5 Struktur histologi ginjal	17
Gambar 4.2 Perbandingan Kadar Glukosa Darah	26
Gambar 4.3 Perbandingan Aktivitas Serum SOD	29
Gambar 4.4 Ekspresi E-kaderin pada Organ Ginjal	31



DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Jumlah larutan yang ditambahkan pada sampel, blanko 1, blanko 2 dan blanko 3	23
Tabel 4.1	Kadar Glukosa Darah Tikus Kontrol, DM Tipe 1 dan Terapi Ekstrak Metanol Biji Mahoni	25
Tabel 4.2	Aktivitas SOD pada serum tikus kelompok kontrol, kelompok DMT1, kelompok terapi ekstrak biji mahoni dengan dosis 100; 250; dan 400 mg/KgBB	28
Tabel 4.3	Profil presentase area permukaan tikus kontrol, tikus DMT1 dan tikus kelompok terapi ekstrak methanol biji mahoni	30



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Preparasi Larutan	37
Lampiran 2. Diagram Alir Penelitian	38
Lampiran 3. Perhitungan Persentase Aktivitas Superoksida dismutase	43
Lampiran 4. Perhitungan Ekpresi E-kaderin	44
Lampiran 5. Pengukuran Kadar Glukosa Darah Tikus	44
Lampiran 6. Perhitungan Statistika menggunakan SPSS 15	45
Lampiran 7. Laik Etik Penelitian	48



DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL

Singkatan

ADA	(American Diabetes Association)
ADH	(AntidiuretikHormon)
BHA	(Butylated hydroxyl anisole)
BPS	BadanPusatStatistik)
CAD	(Cadherin)
CAT	(catalisis)
DM	(Diabetes mellitus)
DNA	(Deoxyribonucleat Acid)
DPPH	(Diphenyl-1-picrylhydrazine)
EMT	(Epithelial Mesenchymal Transition)
GAD	(Glutamate Decarboxylase)
GAE	(Gallic Acid Equivalent)
GHS	(Glutathionine)
GLUT2	(Glucose transporter-2)
GSSG	(Glutathione disulfide)
HLA	(Human Leucocyte Antigen)
HNF-1 α	(Hepatocyte nuclear factor 1 α)
HNF-4 α	(Hepatocyte nuclear factor 4 α)
IDDM	(Insulin dependent diabetes mellitus)
IDF	International Diabeter Federation)
IFG	(Impaired Fasting Glucose)
IGT	(Impaired Glucose Telorance)
JM	(Juxtramembrane)
MAPK	(Mitogen Activated Protein Kinase)
MLD-STZ	(Multiple Low Dose-Streptozotocin)
MODY 1	(Maturity Onset Diabetes of the Young 1)
MODY 2	(Maturity Onset Diabetes of the Young 2)
MODY 3	(Maturity Onset Diabetes of the Young 3)
NaCl-fis	(Natrium Chloride-fisiologi)
NADPH	(NicotinamideAdeninDinucleotida Phosphate-oxidase)
NIDDM	(Non-Insulin dependent diabetes mellitus)
PBS-Azida	(Phosphate Buffer Salin-Azida)
PKC β	(Protein Kinase C β)
RNS	(Reactive Nitrogen Species)
ROS	(Reactive Oxygen Species)

SKRT (Survey Kesehatan Rumah Tangga)
SOD (Superoksida dismutase)
STZ (Streptozotocin)
TGF- β 1 (Tumor Growth Factor β 1)
WHO (World Health Organization)
 β pankreas (beta pankreas)

Simbol

α Alfa
 β Beta
 λ Lamda
 μ l Mikro liter
ml mili liter
gr gram



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes mellitus (DM) merupakan suatu gejala yang timbul pada seseorang dimana keadaan hiperglikemia (kadar gula yang tinggi) yang kronik dengan disertai berbagai kelainan metabolik akibat gangguan hormonal. Diabetes mellitus sebagai suatu penyakit kronis yang mulai marak sebagai morbiditas dan mortalitas di negara-negara yang sedang berkembang termasuk Indonesia (Winasis, 2009).

Menurut data yang diambil dari *International Diabetes Federation* (IDF), angka prevalensi penyakit DM di Amerika Serikat 8,3% dan di Cina 3,9%. Di Malaysia bahkan mencapai 14,9% berdasarkan data yang diambil dari *National Health and Mortality & Morbidity Survey in Malaysia* pada tahun 2006 (Suyono, 2009).

Negara Indonesia menempati urutan keempat dari negara-negara berkembang yang mengidap penyakit DM menurut WHO. Setyadrian (2010) menyebutkan bahwa penderita DM di Indonesia meningkat sejak tahun 2000 dan pada tahun 2030 diperkirakan mencapai 21,3 juta orang. Pernyataan tersebut dipertegas dengan data Survey Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) Indonesia yang menunjukkan angka prevalensi atau angka kejadian DM juga meningkat dari tahun 2001 sebesar 7,5% menjadi 10,4% pada tahun 2004. Adapun hasil survei BPS (Badan Pusat Statistik) pada tahun 2003 yang menunjukkan prevalensi DM di perkotaan mencapai 14,7% dan 7,2% terjadi di pedesaan.

Penyakit DM dapat diakibatkan karena adanya stress oksidatif yang berkaitan dengan peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) sehingga akan mengganggu sistem pertahanan antioksidan yang dapat mengakibatkan peroksidasi lipid, perubahan enzim antioksidan dan ketidakefektifan dalam menanggulangi kelebihan ROS. Gangguan utama penyakit DM adalah ketidakstabilan pembentukan enzim antioksidan, adanya gangguan metabolisme glutathionin dan penurunan kadar asam askorbat. Berbagai penelitian membuktikan bahwa stress oksidatif yang terbentuk akibat keadaan hiperglikemia dapat mempercepat dan memperberat penyakit DM serta komplikasinya.

Akibat adanya paparan stress oksidatif, antioksidan endogen, yaitu enzim superoksida dismutase (SOD) akan meningkat

aktivitasnya untuk mengontrol stress oksidatif tersebut dengan mengubah anion superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2) sehingga dapat melindungi sel-sel β pancreas. Penurunan SOD dapat terjadi pada penderita diabetes mellitus sehingga biasanya pada penderita akan mengalami komplikasi pada ginjal, liver, dsb (Patel, dkk. 2009).

Komplikasi penyakit DM yang sering terjadi adalah pada organ ginjal. Komplikasi tersebut sering disebut dengan *diabetic nephropathy*. *Diabetic nephropathy* dapat didefinisikan sebagai penyakit yang ditimbulkan karena adanya peningkatan progresif pada ekskresi urin albumin, diiringi dengan peningkatan tekanan darah yang mengarah pada penurunan filtrasi glomerulus dan bahkan mengakibatkan gagal ginjal. Komplikasi kardiovaskuler dan ginjal memiliki kesamaan faktor resiko seperti tekanan darah, lemak darah dan kontrol glikemia. Keadaan hiperglikemi yang kronis dari diabetes akan mengakibatkan kerusakan jangka panjang, perubahan fungsi dan kegagalan berbagai organ, terutama mata, ginjal, syaraf, jantung dan pembuluh darah (Dabla, 2010).

Salah satu metode yang digunakan untuk menyebabkan stres oksidatif adalah STZ (Streptozotocin). STZ bekerja langsung pada sel β pankreas, dengan aksi sitotoksik yang dimediasi oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga dapat digunakan sebagai induksi DM. STZ masuk ke sel β pankreas melalui *glucose transporter* (GLUT2) dan akan menyebabkan alkilasi DNA. Alkilasi DNA ini akan menyebabkan kerusakan fragmentasi DNA (Aulanni'am, dkk., 2011).

Penyakit DM dapat dideteksi dengan melihat ekspresi e-kaderin dengan menggunakan metode imunohistokimia. E-kaderin merupakan komponen penting dari *adheren junction*, struktur yang bereperan penting dalam pengaturan integritas epitel (Perez-Moreno, dkk., 2003). Pada beberapa penyakit, kehilangan fungsi e-kaderin terjadi secara genetik atau epigenetik. Reduksi ekspresi dari e-kaderin dapat dijadikan tanda bahwa suatu jaringan telah mengalami EMT (*Epithelial Mesenchymal Transition*). Pada penderita DM, sebagian besar ekspresi e-kaderin telah hilang dan mengalami kecenderungan terjadi fibrosis (Daroux, dkk., 2012).

Banyaknya kejadian dan tingginya angka prevalensi DM yang terjadi di Indonesia, banyak orang melakukan penelitian untuk mengobati penyakit tersebut secara kimiawi maupun alami. Obat-obatan kimiawi tersebut seperti Sulfonilureas, Meglitinida,

Metformin (Biguanida), Thiazolidinedione, Alpha-Glucosidase Inhibitors, Vidagliptin, Insulin, dan lain-lain. Banyak juga obat-obatan herbal yang digunakan, contohnya buah mahkota dewa, brotowali, mengkudu, lidah buaya, teh hijau, dan lain-lain (Sumali, 2012).

Akhir-akhir ini penderita DM mulai beralih ke pengobatan herbal. Obat herbal merupakan obat yang diramu dari tanaman-tanaman berkhasiat obat yang ditujukan untuk penyakit tertentu. Obat herbal menjadi pilihan utama dalam pengobatan karena khasiatnya yang sudah terbukti dan tidak mempunyai efek samping seperti pada kebanyakan obat medis. Obat herbal dapat memperbaiki sel-sel organ tubuh yang rusak dan dapat memberikan efek penyembuhan yang permanen (Yuliarti, 2009).

Salah satu tumbuhan yang digunakan masyarakat untuk pengobatan DM adalah mahoni (*Swietenia mahagoni*). Bagian yang digunakan dari tumbuhan tersebut adalah bijinya. Biji mahoni memiliki efek farmakologis antipiretik, antijamur, menurunkan tekanan darah tinggi (hipertensi), menurunkan kadar gula darah, meningkatkan nafsu makan, menyembuhkan rematik, menurunkan demam, menyembuhkan masuk angin dan eksim (Hariana, 2007). Menurut Dutta, dkk (2011), tanaman yang mengandung tetranorterprenoids atau limonoid ini memiliki efek hipoglikemia yang terkandung dalam ekstrak biji mahoni. Ekstrak tersebut dapat juga mengurangi jumlah kolesterol pada level serum sekitar 18,56% dan trigliserid sekitar 10,41% serta meningkatkan pengurangan glikogen pada level liver.

Berdasarkan uraian tersebut, peneliti tertarik untuk mengetahui aktivitas SOD sebagai pengontrol radikal bebas dan ekspresi E-kaderin pada histologi ginjal tikus yang terpapar MLD-STZ dengan terapi ekstrak biji mahoni

2.1 Rumusan Masalah

Penelitian ini akan membahas tentang:

1. Apakah terjadi peningkatan aktivitas SOD (superoksida dismutase) setelah diberi terapi ekstrak metanol biji mahoni dengan dosis 100, 250 dan 400 mg/KgBB pada tikus putih pasca induksi MLD-STZ?
2. Apakah terjadi peningkatan ekspresi E-kaderin pada histologi ginjal setelah diberi terapi ekstrak metanol biji

mahoni dengan dosis 100, 250 dan 400 mg/KgBB pada tikus putih pasca induksi MLD-STZ?

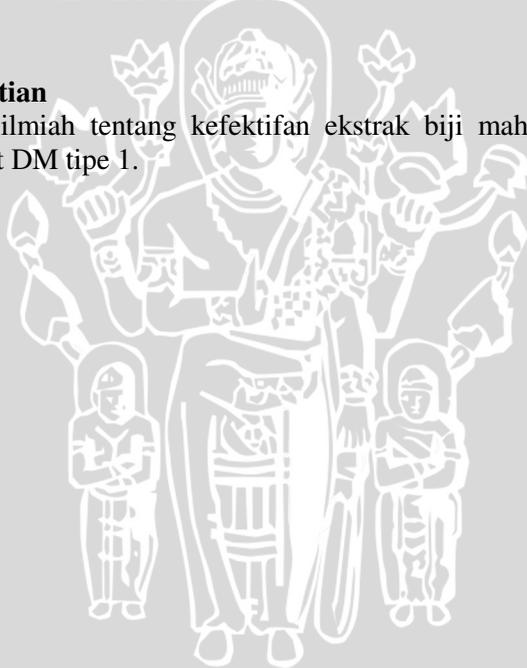
3.1 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui adanya peningkatan aktivitas SOD (superoksida dismutase) setelah diberi terapi ekstrak metanol biji mahoni dengan dosis 100; 250 dan 400 mg/KgBB pada tikus yang pasca induksi MLD-STZ.
2. Untuk mengetahui adanya peningkatan ekspresi E-kaderin pada histologi ginjal setelah diberi terapi ekstrak metanol biji mahoni dengan dosis 100, 250 dan 400 mg/KgBB pada tikus putih pasca induksi MLD-STZ.

4.1 Manfaat Penelitian

Sebagai kajian ilmiah tentang keefektifan ekstrak biji mahoni sebagai obat penyakit DM tipe 1.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

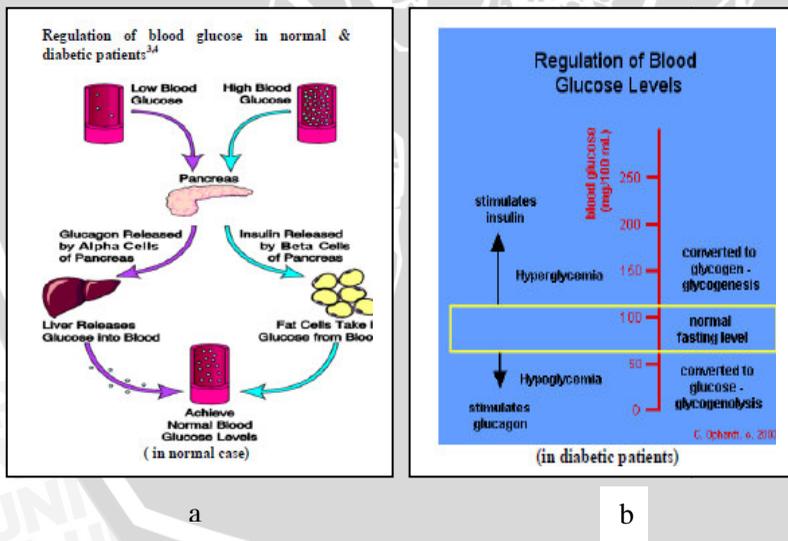
2.1 Diabetes Mellitus (DM)

Diabetes mellitus sering kali disebut sebagai sindrom yang menyerang pengaturan metabolisme, biasanya karena adanya kombinasi penyebab keturunan dan faktor lingkungan, sehingga terjadi keabnormalan kadar gula yang tinggi (hiperglikemia). Gejala umum dari penyakit ini adalah: banyak mengeluarkan air seni ketika buang air kecil (poliuria), seringnya haus sehingga banyak minum (polidipsia), sering lapar (polifagia), letih dan lesu, penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan sebabnya, lemah badan, sering kesemutan, gata-gatal, pandangan kabur, disfungsi ereksi pada pria dan pruritus vulvae pada wanita (Dutta, dkk., 2011).

Penyebab penyakit DM sangat bervariasi, mulai dari faktor lingkungan sampai faktor genetik. Biasanya penyakit ini disebabkan karena ketidakcukupan produksi insulin, kecacatan dalam produksi insulin, ataupun kemampuan sel untuk menggunakan insulin dengan baik dan efisien yang mengarah pada hiperglikemia dan diabetes. Kondisi ini mempunyai efek untuk kebanyakan sel otot dan jaringan lemak dan menghasilkan kondisi yang dikenal dengan “resistensi insulin” (Gupta & De, 2012).

Penyakit DM yang dikarenakan faktor lingkungan disebabkan karena pola makan yang tidak teratur dan makan makanan yang banyak mengandung glukosa. Glukosa adalah gula sederhana yang ditemukan di makanan. Glukosa merupakan nutrisi esensial yang menyediakan energi untuk fungsi sel tubuh. Karbohidrat dicerna menjadi molekul sederhana dan glukosa dari makanan yang dicerna kemudian diserap oleh sel-sel pencernaan ke dalam aliran darah, dan dibawa oleh aliran darah untuk disebarkan ke semua sel tubuh sesuai dengan sel yang membutuhkannya. Bagaimanapun, glukosa tidak dapat masuk ke sel sendirian. Glukosa tersebut membutuhkan insulin untuk membantu transportnya ke dalam sel. Tanpa insulin, sel menjadi kekurangan energi glukosa, selain itu glukosa akan menumpuk dan melimpah di aliran darah. Pada tipe DM tertentu, sel tidak mampu untuk menggunakan glukosa sehingga memberikan situasi yang kronis akibat kekurangan glukosa tersebut. Glukosa yang melimpah dan tidak digunakan tersebut akan disekresikan di urin (Gupta & De, 2012).

Insulin adalah hormon yang diproduksi oleh sel β pankreas. Selain membantu glukosa masuk ke dalam sel, insulin juga penting dalam regulasi kadar gula dalam darah. Setelah makan, kadar glukosa darah meningkat sehingga glukosa harus diregulasi agar tidak terjadi peningkatan glukosa dalam darah dan mengakibatkan penyakit hiperglikemia. Dalam respon adanya peningkatan gula darah, pankreas secara normal mengeluarkan insulin yang lebih dalam aliran darah dan membantu glukosa masuk ke sel dan mengakibatkan kadar gula menurun setelah makan. Ketika kadar gula darah menurun, insulin yang dikeluarkan oleh pankreas akan dihentikan, hal ini sangat penting bahkan dalam level puasa terdapat pengeluaran kadar insulin dengan tingkat rendah yang harus tetap stabil dibandingkan dengan perubahan sedikit demi sedikit dan membantu pengaturan kadar glukosa dalam darah stabil selama berpuasa. Pada individu yang normal, sistem regulasi membantu kadar gula darah tetap terkontrol. Secara garis besar, pasien yang mengalami diabetes mengalami kekurangan insulin sehingga tidak memenuhi kebutuhan tubuh atau tubuh tidak akan berfungsi dengan baik dan menimbulkan suatu penyakit. Dari semua faktor tersebut, secara garis besar, penyakit DM berhubungan dengan kadar gula darah yang berlebihan (Gupta & De, 2012).



Gambar 2.1. Regulasi kadar gula darah: (a) kasus normal, (b) kasus pasien diabetes (Gupta & De, 2012).

2.1.1 Pengelompokan Diabetes Mellitus (DM)

Menurut ADA (2003), DM diklasifikasikan berdasarkan etiologinya menjadi:

1. Diabetes Mellitus Tipe 1
Destruksi sel β pankreas umumnya menjurus ke arah defisiensi insulin absolut.
 - A. Melalui proses imunologik (Otoimunologik)
 - B. Idiopatik
2. Diabetes Mellitus Tipe 2
Penyebabnya bervariasi, mulai dari predominan resistensi insulin disertai defisiensi insulin relatif sampai yang predominan gangguan sekresi insulin bersama resistensi insulin.
3. Diabetes Mellitus Tipe Lain
 - A. Defek genetik fungsi sel β :
 - Kromosom 12, HNF-1 α (MODY 3)
 - Kromosom 7, glukokinase (MODY2)
 - Kromosom 20, HNF-4 α (MODY 1)
 - DNA mitokondria
 - B. Defek genetik kerja insulin
 - C. Penyakit eksokrin pankreas:
 - Pankreatitis
 - Trauma/Pankreatokmi
 - Neoplasma
 - *Cistic Fibrosis*
 - Hemokromatosis
 - Pankreatopati fibro kalkulus
 - D. Endokrinopati:
 - Akromegali
 - Sindroma *Cushing*
 - Feokromositoma
 - Hipertiroidisme
 - E. Diabetes karena obat/zat kimia: Glukortikoid, hormon tiroid, asam nikotina, pentamidin, vacor, tiazid, dilantin, interferon.
 - F. Diabetes karena infeksi
 - G. Diabetes imunologi (jarang sekali terjadi)
 - H. Sindroma genetik lain: Sindroma *Down*, *Kinefelter*, *Turner*, *Huntington*, *Chorea*, *Prader Willi*

4. Diabetes Mellitus Gestasional
Diabetes yang muncul pada masa kehamilan, umumnya bersifat sementara, tetapi merupakan faktor resiko untuk DM Tipe 2.
5. Pra-Diabetes
 - A. *IFG (Impaired Fasting Glucose)* = GPT (Glukosa Puasa Terganggu)
 - B. *IGT (Impaired Glucose Tolerance)* = TGT (Toleransi Glukosa Terganggu)

2.1.2 Diabetes Mellitus Tipe 1 dan Patogenesisnya

Diabetes mellitus tipe 1 adalah penyakit gangguan katabolik yang terjadi karena sirkulasi insulin sangat rendah atau hampir tidak ada, plasma glukagon tinggi, dan sel β pankreas gagal merespon ke semua rangsangan sekresi insulin. Pankreas menunjukkan infiltrasi limfotik dan destruksi sel yang mensekresi insulin dari Islet Langerhans, yang menyebabkan produksi insulin berkurang. Pasien membutuhkan insulin secara eksogenus untuk mengembalikan kondisi katabolis ini, mencegah ketosis, penurunan hiperglukagokemia, dan menormalkan metabolisme lipid dan protein (Gupta & De, 2012).

Salah satu teori berdasarkan etiologi dari DM Tipe 1 adalah hasil dari kerusakan sel β pankreas dari agen infeksi atau agen lingkungan. Individu yang secara genetik rentan, sistem imun tubuh memicu untuk mengembangkan respon autoimun terhadap antigen dengan mengubah sel β pankreas atau molekul dalam sel-sel β pankreas menyerupai protein virus. Sekitar 85% dari pasien DM Tipe 1 telah mensirkulasi antibodi sel islet dan juga sebagian besar memiliki antibodi anti-insulin yang terdeteksi sebelum menerima terapi insulin. Kebanyakan antibodi sel islet secara langsung melawan Asam Glutamat Karboksilat (GAD) dalam sel β pankreas (Gupta & De, 2012).

Saat ini, autoimunitas dianggap sebagai faktor utama dalam patofisiologi DM Tipe 1. Prevalensi meningkat pada pasien dengan penyakit autoimun lainnya, seperti penyakit Graves, tiroiditis Hashimoto dan penyakit Addison. Sekitar 95% dari pasien dengan DM Tipe 1 memiliki baik antigen leukosit manusia (HLA)-DR3 atau HLA-DR4. HLA-DQ8 dianggap penanda spesifik kerentanan DM Tipe 1 (Gupta & De, 2012).

2.2 Mahoni (*Swietenia mahagoni*)

2.2.1 Morfologi dan Kandungan Kimia

Mahoni merupakan jenis tumbuhan yang tumbuh pada zona lembab. Sifat ekologis yang membedakan dari *Swietenia macrophylla* adalah *S. mahagoni* ini memiliki kemampuan untuk bertahan hidup di tempat yang kering. Jenis ini secara alami dapat dijumpai pada iklim dengan curah hujan tahunan 500 – 800 mm. Hasil pertamanya lebih rendah dibanding *S. macrophylla* tetapi pada lahan yang kering dapat tumbuh sangat baik dan kualitas kayunya pun lebih baik.



Gambar 2.2. Biji mahoni (*Swietenia mahagoni*) (Sahgal, dkk., 2009).

Tumbuhan ini berupa pohon yang dapat mencapai 30 – 35 m. Berkulit abu-abu dan berstektur halus ketika masih muda. Ketika sudah tua kulit pohonnya berubah warna menjadi coklat tua. Buah tumbuhan ini berstektur keras dengan panjang 5 – 10 cm, diameter 3 – 6 cm dan umumnya terdapat lima ruang dengan kapsul yang kering. Kulit buahnya tebal sekitar 4 – 5 cm dan kulit dalamnya tipis. Biji tumbuhan ini berwarna coklat dan panjangnya sekitar 4 – 5 cm. Kotiledon berada pada dua pertiga panjang sisi benih. Benih dapat tersebar melalui angin. Terdapat 3.350 – 3500 benih/kg (Sahgal, dkk., 2009).

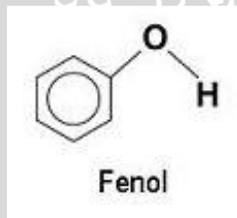
2.2.2 Kegunaan dan Aktivitas Biologi

S. mahagoni merupakan salah satu tumbuhan yang memiliki banyak manfaat dari famili Meliaceae. Tanaman ini memiliki berbagai manfaat seperti efek anti malaria dan

antifungal. Limonoid yang terkandung dari tumbuhan ini memiliki manfaat antifungal. Laporan sebelumnya telah menunjukkan bahwa diantara familinya, *S. mahagoni* memiliki aktivitas antidiabetes paling signifikan di antara *Catharanthus roseus* (Nayantara), *Azadirachta indica* (Neem), dan *Allium sativa* (bawang putih) dan mendukung penggunaan obat herbal penggunaan obat herbal tradisional oleh dokter untuk terapi diabetes.

Biji mahoni merupakan herbal yang sering digunakan sebagai obat untuk penyembuhan penyakit diabetes mellitus yang sering dilakukan oleh rakyat Indonesia. Biji mahoni ini memiliki kandungan antioksidan sebagai anti-hiperglikemi. Kandungan antioksidan yang dimiliki oleh ekstrak metanol biji mahoni adalah senyawa *phenolic*. Menurut (Sahgal, dkk.,2009), ekstrak metanol biji mahoni memiliki aktivitas antioksidan sebesar 23.39% dengan nilai IC(50) dari 2,3 mg/ml dalam metode DPPH *radical scavenging*, 47.2% pada uji XO1, 49,5% dengan metode HSPA, dan 0.728 mmol/Fe(II)g dengan metode FRAP pada konsentrasi yang diujikan. Jumlah total *phenolic* dan *flavonoid* adalah 70,83 mg setara asam galat (GAE) dan 2,5 ± 0,15 mg setara *cathechin* masing-masing per gram ekstrak kering.

Senyawa fenol berperan penting dalam potensi antioksidan dari makanan atau sebagai sumber antioksidan alami. Fenol merupakan kandungan tanaman yang sangat penting karena kemampuannya sebagai *scavenging* karena bersifat redoks, pendonor hydrogen dan *singlet oxygen quenchers* (Hajra, dkk., 2013). Senyawa fenol adalah senyawa yang bersifat polar sehingga metanol merupakan pelarut yang paling baik dalam mengekstrak senyawa tersebut (Eskin, dkk., 2001).



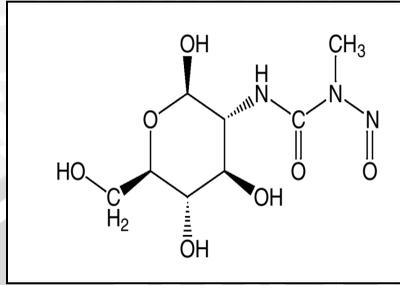
Gambar 4.1 Struktur dasar senyawa fenolik (Hajra, dkk., 2013).

Senyawa fenol yang terkandung dalam ekstrak biji mahoni dapat menjadi penghambat, mengakhiri rantai reaksi radikal bebas dan bertindak sebagai agen pereduksi. Ekstrak metanol biji mahoni menunjukkan aktivitas antioksidan dengan penghambatan DPPH, radikal hidroksil, oksida nitrat dan aktivitas *scavenging* oksida atau ferrit oksida bila dibandingkan dengan standar *Butylated hydroxyl anisole* (BHA). Ekstrak biji mahoni juga memiliki aktivitas penghambatan pada konsentrasi tertentu. Antioksidan dan antidiabetes ditemukan pada percobaan *in vitro* yang menunjukkan adanya potensi manfaat kesehatan (Hajra, dkk., 2011).

Banyak manfaat dari senyawa fenolik ini, salah satunya adalah sebagai antioksidan karena memiliki kemampuan sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengikat logam, atau pengubah oksigen singlet menjadi bentuk triplet (Croft, 1999; Estiasih & Andiyas, 2006). Senyawa fenol ini memiliki senyawa organik yang memiliki satu cincin aromatik dengan satu gugus hidroksil. Kemampuannya sebagai antioksidan dikarenakan senyawa fenol ini dapat menstabilkan radikal bebas dengan memberikan atom hidrogen secara cepat dengan radikal bebas (Katambali, dkk., 2002).

2.3 Agen Diabetogenik Streptozotocin (STZ)

Streptozotocin memiliki rumus kimia (2-deoxy-2(3-methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose) disintesis oleh *Streptomyces archohomogenes* dan sering digunakan sebagai induksi anti *insulin-dependent* dan *non-insulin-dependent diabetes mellitus* (IDDM dan NIDDM) pada hewan uji karena selektif merusak sel β pankreas, dengan aksi sitotoksiknya dimediasi oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga dapat digunakan sebagai induksi DM. STZ masuk ke sel β pankreas melalui *glucose transporter* (GLUT2) dan akan menyebabkan alkilasi DNA. Alkilasi tersebut akan menyebabkan fragmentasi DNA (Elsner, dkk., 2000). Protein *glycosiation* diduga sebagai faktor kerusakan yang utama.



Gambar 2.3. Struktur kimia *Streptozotocin* (Elsner, dkk., 2000).

2.4 Radikal Bebas dan Antioksidan

2.4.1 Radikal Bebas

Radikal bebas ialah atom atau gugus apapun yang memiliki satu atau lebih elektron tak berpasangan. Unsur seperti misalnya atom halogen dan logam alkali adalah radikal bebas karena mempunyai jumlah elektron yang ganjil. Molekul oksigen mengandung jumlah elektron yang genap, tetapi tidak semua elektronnya berpasangan. Sepuluh dari elektron valensinya membentuk lima pasangan, tetapi dua elektron sisanya mempunyai spin yang identik. Keadaan yang tidak biasa ini menyebabkan oksigen mempunyai ciri keaktifan yang menarik. Oksigen biasanya digolongkan sebagai suatu diradikal (Pine, dkk., 1988).

2.4.2 Peran Radikal Bebas dalam Patogenesis Diabetes Mellitus

Keseimbangan antara laju radikal bebas dan eliminasi adalah hal yang penting. Kelebihan radikal bebas pada sel dapat berbahaya. Bagaimanapun, jika terdapat peningkatan yang signifikan pada radikal bebas atau penurunan pada eliminasi radikal bebas dari sel, stres oksidatif kemudian akan terjadi. Terdapat suatu penelitian dan bukti klinis yang menyakinkan bahwa terjadi peningkatan ROS pada kedua tipe diabetes yang kaitannya sangat erat dengan stres oksidatif.

Stres oksidatif menghasilkan peningkatan ROS dan/atau RNS (*Reactive Nitrogen Species*). Sumber stres oksidatif yang memungkinkan pada diabetes termasuk dalam glukosa auto-oksidan, peralihan pada keseimbangan redoks, penurunan

konsentrasi jaringan dari berat molekul antioksidan yang rendah, seperti pengurangan glutathionin (GSH) dan vitamin E, dan aktivitas antioksidan yang tidak berpasangan melawan enzim seperti superoksida dismutase (SOD) dan katalisis (CAT). ROS dihasilkan melalui kadar glukosa yang tinggi biasanya berkaitan dengan glukosa dan abnormalitas metabolik lainnya untuk perkembangan komplikasi diabetes (Kowluru, dkk., 2007).

Mekanisme stres oksidatif pada diabetes timbul dari berbagai mekanisme seperti kelebihan produksi radikal bebas oksigen dari auto-oksidasi glukosa, protein terglukosilasi, glikasi enzim oksidatif, dimana kapasitasnya yang terbatas untuk detoksifikasi radikal oksigen. Sebagai tambahan untuk mekanisme ini, dua mekanisme lainnya telah disarankan sebagai respon untuk penambahan radikal oksigen pada diabetes. Pertama, level glukosa yang tinggi dapat menstimuli aktivitas sitokrom seperti p450 melalui kelebihan *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase* (NADPH) diproduksi melalui metabolisme glukosa. Kedua, ketosis dapat meningkatkan produksi radikal bebas oksigen pada pasien diabetes (Matough, dkk., 2012).

2.4.3 Antioksidan

Senyawa yang dapat melawan radikal bebas adalah antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang melindungi sel dari efek kerusakan yang ditimbulkan oleh ROS (*Reactive Oxygen Species*), seperti singlet oksigen superoksida, peroksil radikal, hidroksil radikal, dan peroksinitrin. Ketidakkeseimbangan antara antioksidan dan ROS hasil stres oksidasi, menyebabkan kerusakan sel. Stres oksidasi dapat mengakibatkan kanker, penuaan, arteriosklerosis, kerusakan ischemic, inflamasi dan penyakit degeneratif syarat (Parkinson dan Alzheimer).

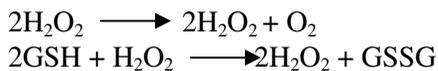
Antioksidan diklasifikasikan ke dalam dua kelompok besar tergantung kelarutannya dalam air (hidrofilik) atau kelarutannya pada lemak (hidrofobik). Umumnya antioksidan yang larut dalam air bereaksi dengan oksidan pada sitosol sel dan plasma darah, sedangkan antioksidan yang larut dalam lipid melindungi membran sel dari lipid peroksidasi. Senyawa ini dapat disintesis di dalam tubuh atau dapat diperoleh dari

makanan. Ada beberapa senyawa yang berkontribusi untuk mempertahankan antioksidan melalui logam transisi dan mencegahnya dalam katalis agen produksi radikal bebas di sel. Antioksidan yang mereduksi agen dapat juga bertindak sebagai pro-oksidan. Seperti vitamin C yang memiliki aktivitas antioksidan ketika mereduksi senyawa oksidasi seperti hidrogen peroksida. Antioksidan juga dapat secara luas digunakan sebagai bahan baku untuk suplemen makanan. Dengan harapan untuk menjaga kesehatan dan mencegah penyakit seperti kanker dan penyakit jantung koroner. Peran antioksidan fokus pada pencegahan oksidan lemak tak jenuh yang menyebabkan bau tengik. Aktivitas antioksidan dapat diukur secara sederhana dengan menempatkan lemak di dekat wadah dengan oksigen dan mengukur laju konsumsi oksigen. Identifikasi vitamin A, Vitamin C dan Vitamin E sebagai antioksidan ini merevolusi dan mengakibatkan realisasi dari antioksidan penting pada aktivitas biokimia makhluk hidup (Dutta, dkk., 2011).

2.5 Superoksida Dismutase (SOD)

Superoksida dismutase merupakan antioksidan enzimatis yang digunakan sebagai pertahanan melawan radikal bebas yang bekerja sama dengan glutathion peroksidase dan katalase (Valko, dkk., 2007). Aktivitas superoksida dikontrol oleh enzim superoksida dismutase. SOD (superoksida dismutase) merupakan antioksidan enzimatis yang berperan pada proses degradasi radikal bebas jenis superoksida.

SOD mengkatalisis reaksi reduksi anion superoksida (O_2^-) menjadi oksigen dan hidrogen peroksida (H_2O_2). H_2O_2 yang terakumulasi menyebabkan superoksida dismutase inaktif karena itu enzim superoksida dismutase bekerja sama dengan enzim-enzim yang dapat mendegradasi H_2O_2 yaitu katalase dan glutathion peroksidase. Katalase mengubah H_2O_2 menjadi O_2 glutathion peroksidase yang akan menghilangkan H_2O_2 dengan menggunakan H_2O_2 untuk mengoksidasi glutathion (GSH) menjadi glutathion disulfida (GSSG) (Halliwell & Gutteridge, 1999).

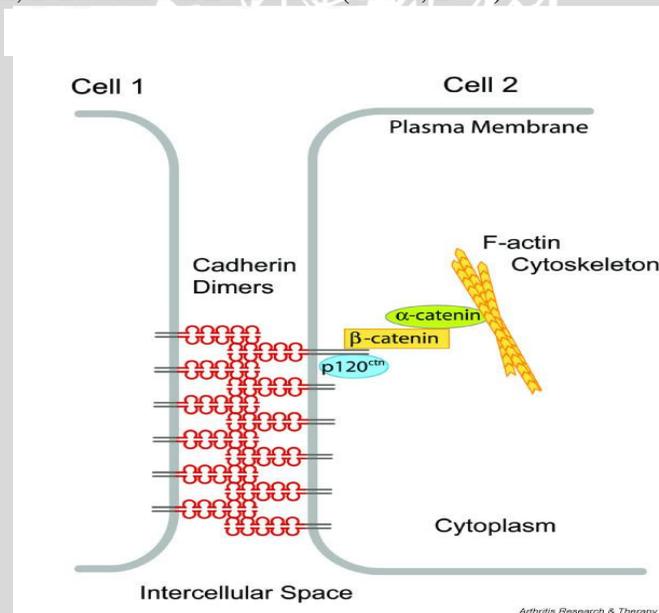


Ada 3 tipe utama SOD, bergantung pada kofaktor logam, yaitu CuZnSOD yang mengikat logam tembaga dan seng, tipe FeSOD dan MnSOD yang mengikat logam besi dan mangan, dan tipe Ni-SOD

yang mengikat logam Ni. Tipe CuZnSOD berada dalam sitosol sedangkan MnSOD terdapat dalam mitokondria (Halliwell & Gutteridge, 1999).

2.6 E-caderin

Kaderin merupakan kelompok protein sel adhesi *calcium-dependent* dengan dirinya sendiri secara homofilik dengan menghubungkan protein tersebut ke sel yang lain sehingga kaderin mampu berkontribusi untuk menyortir jenis sel yang heterogen. Kaderin ditemukan secara luas di permukaan sel. Bentuk struktur protein kaderin umumnya dimer dengan bagian ekstrasel merupakan struktur tandem berulang 5. Bagian intrasel berikatan dengan protein sitoplasmik. Bagian *catenin* berikatan dengan aktin sitoskeleton. Adapun jenis kaderin yang berinteraksi dengan sitoskeleton, yaitu N-kaderin, P-kaderin, R-kaderin, B-kaderin dan E-caderin (Aresu, 2008).



Gambar 2.4. Karakteristik protein E-kaderin (Wicki, 2008).

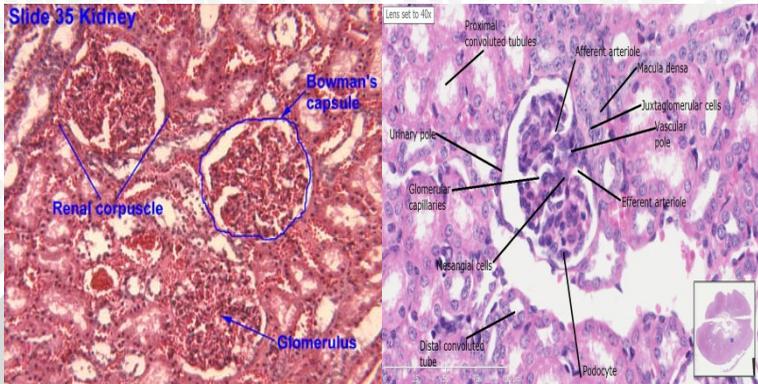
Kelompok E-kaderin merupakan kaderin yang terdapat pada epitel dan menjadi penyusun dasar dari epitel. E-kaderin terletak di membran lateral yang merupakan bagian diferensiasi dari epithelia.

Wilayah ekstraseluler E-kaderin terdiri dari lima domain protein kaderin, yaitu CAD yang bersifat *highly conserved*. CAD tersebut tergabung dengan ion kalsium untuk membentuk struktur batang. Domain CAD yang terluar mengandung motif conserved his-Ala-Val (HAV) yang berfungsi untuk mengikat *homotypic* pada trans molekul E-kaderin pada permukaan sel yang berdekatan. Dimerisasi molekul E-kaderin dimediasi oleh lima domain transmembran. Pada proses pembokoran E-kaderin terjadi penipisan ion kalsium yang dimediasi oleh struktur perekat dan hilangnya sel-sel adhesi. Interaksi domain sitoplasma dengan catenins penting untuk adhesi E-kaderin yang dimediasi oleh β -catenin dan γ -catenin atau plakoglobin yang terkait langsung dengan domain sitoplasmik E-kaderin. Interaksi tersebut kemudian mengikat α -catenin yang menghubungkan antara kompleks kaderin cytoplasma dengan sitoskeleton aktin. P120 catenin sebuah catenin tambahan diidentifikasi sebagai substrat tiroso kinase non reseptor pp60c-src dan mengikat pada bagian juxtramembrane (JM) pada ekor sitoplasma kaderin. Tergantung pada jenis sel, jenis catenin P120 telah ditemukan sebagai pengatur kekuatan adhesi sel (Wicki, 2008).

2.7 Ginjal

2.7.1. Histologi Ginjal

Ginjal merupakan sistem urin yang selain berfungsi sebagai alat ekskresi juga berperan menghasilkan hormone seperti: *rennin-angiotensin*, *erythropoietin* dan mengubah provitamin D menjadi bentuk aktif (Vit. D). Kerja ginjal adalah menyaring plasma dan unsur-unsur plasma dari darah kemudian menyerap air dan unsur-unsur yang masih berguna kembali secara selektif dari filtrat, yang akhirnya mengeluarkan kelebihan dan produk buangan plasma. (Frandsen, 1992).



a

b

Gambar 2.5 Struktur histologi ginjal (a) keseluruhan, (b) glomerulus (Anonim, 2001).

Secara makroskopis, sebuah ginjal dengan potongan memanjang memberi dua gambaran yang cukup jelas. Pada gambaran histologi, ginjal tersusun atas tiga unsur utama, yaitu: (a) Glomerulus, suatu gelung pembuluh darah kapiler yang masuk melalui arteri aferen; (b) Tubuli sebagai parenkim yang bersama glomerulus membentuk nefron yaitu satu unit fungsional terkecil dari ginjal; dan (c) Interstisium, yaitu pembuluh-pembuluh darah, limfe dan syaraf (Junquera, 1998.)

2.8 Kerangka Konsep

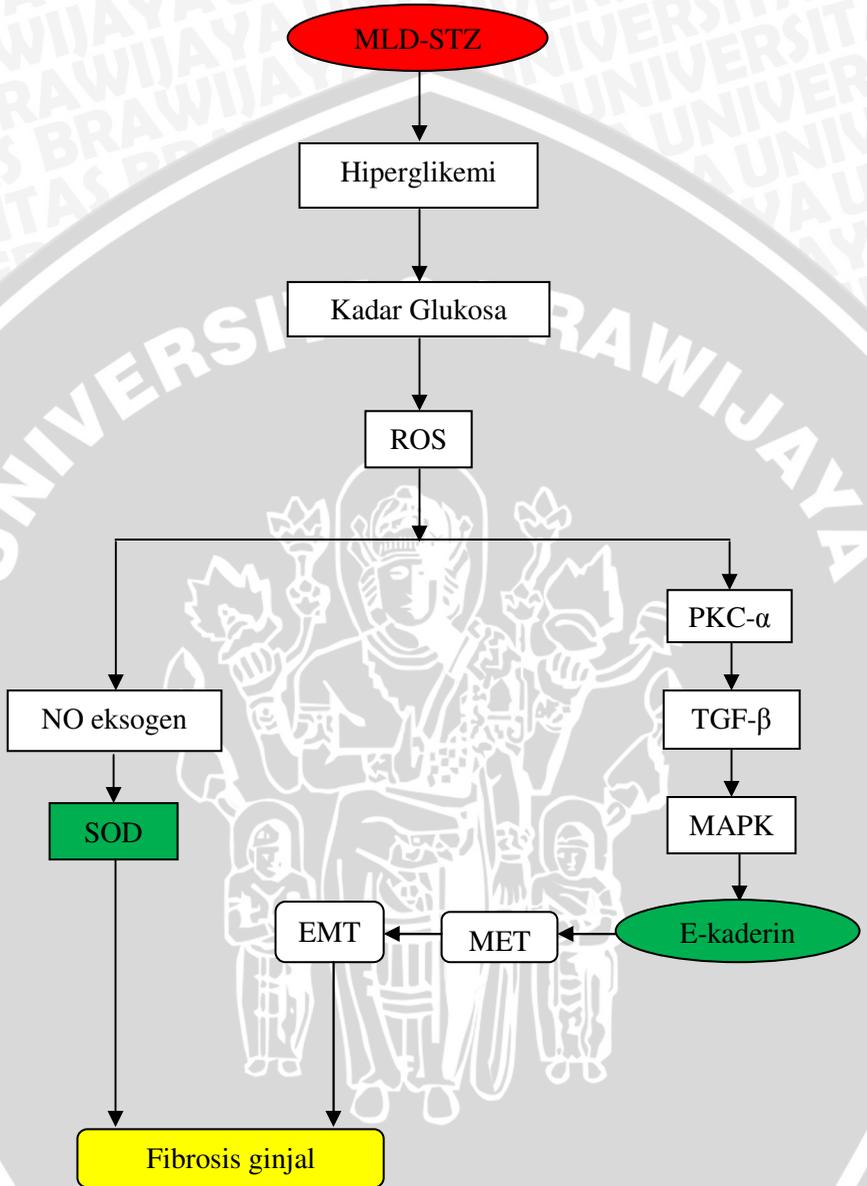
Streptozotocin (STZ) merupakan agen diabetogenik baik IDDM maupun NIDDM yang umum digunakan agar suatu spesies menderita penyakit diabetes mellitus. Streptozotocin (STZ) memiliki struktur yang analog dengan glukosa sehingga mampu menembus membran dan masuk ke sel melalui GLUT2. Senyawa tersebut akan mengalkalisi gen sehingga sel β pankreas tidak mengekspresikan insulin. Keadaan tersebut akan meningkatkan kadar glukosa dalam darah karena insulin tidak mengaktivasi enzim *hexokinase IV* yang merupakan substrat dari GLUT 2 yang terdapat pada sel β pankreas sehingga GLUT 2 tidak akan mengangkut glukosa ke dalam sel dan mengakibatkan keadaan hiperglikemi. Oleh karena itu, STZ sering

digunakan dalam penelitian sebagai induksi untuk penyakit diabetes mellitus.

Keadaan hiperglikemi akan menyebabkan ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) meningkat dalam tubuh. Ketika ROS meningkat, maka antioksidan alami dalam tubuh, yaitu SOD (superoksida dismutase) sebagai antioksidan enzimatis akan mengontrol peningkatan ROS dalam tubuh dengan mengubah reaksi reduksi anion superoksida (O_2^-) menjadi oksigen dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Menurut beberapa penelitian, dilaporkan bahwa penderita penyakit diabetes mellitus memiliki aktivitas SOD yang rendah dibandingkan dengan kelompok normal (Seven, dkk., 2004).

Keadaan ROS yang tinggi dalam tubuh akan memicu aktifitas TGF β 1 sehingga akan terjadi fibrosis dan penyakit ginjal lainnya karena TGF β 1 berepran sebagai proinflamatori dan profibrotik. Selain itu, TGF β 1 juga akan mengaktifkan *epithel mesenchymal transition* (EMT) dan apoptosis. Ketika EMT terjadi, maka fibroblast akan aktif dengan ditandai antara lain menurunnya e-kaderin serta meningkatnya marker molekul *fibroblas spesifik protein 1* (FSP-1). TGF- β 1 akan merangsang mRNA gen E2A sehingga dapat menekan ekspresi e-kaderin. E-kaderin merupakan protein yang berperan sebagai rekonstruksi dan penyeimbang antar sel. Interaksi antar sel pada permukaan sel epitel diperankan oleh protein Kaderin dengan ikatan yang tidak terlalu kuat. Jika aktivitas TGF- β 1 tidak terkontrol, maka matrik ekstra sel meluas.

Aktivasi TGF- β 1 akan mengakibatkan aktivasi jalur Smad dan merangsang fosforilasi Smad2 dan Smad3. Smad2 dan Smad3 akan berikatan dengan Smad4 sehingga TGF- β 1 dapat masuk ke dalam sel. Di dalam nukleus, sitokin akan mengaktifasi atau menghambat transkripsi gen. ketika gen teraktivasi, maka MAPK maupun ERK akan memfasilitasi terbentuknya fibrosis ginjal.



Keterangan:

Warna  merupakan *marker* dari progresifitas penyakit diabetes mellitus akibat induksi MLD-STZ yang akan dianalisis.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan Mei – Februari 2013 bertempat di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Konsep Penelitian

3.3 Cara Kerja

3.3.1 Pembuatan Ekstrak Biji Mahoni (*Swietenia mahagoni*)

Pembuatan ekstrak biji mahoni dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol 96%. Biji yang digunakan dijadikan serbuk kemudian dimasukkan ke dalam botol yang berwarna gelap dan ditambahkan metanol 96%, kemudian ditutup dan dibiarkan selama dua hari dengan terlindung dari cahaya. Setelah itu disaring hingga maserat didapatkan. Kemudian ampas yang diperoleh dari maserasi pertama tersebut dimaserasi kembali sampai diperoleh hasil maserat yang jernih. Semua maserat metanol digabungkan dan diuapkan menggunakan evaporator pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ sampai diperoleh ekstrak metanol kental. Ekstrak tersebut kemudian dikeringkan dengan menggunakan *frezer dryer*.

3.3.2 Persiapan Hewan Coba

Tikus yang digunakan adalah jenis tikus putih (*Rattus novergicus*) strain wistar jantan dengan berat 100-130 g dan berumur 2 bulan. Jumlah keseluruhan yang digunakan 20 ekor dengan masing-masing 4 ekor kelompok negatif, 4 ekor kelompok DM tanpa terapi (kontrol positif), 12 ekor kelompok tikus DM dengan terapi 100, 250 dan 400 mg/KgBB. Sebelum dilakukan perlakuan, tikus dipelihara terlebih dahulu kurang lebih 15 hari untuk penyesuaian lingkungan.

3.3.3 Pembuatan Larutan *Streptozotocin* (STZ) dan Injeksi Intra peritoneal

STZ 100 mg dilarutkan pada 3 ml buffer sitrat dengan pH 4,5 kemudian dilakukan homogenasi dengan vortex. Larutan STZ tersebut digunakan dalam pembuatan tikus DM, diambil dari stok untuk injeksi dengan dosis yang volume

pengambilannya disesuaikan dengan berat tikus. Larutan tersebut disimpan dalam suhu 4°C sampai digunakan kembali.

STZ yang digunakan dalam pembuatan tikus DM, diambil dari stok. Volume yang diambil dari stok tersebut disesuaikan dengan berat badan tikus dengan injeksi intraperitoneal. Dosis yang digunakan sebanyak 20 mg/KgBB sebanyak 5 kali yang dilakukan berturut-turut (Aulanni'am, 2011). Untuk injeksi intraperitoneal dilakukan dengan memposisikan tikus menghadap ke arah frontal hingga terlihat bagian abdomennya. Pada bagian atas abdomen tikus, disemprotkan etanol 70%, kemudian kulit abdomen dicubit hingga terasa bagian ototnya. Spuit dimasukkan ke dalam abdomen lalu digerakkan spuitnya. Apabila terasa berat, maka sudah masuk ke bagian intraperitoneal. Setelah itu STZ disuntikkan secara perlahan-lahan sampai larutan yang berada dalam spuit habis. Setelah itu, abdomen tikus disemprot dengan etanol 70% kembali.

Tikus yang telah diinjeksi dengan STZ diinkubasi selama 7 – 14 hari. Selama masa inkubasi, tikus dipantau kadar glukosa darahnya dengan menggunakan glukometer untuk mengetahui kondisi tikus diabetes. Tikus sudah menderita DM apabila kadar glukosa darahnya mencapai ≥ 250 mg/dL < 350 mg/dL dan siap digunakan sebagai penelitian.

3.3.4 Terapi Tikus Diabetes dengan Ekstrak Biji Mahoni (*Swietenia mahagoni*)

Tikus dikelompokkan dalam 5 kelompok yang masing-masing terdiri 4 ekor kelompok negatif, 4 ekor kelompok tikus DM tanpa terapi (kontrol positif), 12 ekor kelompok tikus DM dengan terapi 100, 250 dan 400 mg/KgBB. Untuk kelompok tikus DM yang diterapi, terapi dilakukan selama 7 hari dan diinkubasi selama 14 hari.

3.3.5 Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan setelah diberikan pelakuan dengan mengambil darah dari ekor tikus yang selanjutnya kadar glukosa darah diperiksa dengan glukometer.

3.3.6 Isolasi Serum

Darah diambil melalui ekor sebanyak 1 ml dan ditempatkan pada mikrotube. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 3 – 5 jam dalam keadaan miring. Kemudian jika sudah terbentuk endapan, serum diambil dan ditempatkan di mikrotube baru. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 g selama 15 menit dalam suhu ruang. Jika tidak terjadi endapan, darah langsung disentrifus dengan kecepatan dan waktu yang sama untuk mendapatkan serum. Kemudian supernatan diambil dan peletnya dibuang. Supernatan tersebut berisi serum yang akan digunakan untuk uji selanjutnya.

3.3.7 Pengambilan Organ Ginjal

Untuk isolasi organ, tikus dibunuh dengan dislokasi leher. Setelah tikus mati, tikus diletakkan pada nampan bedah dan diletakkan pada posisi vental di atas. Pankreas yang terletak pada daerah hulu lambung dan di antara usus halus diambil, kemudian diambil dan dicuci dengan NaCl 0,9% dan direndam dalam PBS selama 5 menit, selanjutnya organ pankreas direndam dalam PFA 4% selama 7 hari.

3.3.8 Penentuan Aktivitas SOD (Superoksida dismutase)

Penentuan aktivitas SOD dilakukan menggunakan kit SOD (Cat. K335-100, Biovision). Satu sampel mempunyai 3 larutan blanko (seperti pada Tabel 4.1). sampel serum dimasukkan ke dalam sumuran sampel dan blanko 2 sebanyak 20 μ l, pada sumuran blanko 1 dan 3 dimasukkan sebanyak 20 μ l aquades. *Working solution* pada setiap sumuran diberi sebanyak 200 μ l, selanjutnya pada sumuran blanko 2 dan 3 diberi *dilution buffer* sebanyak 20 μ l. Kemudian pada setiap sumuran diberi 20 μ l larutan enzim dan dihomogenasi dengan meletaakkan *mikroplate* yang telah ditutup *aluminium foil* di atas *shaker*. Kemudian *mikroplate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Lalu *mikroplate* diukur pada panjang gelombang 450 nm.

Tabel 3.1 Jumlah larutan yang ditambahkan pada sampel, blanko 1, blanko 2 dan blanko 3

	Sampel	Blanko 1	Blanko 2	Blanko 3
Sampel	20 µl	-	20 µl	-
Aquades	-	20 µl	-	20 µl
WST Solution	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Enzyme Solution	20 µl	20 µl	-	-
Buffer	-	-	20 µl	20 µl

% penghambatan dapat dihitung berdasarkan persamaan berikut:

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{(A_{\text{blanko1}} - A_{\text{blanko3}}) - (A_{\text{sampel}} - A_{\text{blanko2}})}{(A_{\text{blanko1}} - A_{\text{blanko3}})} \times 100$$

$$\text{Aktivitas (Unit/ml)} = \frac{\% \text{ kecepatan penghambatan}}{50\% \times \text{volume enzim yang digunakan}} \times fp$$

Keterangan:

fp : faktor pengenceran

50% : penghambatan kecepatan reduksi sitokrom C

3.3.9 Embedding Organ

Organ ginjal yang sudah disimpan dalam PFA 4% selama 7 hari direndam dalam etanol 70% minimal 24 jam, kemudian merendamnya dalam etanol 90% selama 30 menit dan dilanjutkan dengan merendamnya sebanyak 3 kali pada etanol absolut selama 30 menit. Kemudian organ tersebut diinkubasi dengan suhu 56 – 58°C. Setelah itu direndam kembali dengan xylol sebanyak 3 kali, kemudian dilanjutkan embedding dengan mencelipkan pankreas dalam parafin cair yang telah dituang dalam wadah. Setelah beberapa saat parafin akan memadat dan pankreas berada dalam blok parafin (metode Brancroft).

3.3.9 Pembuatan Preparat Ginjal

Untuk pembuatan preparat ginjal, langkah pertama yang dilakukan adalah pankreas pada blok parafin hasil embedding dimasukkan pada penjepit (*Block holder*) mikrotom dan diatur kesejajaran permukaan potong dengan mata pisau mikrotom. Pemotongan diawali dengan mengatur ketebalan irisan di atas

10 jam untuk mempercepat pencapaian bidang potong jaringan. Kemudian ginjal diiris dengan ukuran 5 μm . pemotongan yang bagus akan menghasilkan bentuk potongan seperti pita. Irisan diambil dengan kuas dan dimasukkan air (suhu ruang) untuk membuka lipatan yang mungkin terjadi pada preparat. Hasil irisan dipindahkan dengan kuas ke dalam air hangat 38 – 40°C untuk meluruskan kerutan halus yang ada. Irisan yang terentang sempurna kemudian diambil dengan gelas obyek. Potongan terpilih dikeringkan di atas *hot plate* 38 – 40°C sampai kering selanjutnya preparat disimpan dalam incubator suhu 38 – 40°C selama 24 jam.

3.3.10 Ekspresi E-Kaderin dengan Imunohistokimia

Langkah awal yang dilakukan untuk imunohistokimia adalah dengan tahapan pada xilol 1, xilol 2, etanol bertingkat (98%, 95%, 90%, 80%, 70%) dan aquades. Slide preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit. Kemudian preparat ditetesi dengan 3% H_2O_2 selama 20 menit, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Preparat kemudian diinkubasi dengan antibodi primer *anti E-Kaderin* selama semalam pada suhu 4°C, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali selama 5 menit. Setelah itu diinkubasi menggunakan antibodi sekunder *anti rabbit biotin* (Santa Cruz) selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali. Preparat kemudian ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin-horse radin peroxidase*) dan diinkubasi selama 40 menit. Setelah itu dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali. Preparat kemudian ditambahkan pewarna kromagen DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) selama 10-20 menit pada suhu ruang. Preparat dicuci dengan air kran sebanyak tiga kali selama 5 menit. Kemudian dikeringkan dan dilakukan *mounting*. Pengamatan dengan mikroskop cahaya pada perbesaran 400x dan 800x dan dihitung jumlah sel/100 sel dengan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Induksi MLD-STZ terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus DMT 1

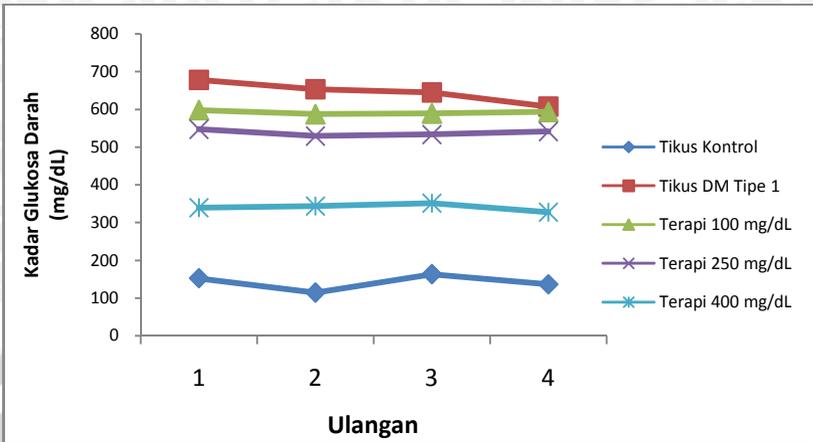
Pada penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus novergicus*) yang diinduksi dengan streptozotocin (STZ) agar dapat menjadi diabetes mellitus tipe 1 (DMT1). Dosis yang digunakan untuk menginduksi tikus putih adalah dosis yang rendah dan berulang (*Multiple Low Dose*, MLD-STZ). Dosis untuk MLD-STZ yang digunakan adalah 20 mg/KgBB dengan injeksi intraperitoneal (i.p) yang dilakukan selama 5 hari berturut-turut (Aulanni'am, dkk., 2005).

Induksi STZ yang dilakukan pada hewan coba dapat meningkatkan sel-sel inflamatori sehingga dapat menimbulkan menifestasi meningkatnya kadar glukosa darah. Hewan coba dapat didiagnosa menderita diabetes mellitus tipe 1 jika kadar glukosa darahnya mencapai >300 mg/dL.

Tabel 4.1 Kadar Glukosa Darah Tikus Kontrol, DM Tipe 1 dan Terapi Ekstrak Metanol Biji Mahoni

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Kadar Glukosa	Peningkatan Kadar Glukosa Terhadap Kontrol (%)
Kontrol Sehat	141,25 ± 21,282	0
DM Tipe 1	645,75 ± 29,409	457,17
Terapi 100 mg/KgBB	591,75 ± 4,856	418,94
Terapi 250 mg/KgBB	537,5 ± 8,062	380,53
Terapi 400 mg/KgBB	340 ± 10	240,70

Berdasarkan hasil penelitian pada Tabel 4.1, terjadi peningkatan kadar glukosa darah paling tinggi, yaitu 645,75 ± 29,409 mg/dL yang terjadi pada kelompok tikus DM Tipe 1 dengan induksi STZ yang dibandingkan dengan kelompok tikus kontrol yang berada pada kisaran 141,25 ± 21,282. Menurut ADA (2004), kisaran kadar glukosa darah normal adalah 85-102 mg/dL, sedangkan pada tikus DM pada kisaran >539 mg/dL.



Gambar 4.2 Perbandingan Kadar Glukosa Darah Tikus Kontrol, DM Tipe 1 dan Terapi Ekstrak Metanol Biji Mahoni

Streptozotocin merupakan senyawa yang dapat menyebabkan hewan coba mengalami hiperglikemi. STZ juga sering disebut sebagai analog sitotoksik glukosa. STZ merupakan toksik yang selektif terhadap sel β pankreas karena secara khusus dapat terakumulasi di sel β pankreas sebagai analog glukosa melewati pengangkutan oleh glukosa transporter GLUT2. Setelah STZ masuk ke dalam sel β pankreas, STZ akan menuju inti sel dan akan mengalkilasi DNA sehingga DNA terfragmentasi dan sel β pankreas akan rusak. Ketika sel β pankreas rusak, maka insulin tidak akan terekspresi dan menyebabkan penyakit diabetes mellitus tipe 1 (insulin-dependent “streptozotocin diabetes”).

Dari data hasil pengukuran menunjukkan bahwa kadar glukosa darah tikus mengalami penurunan yang signifikan pasca terapi ekstrak methanol biji mahoni secara berturut-turut dengan dosis 100; 250; 400 mg/KgBB, yaitu (591.75 ± 4.856); (537.5 ± 8.062) dan (340 ± 10) mg/dL. Hasil tersebut didukung oleh analisis statistik One Way Anova dan dilanjutkan dengan uji Tukey (lampiran 6), menunjukkan perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) antara kadar glukosa darah kelompok DMT 1 dengan kelompok tikus yang mendapat terapi ekstrak methanol biji mahoni dosis 100; 250; dan 400 mg/KgBB. Terapi ekstrak biji mahoni dengan dosis 300 mg/KgBB memberikan penurunan

kadar glukosa darah yang paling mendekati kadar glukosa darah tikus kontrol dengan dosis 100 dan 250 mg/KgBB walaupun hasil statistika masih menunjukkan bahwa adanya perbedaan yang nyata antara kelompok control dan dosis 400 mg/KgBB.

Ekstrak biji mahoni diketahui mampu mengontrol oksidatif yang diakibatkan adanya *diabetes-induced* yang didukung dengan peningkatan aktivitas enzim antioksidan dan pengurangan jumlah produk radikal bebas. Hal ini menjelaskan bahwa pengaruh antidiabetik pada ekstrak biji mahoni dapat menghambat produksi ROS dengan mencegah autooksidasi glukosa dengan glikasi. Kemungkinan lainnya adalah adanya antioksidan jenis *neutraceutical* seperti flavonoid yang terdapat pada ekstrak tersebut (De, dkk., 2010).

4.2 Aktivitas Superoksida dismutase (SOD) pada Tikus DMT 1 yang Mendapat Terapi Ekstrak Metanol Biji Mahoni

Aktivitas SOD diukur melalui reaksi dismutasi ion superoksida menjadi O_2 dan H_2O_2 . Tabel 4.2 menunjukkan hasil aktivitas SOD pada serum tikus kelompok kontrol, kelompok DMT1, kelompok terapi ekstrak biji mahoni dengan dosis 100; 250; dan 400 mg/KgBB. Berdasarkan Tabel 4.2 dapat diketahui bahwa SOD pada serum kelompok DMT1 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol. Terdapat perbedaan yang signifikan ($p>0,05$) antara aktivitas SOD serum kontrol dan SOD serum DMT1. Begitu juga dengan kelompok terapi dosis 100; 250; dan 400 mg/KgBB yang memiliki nilai SOD serum lebih tinggi daripada kelompok DMT1. Akan tetapi, kelompok terapi dosis 400 mg/kgBB berbeda secara signifikan ($p>0,05$) dengan kelompok kontrol, sehingga dosis 400 mg/KgBB dapat dikatakan masih belum dapat menaikkan aktivitas SOD pada penyakit DMT1 seperti keadaan normal.

Pada pasien diabetes, fungsi glutathione berkurang sebagai penangkap radikal bebas atau sebagai kosubstrat untuk glutathione peroxide (GPx) dimana akan menyebabkan penurunan konsentrasi GSH dengan peningkatan stress oksidatif. Pada pasien diabetes, hasil autooksidasi glukosa menghasilkan pembentukan hidrogen peroksida yang akan meng-inaktivasi SOD. Oleh karena itu, hidrogen peroksida yang

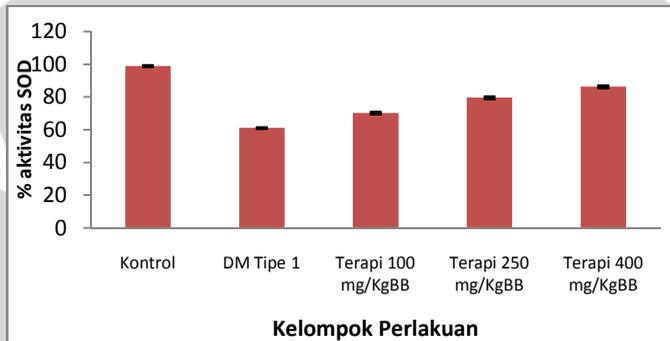
terakumulasi pada penderita penyakit diabetes mellitus akan mengakibatkan penurunan aktivitas SOD (Shinde, dkk., 2011).

Tabel 4.2 Aktivitas SOD pada serum tikus kelompok kontrol, kelompok DMT1, kelompok terapi ekstrak biji mahoni dengan dosis 100; 250; dan 400 mg/KgBB.

Sampel serum		Aktivitas SOD (Unit/ml)	Rata-rata ± SD (Unit/ml)
Kontrol	A1	99,045	98,985 ± 0,49
	A2	99,522	
	A3	99,045	
	A4	98,329	
DMT1	B1	61,337	61,157 ± 0,35
	B2	61,575	
	B3	60,859	
	B4	60,859	
Terapi 100 mg/KgBB	C1	69,451	70,048 ± 0,57
	C2	69,698	
	C3	70,644	
	C4	70,405	
Terapi 250 mg/KgBB	D1	79,236	79,295 ± 0,81
	D2	78,52	
	D3	78,997	
	D4	80,429	
Terapi 400 mg/KgBB	E1	85,441	84,487 ± 0,7
	E2	84,248	
	E3	83,77	
	E4	84,486	

Superoksida dismutase merupakan enzim antioksidan endogen yang berfungsi untuk mengontrol stress oksidatif dalam tubuh. Pada penyakit diabetes mellitus, keadaan hipergliemia akan menyebabkan peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS). Jika ROS berlebihan dalam tubuh, maka akan memicu terjadinya stress oksidatif, yaitu keadaan dimana jumlah radikal bebas yang diproduksi melebihi kapasitas tubuh untuk menangkalnya. SOD berperan untuk meredam stress oksidatif dengan merubah anion superoksida (O_2^*) menjadi hydrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2) sehingga dapat melindungi sel-sel β pankreas (Wiryana, 2008).

Berdasarkan Gambar 4.3, menunjukkan bahwa dengan meningkatkan dosis sampai 400 mg/KgBB, dapat meningkatkan SOD sampai 84,487 unit/ml walaupun masih berbeda nyata secara signifikan ($P < 0,05$). Hal tersebut dimungkinkan kurangnya waktu terapi yang diberikan, sehingga dosis 400 mg/KgBB masih belum dapat menjadi dosis optimum.



Gambar 4.3 Perbandingan Aktivitas Serum SOD pada Tikus Kontrol, DM Tipe 1 dan Terapi Ekstrak Metanol Biji Mahoni

Dengan adanya paparan stress oksidatif pada tikus DMT1, enzim superoksida dismutase (SOD) sebagai antioksidan endogen akan meningkat aktivitasnya untuk mengontrol stres oksidatif tersebut. Apabila stres oksidatif telah dapat diatasi, maka aktivitas SOD kembali normal.

4.3 Ekspresi E-kaderin pada Jaringan Ginjal Tikus Hasil Induksi MLD-STZ yang Mendapat Terapi Ekstrak Metanol Biji Mahoni

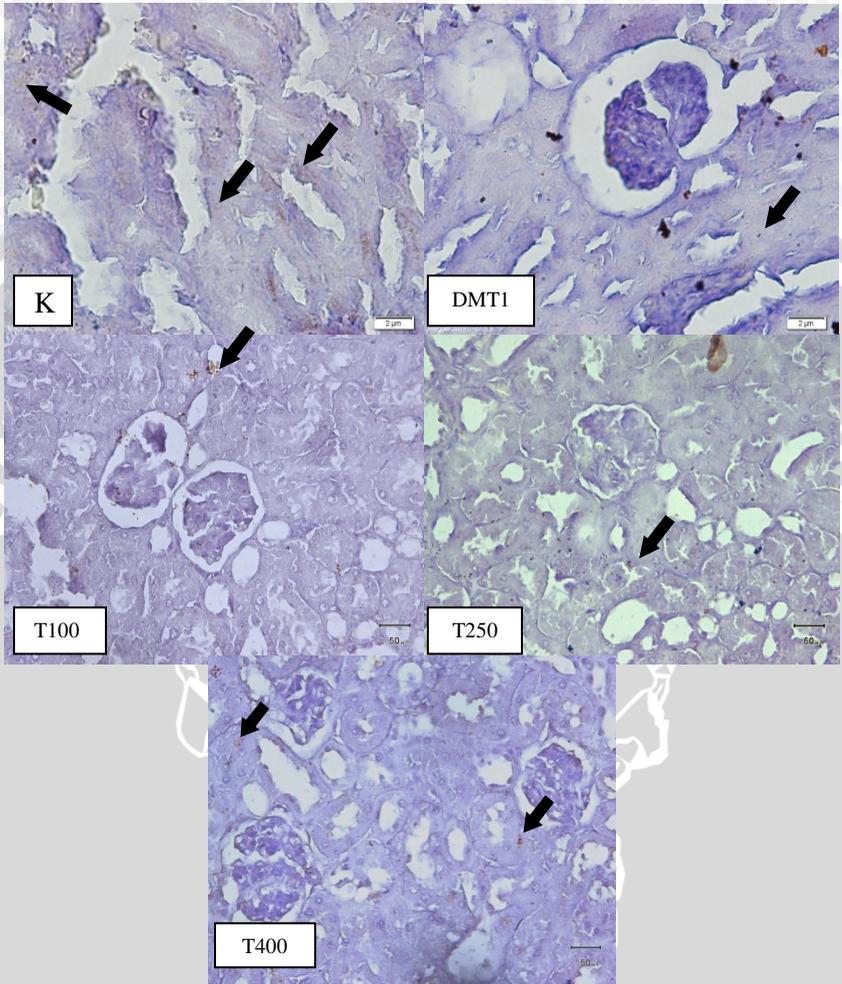
Dalam penelitian ini, ekspresi e-kaderin diamati pada jaringan ginjal. Berdasarkan hasil pengamatan, e-kaderin terekspresi hampir pada semua kelompok perlakuan. Pada kelompok DMT1 ($1,366 \pm 0,164$) terdapat ekspresi e-kaderin dengan presentase area permukaan lebih rendah daripada kelompok kontrol ($4,937 \pm 0,085$). Pada kelompok terapi 100 mg/KgBB mengalami peningkatan yang signifikan dari kelompok DMT1 ($1,6342 \pm 0,837$). Pengaruh ekstrak metanol biji mahoni ternyata mampu meningkatkan ekspresi e-kaderin

pada dosis 250 mg/KgBB dengan nilai area permukaan sebesar $4,2004 \pm 1,571$ yang tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol. Begitu pula dengan terapi 400 mg/KgBB ($4,9214 \pm 0,279$) yang tidak berbeda nyata ($p>0,05$) dengan kelompok kontrol dan kelompok terapi 250 mg/KgBB.

Tabel 4.3 Profil presentase area permukaan tikus kontrol, tikus DMT1 dan tikus kelompok terapi ekstrak methanol biji mahoni

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Persentase Area Permukaan E-kaderin	Peningkatan Persentase Area Permukaan E-kaderin (%)
Kontrol Sehat	$4,937 \pm 0,085$	0
DM Tipe 1	$1,366 \pm 0,164$	27,67
Terapi 100 mg/KgBB	$1,634 \pm 0,837$	33,10
Terapi 250 mg/KgBB	$4,201 \pm 1,571$	85,08
Terapi 400 mg/KgBB	$4,921 \pm 0,279$	99,68

Ekspresi e-kaderin pada ginjal ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada histologi ginjal yang ditandai dengan tanda panah. E-kaderin memiliki fungsi sebagai melekatnya sel epitel pada basal membran protein dan antar sel epitel. Pada kasus diabetes, kehilangan e-kaderin merupakan keadaan yang berhubungan dengan EMT. EMT dapat menyebabkan jaringan ginjal mengalami fibrogenesis. Fibrogenesis merupakan pengaruh dari EMT dan akan mengurangi ekspresi e-kaderin pada sel tubular renal oleh TGF- β .



Gambar 4.4 Ekspresi E-kaderin pada organ ginjal dengan perbesaran 400x. Tikus kontrol (K), tikus diabetes mellitus tipe 1 (DMT1), tikus terapi ekstrak metanol biji mahoni: dosis 100 mg/KgBB (T100), dosis 250 mg/KgBB (T250) dan dosis 400 mg/KgBB (T400).

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Pemberian terapi ekstrak metanol biji mahoni dengan dosis 100; 250 dan 400 mg/KgBB pada tikus yang diinduksi MLD-STZ mampu menaikkan aktivitas SOD pada serum tikus walaupun tidak secara signifikan dengan masing-masing aktivitas 70,04; 79,29 dan 84,49 Unit/ml.
2. Pemberian terapi ekstrak metanol biji mahoni dengan dosis 100; 250 dan 400 mg/KgBB pada tikus yang diinduksi MLD-STZ menunjukkan peningkatan ekspresi E-kaderin pada histologi ginjal secara signifikan sebesar 33%, 85% dan 99%. Ekspresi E-kaderin mampu mendekati normal pada pemberian terapi dosis 250 mg/KgBB.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas SOD pada organ ginjal sehingga dapat digunakan untuk mengetahui pengaruh terapi ekstrak metanol biji mahoni pada aktivitas SOD organ ginjal.

DAFTAR PUSTAKA

- American Diabetes Association. 2004. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 27(1):S5-S10.
- Anonim. 2001. *Urinary System: Anatomy and Histology Kidney*. [http://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcapan/anat2/notes/APII Notes3%20Urinary%20anatomy.htm](http://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcapan/anat2/notes/APII%20Notes3%20Urinary%20anatomy.htm). Diakses pada: 2 Januari 2013.
- Aresu L, and MP Rastaldi. 2008. Dog as model for down expression of E-cadherin and β -catenin in tubular epithelial cells in renal fibrosis. *Renal Research Laboratory*. Italy.
- Aulanni'am. 2011. Superoksida Dismutase (SOD) Activity and Histological Pancreas of Type 1 Diabetes Mellitus Rats which Get the Temu Giring (*Curcuma heyneana*) Extract Treatment. *Media Kedokteran Hewan*. 27(1).
- Croft, K.D. 1999. *Antioxidant Effects of Plant Phenolic Compounds*. Dalam Antioxidant in Human Disease by TK Basu. Cabi Publishing: Australia.
- Dabla, P.K., 2010. Renal function in diabetic nephropathy. *World J Diabetes*. 1(2):48-56.
- Daroux, M., Grossin, N., and Boulanger, E. 2012. AGE, RAGE and Diabetic Nephropathy. *Touch Medical Media*. 84-88.
- De, D., Chatterjee, K., Ali, K.M., Bera, T.K., dan Ghosh, D. 2010. Antidiabetic potentially of the aqueous-methanolic extract of seed of *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. in streptozotocin-induced diabetic male albino rat: a correlative and evidence-based approach with antioxidative and antihyperlipidemic activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Dutta, M., Raychaudhuri., Chakroborty, R. and Maji, D. 2011. Role of Diet and Plants on Diabetic Patients a Critical Appraisal. *Science and Culture*. 77(3-4):115-122.
- Elsner, M., Guldbake, B., Tiedge, M., Munday, R. and Lenzen, S. 2000. Relative Importance of Transport and Alkylation for Pancreatic Beta-cell Toxicity of Streptozotocin. *Diabetologia*. 43:1528-1533.
- Eskin, NAM., Przybylski, R. 2001. Antioxidant and shelf life of foods. *Foods Shelf Life Stability*. 175-209.

- Estiasih, T., and Andiyas, D.K. 2006. Aktivitas antioksidan ekstrak umbi akar Ginseng Jawa (*Talinum triangulase* Wild). *Journal Teknol dan Industri Pangan* (17):166-175.
- Frandsen, R.D. 1992. *Anatomi dan Fisiologi Ternak*. Ed ke-4. GadjahMada University Press: Yogyakarta.
- Gupta, P.D, and De, A. 2012. Diabetes Mellitus and its Herbal Treatment. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 3(2):706-721.
- Hajra, S., Mehta, A., Pandey, P, and Vyas, S.P. 2011. Antioxidant and diabetic potential of ethanolic extract of *Swietenia mahagoni* (Linn.) seeds. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development*. 3(3):180-186.
- Hajra, S., Mehta, A., Pandey, P, and Vyas, S.P. 2013. Free radical scavenging and A-Amylase inhibitory Activity of *Swietenia mahagoni* seeds oil. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 5(1):51-56.
- Halliwell, B and Guttergridge, J.M.C. 1999. *Free Radical in Biology and Medicine*. Claredon Press: Oxford.
- Hariana, A. 2007. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*. PT. Penebar Swadaya: Jakarta.
- Junquera L.Carlos, Jose Carneiro, Robert O. Kelley. 1998. *Histologi Dasar*. EGC. Jakarta.
- Katambali, N. 2002. Antioxidant activities of grape (*Vitis vinivera*) pomace extract. *J. Agric Food Chem*. 50:5909-5914.
- Kowluru, R.A. & Chan, P.S. 2007. Oxidative Stress and Diabetic Retinopathy. *Exp Diabetes Res*. 4:43-63.
- Matough, F.A., Budin, S.B., Hamid, Z.A., Alwahibi, N. and Mohamed, J. 2012. The Role of Oxidative Stress and Antioxidant in Dieabetic Complication. *SQU Medical Journal*. 12(1):5-18.
- Patel, S.S., Shah, R.S. and Goyal, R.K. 2009. Antihyperglycemic Antihyperlipidemic and Antioxidant Effects of Dihar, a Polyherbal Ayurvedic Formulation in Streptozotocin Induced Diabetics Rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. 47:564-570.
- Perez-Moreno, M., Jamora, C., and Fuchs, E. 2003. Sticky Bussiness: Orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* 112, 535-548.
- Pine, S., Hendrickson, J.B., Cram, D.J. and Hammond, G.S., 1988. *Kimia Organik 2: Terbitan Keempat*. Penerjemah:

- Joedibroto, R & Purbo-Hadiwidjojo, S.W. ITB Press: Bandung.
- Sahgal, G., Ramanathan, S., Sasidharan, S., Mordi, M.N., Ismail, S. and Mansor, S.M. 2009. Phytochemical and Antimicrobial Activity of *Swietenia mahagoni* Crude Methanolic Seed Extract. *Molecules*. 14:4476-4485.
- Sahgal, G., Ramanathan, S., Sasidharan, S., Mordi, MN., Ismail, S. and Mansor, SM. 2009. In vitro antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of methanolic *Swietenia mahagoni* seed extract. *Molecules*. 14(11):4476-85.
- Setyadian. 2010. *Prevalensi Penderita Diabetes Mellitus* dalam Seminar Diabetes Mellitus. Harian Kompas: Yogyakarta.
- Shinde, S.N., Dhadke, V.N., and Suryakar, A.N. 2011. Evaluation of oxidative stress in type 2 diabetes mellitus and follow-up along with vitamin E supplementation. *Ind J Clin Biochem*. 26(1):74-77.
- Sumali. 2012. Aneka Herbal Penurun Gula Darah. *Harian Kompas*: Yogyakarta.
- Suyono. 2009. Kecenderungan Peningkatan Pasien Diabetes Mellitus. *Penatalaksanaan Diabetes Terpadu*. FKUI: Jakarta.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. 2007. Free radical and antioxidant in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39(7): 44-84.
- Wicki Andreas and Gerhard Christofori. 2008. E-Kaderin. Department of Clinical-Biological Sciences, Centre of Biomedicine, Institute of Biochemistry and Genetics, University of Basel, Basel, Switzerland.
- Winasis, B. E. 2009. Hubungan antara Konsep Diri dengan Depresi pada Pasien Diabetes Mellitus di Rumah Sakit Parancimantoro Wonogiri. *Skripsi*. Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Wiryana, M. 2008. *Peranan Terapi Insulin Intensif terhadap SOD, TNF- α dan IL-6 pada Penderita Kritis dengan Hiperglikemia*. Pasca S3 Universitas Udayana: Denpasar.
- Yuliarti, N. 2009. *Sehat, Cantik, Bugar dengan Herbal dan Obat Tradisional*.

Lampiran 1. Preparasi Larutan

L.1.1 Pembuatan Larutan Buffer Sitrat pH 4,5

Buffer sitrat 0,2 M dapat dibuat dengan mencampurkan 2,1076 g asam sitrat dan 2,9449 g natrium sitrat dalam 30 ml aquades steril kemudian dihomogenkan dengan stirrer dan diatur pH-nya sampai 4,5. Setelah itu, larutan dipindahkan ke labu ukur 50 ml dan ditambahkan akuades sampai tanda batas dan dihomogenkan. Selanjutnya dipindahkan dalam botol berwarna gelap dan disterilkan.

L.1.2 Pembuatan Larutan Streptozotocin

Streptozotocin sebanyak 100 mg dilarutkan dalam 1,5 ml buffer sitrat pH 4,5 dan dihomogenkan untuk membuat larutan stok STZ. Kebutuhan larutan STZ dengan dosis 20 mg/KgBB adalah:

$$STZ \text{ yang diberikan} = \frac{BB \text{ tikus (g)}}{1000 \text{ (g)}} \times 20 \text{ mg}$$

Konsentrasi larutan STZ adalah 100 mg/1,5 ml = 100 mg/1500 μ l. Jadi, larutan STZ yang disuntikkan adalah 0,033 mg/1 μ l. Untuk dosis 20 mg/KgBB maka STZ yang harus diambil adalah:

$$\mu\text{l STZ} = \frac{\frac{BB \text{ (g)}}{1000 \text{ (g)}} \times 20 \text{ mg}}{0,033 \text{ mg}} \times 1 \mu\text{l}$$

L.1.3 Pembuatan Larutan Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7,4

KCl sebanyak 0,1 g, KH_2PO_4 sebanyak 0,1 g, NaCl sebanyak 4 g dan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebanyak 1,08 g dicampur dan dilarutkan dalam 250 ml akuades steril dan dihomogenkan menggunakan magnetik stirrer dalam gelas kimia 500 ml. Kemudian pH larutan diatur hingga mencapai 7,4 dengan larutan NaOH 1 M menggunakan pH meter. Setelah pH sesuai, larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 500 ml dan ditambahkan akuades steril hingga tanda batas.

L.1.4 Pembuatan Larutan PBS-Azida

Larutan PBS-azida dapat dibuat dengan mengambil 200 ml larutan PBS pH 7,4 dalam gelas kimia 250 ml. kemudian ditambahkan 8 tetes larutan azida 1% (NaN_3) dengan menggunakan pipet tetes. Lalu dihomogenkan dengan magnetik stirrer.

L.1.5 Pembuatan Larutan NaCl-fis 0,9%

$$NaCl - \text{fis } 0,9\% = \frac{0,9 \text{ g}}{100 \text{ ml}} \times 500 \text{ ml} = 4,5 \text{ g}$$

36

NaCl ditimbang sebanyak 4,5 g dan dilarutkan dengan 100 ml akuades steril. Lalu larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 500 ml dan diencerkan dengan akuades steril hingga tanda batas.

L.1.6 Pembuatan Larutan PFA (Paraformaldehid) 4%

$$\begin{aligned}V_1 M_1 &= V_2 M_2 \\V_1 \times 37\% &= 100 \text{ ml} \times 4\% \\V_1 &= 10,8 \text{ ml}\end{aligned}$$

Langkah yang dilakukan untuk membuat PFA 4% yaitu membuat larutan NaCl-fis 0,9% sebagai pelarutnya yaitu dengan menimbang NaCl sebanyak 1,8 g lalu dilarutkan dalam 200 ml aquades kemudian distirer. Larutan PFA 4% dapat dibuat dengan mengambil 10,8 ml formaldehid 37% kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan diberi akuades sampai tanda batas.

L.1.7 Pembuatan Larutan Etanol Bertingkat

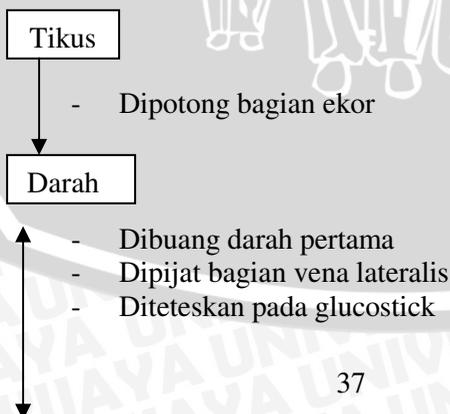
Larutan etanol bertingkat dibuat dari larutan etanol 99%. Kemudian diencerkan menjadi etanol 95%, 90%, 80%, 70% dalam labu ukur 100 ml. Pengenceran tersebut dilakukan dengan menggunakan akuades steril.

Contoh pembuatan larutan etanol 95% dibuat dari larutan etanol absolut, sehingga jika membuat etanol 95% maka volume etanol absolute yang diperlukan sebesar:

$$\begin{aligned}V_1 M_1 &= V_2 M_2 \\V_1 \times 99\% &= 100 \text{ ml} \times 95\% \\V_1 &= 95,96 \text{ ml}\end{aligned}$$

L.2 Diagram Alir Penelitian

L.2.1 Pengukuran Kadar Glukosa Darah



- Dibaca kadar glukosa darah yang tertera pada glukometer

Kadar glukosa darah

L.2.2 Pengambilan Organ Ginjal

Tikus

- Didislokasi leher
- Diletakkan di atas nampan bedah
- Ditata pada posisi ventral di atas
- Dibedah bagian bawah perut hingga rongga perut terbuka

Ginjal

- Dibersihkan dengan NaCl-fis 0,9%
- Direndam dalam PBS pH 7,4
- Disimpan dalam PFA 4%

Ginjal bersih

L.2.3 Pembuatan Preparat untuk Pemeriksaan Hisologis

L.2.3.1 Embedding Pankreas

Ginjal dalam PFA 4%

- Diambil kemudian direndam dalam etanol 70% selama 24 jam
- Dimasukkan dalam etanol 80% selama 2 jam
- Dimasukkan dalam etanol 90% selama 20 menit
- Dimasukkan dalam etanol 95% selama 20 menit
- Dimasukkan dalam etanol absolute selama 20 menit

Ginjal telah didehidrasi dengan etanol

- Dimasukkan dalam larutan xilol selama 20 menit (2 kali pada suhu ruang)

- Dimasukkan dalam larutan xilol selama 20 menit pada suhu 60 – 65°C
- Dicerupkan di parafin cair
- Embedding blok paraffin
- Didinginkan pada suhu 4°C

Ginjal dalam blok parafin

L.2.3.2 Pembuatan Preparat Pankreas

Ginjal dalam blok parafin

- Diiris dengan ukuran 5 µm menggunakan mikrotom
- Didinginkan pada suhu ruang
- Dimasukkan dalam air hangat dengan suhu 38-40°C
- Diambil dengan *object glass*
- Dikeringkan dengan menggunakan *hot plate* dengan suhu 38-40°C
- Diinkubasi pada suhu 30-48°C selama 24 jam

Preparat Ginjal

L.2.3.3 Pewarnaan Hematoxylen-Eosin

Preparat

- Dideparafinasi dengan xilol selama 5 menit sebanyak tiga kali
- Dimasukkan dalam etanol absolute selama 5 menit
- Dimasukkan ke dalam etanol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%) masing-masing selama 5 menit
- Direndam dalam aquades selama 5 menit

Preparat

- Diwarnai dengan Hematoxylen selama 10 menit

- Dicuci dengan air mengalir kemudian dibilas dengan aquades
- Diwarnai dengan eosin selama 5 menit lalu direndam dalam aquades
- Dimasukkan ke dalam etanol bertingkat (95%, 90%, 80%, 70%) masing-masing selama 10 menit
- Dimasukkan ke dalam etanol absolut selama 5 menit sebanyak 3 kali
- Dimasukkan dalam xylol selama 5 menit sebanyak 2 kali
- Dikeringanginkan
- Di-mounting dengan *Entellan* dan ditutup dengan *cover glass*

Preparat HE

L.2.4 Metode Imunohistokimia (Ekspresi E-kaderin)

Preparat Pankreas

- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 1 x 5 menit

Diberi Hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% (dalam diionize water) selama 20 menit

- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit

Dicuci BSA 1% dalam PBS selama 30 menit pada suhu ruang

Diberi antibodi primer (Anti E-kaderin), semalam pada suhu dingin 4°C

- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit

Diberi antibodi sekunder berlabel biotin (*Anti Rabbit IgG Biotin labelled*) selama 1 jam pada suhu ruang

- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit

Diberi SA-HRP (*Strep Avidin-Horseradish peroxidase*), selama 30-60 menit pada suhu ruang

- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit

Diberi Chromogen DAB (*3,3-diminobenzidine tetrahydrochloride*) selama 10 -20 menit pada suhu ruang

- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit

Diberi *Counterstain* (Hematoxylen) selama 5 menit pada suhu ruang

- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit

Mounting dengan *Entellan*

L.2.5 Pengukuran Aktivitas SOD

Serum

- Dimasukkan ke dalam sumuran sampel dan sumuran blanko 2 sebanyak 20 μ l
- Diberi akuades pada sumuran blanko 1 dan 3 sebanyak 20 μ l
- Diberi *working solution* sebanyak 200 μ l pada setiap sumuran
- Diberi dilution buffer 20 μ l ke dalam sumuran blanko 2 dan blanko 3
- Diberi larutan enzim 20 μ l pada setiap sumuran
- Dihomogenasi dengan meletakkan *mikroplate* yang telah ditutup alumunium foil di atas *shaker*
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit
- Diukur pada panjang gelombang 450 nm

Absorbansi tiap sampel

L.3 Perhitungan Persentase Aktivitas Superoksida dismutase (SOD)

Tabel L.3 Persentase aktivitas superoksida dismutase (SOD)

Sampel	A _{sampel}	A _{blanko 2}	A _(blank 1-blank3)	A _(sampel -blank2)	Aktivitas SOD (%)	Rata-rata Aktivitas SOD (%)
K1	0.496	0.465	0.419	0.004	99.045	98.985
K2	0.412	0.41	0.419	0.002	99.522	
K3	0.45	0.446	0.419	0.004	99.045	
K4	0.434	0.427	0.419	0.007	98.329	
DM1.1	0.409	0.247	0.419	0.162	61.337	61.157
DM1.2	0.362	0.201	0.419	0.161	61.575	
DM1.3	0.377	0.213	0.419	0.164	60.859	
DM1.4	0.367	0.203	0.419	0.164	60.859	
T100.1	0.531	0.403	0.419	0.128	69.451	70.047
T100.2	0.521	0.394	0.419	0.127	69.698	
T100.3	0.504	0.381	0.419	0.123	70.644	
T100.4	0.529	0.405	0.419	0.124	70.405	
T250.1	0.458	0.371	0.419	0.087	79.236	79.295
T250.2	0.498	0.408	0.419	0.09	78.52	
T250.3	0.501	0.413	0.419	0.088	78.997	
T250.4	0.514	0.432	0.419	0.082	80.429	
T400.1	0.601	0.54	0.419	0.061	85.441	84.486
T400.2	0.512	0.446	0.419	0.066	84.248	
T400.3	0.615	0.547	0.419	0.68	83.77	
T400.4	0.508	0.443	0.419	0.065	84.486	

K = Kelompok kontrol

DM1 = Kelompok Sakit (DM Tipe 1)

T100 = Kelompok terapi ekstrak biji mahoni 100 mg/KgBB

T250 = Kelompok terapi ekstrak biji mahoni 250 mg/KgBB

T400 = Kelompok terapi ekstrak biji mahoni 400 mg/KgBB

Lampiran 4. Perhitungan Ekspresi E-kaderin

L.4.1 Data Ekspresi E-kaderin

Perhitungan dilakukan terhadap semua *slide* preparat hasil imunohistokimia yang ada pada setiap perlakuan menggunakan antibodi *anti e-kaderin*. Sel yang mengekspresikan e-kaderin ditandai dengan adanya visualisasi warna coklat pada *slide* preparat. Salah satu contoh hasil pengamatan preparat adalah:

Ekspresi e-kaderin selanjutnya dihitung menggunakan program Axio-Vision sehingga diperoleh data jumlah sel masing-masing yang mengekspresikan e-kaderin dalam bentuk persen area.

Tabel L.4.1 Jumlah Sel yang Mengekspresikan e-kaderin

Nama Sampel	Persentase Area					Rata-rata	Standar deviasi
	I	II	III	IV	V		
Kontrol	4.884	4.827	5.03	5.012	4.932	4.937	0.0854
DM Tipe 1	1.319	1.459	1.097	1.459	1.496	1.366	0.1649
Terapi 100	1.156	1.148	0.993	1.872	3.002	1.6342	0.8372
Terapi 250	4.545	5.883	2.69	2.44	5.444	4.2004	1.5713
Terapi 400	4.734	4.801	4.875	5.412	4.875	4.9214	0.2788

Lampiran 5. Pengukuran Kadar Glukosa Darah Tikus

Tabel L.5.1 Data Glukosa Darah Tikus (mg/dL)

Ulangan	Kontrol	DM Tipe 1	Terapi 100 mg/KgBB	Terapi 250 mg/KgBB	Terapi 400 mg/KgBB
1	152	678	598	547	339
2	114	653	587	529	343
3	163	645	589	533	351
4	136	607	593	541	327

Lampiran 6. Perhitungan Statistika menggunakan SPSS 15
L.6.1 Hasil Uji Anova untuk Pengaruh Pemberian Ekstrak
Metanol Biji Mahoni terhadap Kadar Glukosa Darah,
Kadar SOD dan Ekspresi E-kaderin

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<u>glukosa_darah</u>	Between Groups	515231.067	4	128807.767	1003.697	.000
	Within Groups	1283.333	10	128.333		
	Total	516514.400	14			
SOD	Between Groups	2480.731	4	620.183	1921.848	.000
	Within Groups	3.227	10	.323		
	Total	2483.958	14			
<u>ekaderin</u>	Between Groups	46.900	4	11.725	88.468	.000
	Within Groups	1.325	10	.133		
	Total	48.225	14			



L.6.2 Hasil Uji Lanjut BNT untuk Pengaruh Pemberian Ekstrak Metanol Biji Mahoni terhadap Kadar Glukosa Darah, Kadar SOD dan Ekspresi E-kaderin

Dependent Variable	(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
glukosa_darah	0	1	-508.333(*)	9.250	.000	-538.77	-477.89
		100	-441.000(*)	9.250	.000	-471.44	-410.56
		250	-386.000(*)	9.250	.000	-416.44	-355.56
		400	-194.000(*)	9.250	.000	-224.44	-163.56
	1	0	508.333(*)	9.250	.000	477.89	538.77
		100	67.333(*)	9.250	.000	36.89	97.77
		250	122.333(*)	9.250	.000	91.89	152.77
		400	314.333(*)	9.250	.000	283.89	344.77
	100	0	441.000(*)	9.250	.000	410.56	471.44
		1	-67.333(*)	9.250	.000	-97.77	-36.89
		250	55.000(*)	9.250	.001	24.56	85.44
		400	247.000(*)	9.250	.000	216.56	277.44
	250	0	386.000(*)	9.250	.000	355.56	416.44
		1	-122.333(*)	9.250	.000	-152.77	-91.89
		100	-55.000(*)	9.250	.001	-85.44	-24.56
		400	192.000(*)	9.250	.000	161.56	222.44
	400	0	194.000(*)	9.250	.000	163.56	224.44
		1	-314.333(*)	9.250	.000	-344.77	-283.89
		100	-247.000(*)	9.250	.000	-277.44	-216.56
		250	-192.000(*)	9.250	.000	-222.44	-161.56
SOD	0	1	37.71067(*)	.46383	.000	36.1842	39.2372
		100	29.11733(*)	.46383	.000	27.5908	30.6438
		250	20.04767(*)	.46383	.000	18.5212	21.5742
		400	14.47900(*)	.46383	.000	12.9525	16.0055
	1	0	-37.71067(*)	.46383	.000	-39.2372	-36.1842
		100	-8.59333(*)	.46383	.000	-10.1198	-7.0668
		250	-17.66300(*)	.46383	.000	-19.1895	-16.1365
		400	-23.23167(*)	.46383	.000	-24.7582	-21.7052
	100	0	-29.11733(*)	.46383	.000	-30.6438	-27.5908
		1	8.59333(*)	.46383	.000	7.0668	10.1198
		250	-9.06967(*)	.46383	.000	-10.5962	-7.5432
		400	-14.63833(*)	.46383	.000	-16.1648	-13.1118

250	0	-	.4638	.000	-21.5742	-
	1	20.04767(*)	.4638	.000	16.1365	18.5212
	100	9.06967(*)	.4638	.000	7.5432	10.5962
	400	-5.56867(*)	.4638	.000	-7.0952	-4.0422
400	0	-	.4638	.000	-16.0055	-
	1	14.47900(*)	.4638	.000	21.7052	24.7582
	100	14.63833(*)	.4638	.000	13.1118	16.1648
100	0	-3.52167(*)	.2972	.000	-4.4999	-2.5434
	1	-.03267	.2972	1.000	-1.0109	.9456
	250	-3.89867(*)	.2972	.000	-4.8769	-2.9204
	400	-3.41133(*)	.2972	.000	-4.3896	-2.4331
250	0	.37700	.2972	.715	-.6013	1.3553
	1	3.86600(*)	.2972	.000	2.8877	4.8443
	100	3.89867(*)	.2972	.000	2.9204	4.8769
	400	.48733	.2972	.507	-.4909	1.4656
400	0	-.11033	.2972	.995	-1.0886	.8679
	1	3.37867(*)	.2972	.000	2.4004	4.3569
	100	3.41133(*)	.2972	.000	2.4331	4.3896
	250	-.48733	.2972	.507	-1.4656	.4909

* The mean difference is significant at the 0.05 level

Lampiran 7. Laik Etik Penelitian



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK "ETHICAL CLEARANCE"

No: 155-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:

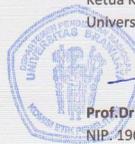
PENELITIAN BERJUDUL : STUDI EKSTRAK METANOL BIJI MAHONI (*Swietenia mahagoni*) TERHADAP SOD SERUM DAN EKSPRESI E-KADERIN PADA ORGAN GINJAL TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) PASCA INDUKSI MLD-STZ

PENELITI : DEASY LUANDAYANTI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 27 Mei 2013
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



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