

**Studi Pemberian Fraksi n-heksan dari Ekstrak Metanol Daun
Ruellia tuberosa L Terhadap Aktivitas α -amilase dalam Usus
Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) dan Kadar Malondialdehid pada
Tikus Diabetes Melitus**

SKRIPSI

Oleh:

MAYASHUDI DIAN FALENTINO

0910923049



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

**Studi Pemberian Fraksi n-heksan dari Ekstrak Metanol Daun
Ruellia tuberosa L Terhadap Aktivitas α -amilase dalam Usus
Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) dan Kadar Malondialdehid pada
Tikus Diabetes Melitus**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

oleh:

MAYASHUDI DIAN FALENTINO

0910923049



JURUSAN KIMIA

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2014

i

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Studi Pemberian Fraksi n-heksan dari Ekstrak Metanol Daun *Ruellia tuberosa L* Terhadap Aktivitas α -amilase dalam Usus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) dan Kadar Malondialdehid pada Tikus Diabetes Melitus

oleh:

MAYASHUDI DIAN FALENTINO
0910923049

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia
Pembimbing I Pembimbing II

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

Dr.Sasangka Prasetyawan, MS
NIP. 19630404 1987011 001

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Edi Priyo Utomo,MS
NIP. 19571227 198603 1 003

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Mayashudi Dian Falentino

NIM : 0910923049

Jurusan : Kimia

Penulisan skripsi berjudul :

Studi Pemberian Fraksi n-heksan dari Ekstrak Metanol Daun *Ruellia tuberosa* L Terhadap Aktivitas α -amilase dalam Usus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) dan Kadar Malondialdehid pada Tikus Diabetes Melitus

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 di kemudian hari ternyata Skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Agustus 2014

Yang menyatakan,

Mayashudi Dian Falentino

NIM. 0910923049

Studi Pemberian Fraksi n-heksan dari Ekstrak Metanol Daun *Ruellia tuberosa* L Terhadap Aktivitas α -amilase dalam Usus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) dan Kadar Malondialdehid pada Tikus Diabetes Melitus

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian fraksi n-heksan ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa* L. terhadap aktivitas enzim α -amilase usus tikus putih (*Rattus norvegicus*) dan kadar malondialdehid tikus DM hasil induksi MLD-STZ dengan dosis 20mg/kgBB. Pada penelitian ini tikus putih dibagi menjadi 3 kelompok yakni kelompok sehat (tanpa induksi STZ), kelompok sakit (diinduksi MLD-STZ), kelompok terapi (diinduksi MLD-STZ dan terapi). Terapi yang diberikan berupa fraksi n-heksan ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa* L. secara oral selama 14 hari. Pengujian aktivitas enzim α -amilase menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada $\lambda=550\text{nm}$. Pengukuran kadar malondialdehid dilakukan menggunakan metode TBA (*Thibarbituric Acid*). Hasil penelitian ini didapatkan rata-rata aktivitas enzim α -amilase pada organ Duodenum berturut-turut berdasarkan kelompok perlakuan adalah $0,881 \pm 0,084$ $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$, $1,205 \pm 0,036$ $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$, dan $0,912 \pm 0,104$ $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$. Organ Jejunum didapatkan hasil berturut-turut $0,608 \pm 0,075$ $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$, $0,994 \pm 0,058$ $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$, dan $0,494 \pm 0,050$ $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$. Untuk organ Ileum didapatkan hasil berturut-turut $0,255 \pm 0,035$ $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$, $0,502 \pm 0,031$ $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$, dan $0,378 \pm 0,043$ $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$. Rataan kadar MDA pada organ Duodenum berturut-turut berdasarkan kelompok perlakuan $4,551 \pm 0,271$ $\mu\text{g/mL}$, $7,467 \pm 0,172$ $\mu\text{g/mL}$, dan $5,279 \pm 0,222$ $\mu\text{g/mL}$. Untuk organ Jejunum didapatkan hasil berturut-turut $4,072 \pm 0,149$ $\mu\text{g/mL}$, $7,508 \pm 0,190$ $\mu\text{g/mL}$, $4,616 \pm 0,185$ dan $\mu\text{g/mL}$. Untuk organ Ileum didapatkan hasil berturut-turut $4,271 \pm 0,125$ $\mu\text{g/mL}$, $7,256 \pm 0,187$ $\mu\text{g/mL}$, dan $5,350 \pm 0,195$ $\mu\text{g/mL}$. Pemberian terapi dapat menurunkan kadar MDA pada usus tikus terapi organ Duodenum sebesar 29,30 %, Jejunum 38,52 %, dan Ileum 26,26 %.

Kata kunci : diabetes mellitus, usus, α -amilase, malondialdehid, *Ruellia tuberosa* L.

**Study Distribution Fraction of n-hexane Extract Methanol
Ruellia tuberosa L Treatment in α -amylase Activity Rat
Intestine (*Rattus norvegicus*) and Malondialdehyde level of
Diabetes Melitus**

ABSTRACT

The aim of this research was to determine the effect of Fraction of n-hexane Extract Methanol *Ruellia tuberosa* L towards α -amylase activity rat intestine (*Rattus norvegicus*) and Malondialdehyde level of diabetes melitus induction MLD-STZ with dose of 20 mg/kgBW. In this study, white rats were categorized into 3 groups, which where healthy group (no MLD-STZ induction), ill group (MLD-STZ induced), and therapy group (MLD-STZ induced and therapy). Therapy was given in the form of fraction n-hexane extract methanol *Ruellia tuberosa* L. induced by oral during 14 days. Analysis of α -amylase activity was measured using UV-Vis spectrophotometry at wave length 550nm. The malondealdehyde level was measured using TBA (*Thiobarbituric Acid*) method. The result of α -amylase activity showed that the average of Duodenum based on the group of treatment are $0,881 \pm 0,084 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{minute}$, $1,205 \pm 0,036 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{minute}$, and $0,912 \pm 0,104 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{minute}$. α -amylase activity of Jejunum based on the group of treatment are $0,608 \pm 0,075 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{minute}$, $0,994 \pm 0,058 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{minute}$, and $0,494 \pm 0,050 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{minute}$. α -amylase activity of Ileum based on the group of treatment are $0,255 \pm 0,035 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{minute}$, $0,502 \pm 0,031 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{minute}$, and $0,378 \pm 0,043 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{minute}$. The average of malondialdehyde level in Duodenum based on the group of treatment are $4,551 \pm 0,271 \mu\text{g/mL}$, $7,467 \pm 0,172 \mu\text{g/mL}$, and $5,279 \pm 0,222 \mu\text{g/mL}$. The average of malondialdehyde level in Jejunum are $4,072 \pm 0,149 \mu\text{g/mL}$, $7,508 \pm 0,190 \mu\text{g/mL}$, $4,616 \pm 0,185 \mu\text{g/mL}$. The average of malondialdehyde level in Ileum are $4,271 \pm 0,125 \mu\text{g/mL}$, $7,256 \pm 0,187 \mu\text{g/mL}$, and $5,350 \pm 0,195 \mu\text{g/mL}$. Effect of therapy can reduced MDA level on rat intestine therapy Duodenum were 29,30 %, Jejunum 38,52 %, and Ileum 26,26 %.

Keywords : diabetes mellitus , intestine, α -amilase, malondialdehyde,
Ruellia tuberosa L.

KATA PENGANTAR

Puji syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat serta hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tugas akhir yang berjudul “**Studi Pemberian Fraksi n-heksan dari Ekstrak Metanol Daun *Ruellia tuberosa* L Terhadap Aktivitas α -amilase dalam Usus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) dan Kadar Malondialdehid pada Tikus Diabetes Melitus**” sebagai salah satu syarat dalam memperoleh gelar Sarjana Sains di Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Penelitian ini adalah bagian dari payung penelitian pengembangan terapi herbal untuk penyakit DM dari Dyah Ratna Wulan, M.Si.

Penghargaan dan terimakasih yang sebesar-besarnya penulis haturkan pada:

1. Allah SWT. yang telah memberikan kelancaran, kemudahan, perlindungan, kesehatan, kasih sayang, serta hidayahNya dalam setiap langkah penulis.
2. Prof.Dr.Aulanni'am, drh. DES dan Dr. Sasangka Prasetyawan, MS., selaku dosen pembimbing I dan II yang telah bersabar membagi ilmu, tenaga, pikiran, serta memberikan kritik dan masukan yang membangun dalam penyelesaian tugas akhir ini.
3. Sri Wardhani, M.Si., sebagai dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi, serta saran kepada penulis selama masa studi.
4. Dr. Edi Priyo Utomo,MS selaku Ketua Jurusan Kimia, pak Maryono sebagai laboran Laboratorium Biokimia MIPA serta segenap Staf Pengajar dan Karyawan Jurusan Kimia untuk semua perhatian dan bantuan yang telah diberikan pada penulis.
5. Bapak, Ibu dan seluruh keluarga yang telah memberi dukungan dalam bentuk do'a, semangat, motivasi maupun materi dalam setiap perjalanan penulis.
6. Davella Sanggari Aryono, Oktaviana Puteri Sakti, Ni Luh Ayu Suwandewi, atas dukungan, bantuan dan semua cerita yang mewarnai selama masa studi penulis hingga dapat bersemangat.
7. Teman-teman seperjuangan 2009, keluarga Lab Biokimia, Vivi Shofia, Mbak Nita, Elhaq, Balqis Kurniasari, Rachmawati Dwi Agustin, Kartika Rahma, yang telah membantu penulis.

8. Teman-teman seataap Anang wijanarko, Mas akbar, Wira, Yuda, yang selalu menghibur penulis setiap waktu. Dan teman-temanku di Dumai, Rano, Winda, Andi, Vidi, dan mungkin tidak bisa saya sebutkan satu persatu yang telah membuat penulis selalu semangat.

Penulis menyadari tugas akhir ini tidak lepas dari adanya keterbatasan, kekurangan dan jauh dari sempurna. Oleh karena itu dengan kerendahan hati, penulis mengharap kritik dan saran yang bersifat membangun guna perbaikan dan penyempurnaannya sehingga dapat bermanfaat bagi kita semua.

Malang, Agustus 2014



Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH dan LAMBANG	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	2
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Diabetes melitus (DM).....	4
2.2 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	5
2.3 <i>Ruellia Tuberosa L</i>	6
2.4 Usus Halus	9
2.5 Patogenesis Diabetes Melitus (DM) oleh Streptozotocin (STZ).....	10
2.6 Enzim α -amilase	13
2.7 Spektrofotometri UV-Vis.....	14
2.8 Malondialdehid (MDA)	15
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	18
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	18
3.2.1 Alat Penelitian	18
3.2.2 Bahan Penelitian	18
3.2.3 Bahan Kimia	19

3.3 Tahapan Penelitian.....	19
3.4 Metode Kerja	20
3.4.1 Penyiapan Tanaman.....	20
3.4.2 Pembuatan fraksi n-heksan dari ekstrak metanol <i>Ruellia tuberosa L</i>	20
3.4.3 Penyiapan Hewan Coba Tikus Putih Jantan (<i>Rattus norvegicus</i>) Strain Wistar	20
3.4.4 Penentuan Kadar Glukosa Darah dengan Glukometer	21
3.4.5 Pembuatan Larutan Streptozotocin (STZ) dan Injeksi Intraperitonial (i.p) pada Hewan Coba.....	21
3.4.6 Terapi hewan coba DM dengan ekstrak <i>Ruellia tuberosa L</i>	22
3.4.7 Pembedahan hewan coba dan pengambilan organ usus	22
3.4.8 Isolasi protein α -amilase usus.....	22
3.4.9 Pengujian aktivitas enzim α -amilase pada organ usus	23
3.4.9.1 Pembuatan kurva standar glukosa.....	23
3.4.9.2 Pengukuran aktivitas enzim α -amilase pada organ usus	23
3.4.10 Pengukuran kadar MDA dengan uji Thiobarbituric acid (TBA) pada organ usus.....	24
3.4.10.1 Pembuatan kurva standar Malondialdehid (MDA).....	24
3.4.10.2 Pengukuran kadar MDA menggunakan uji Thiobarbituric Acid (TBA).....	24
3.4.11 Analisa Data	25
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Fraksi n-heksan Ekstrak Metanol daun <i>Ruellia tuberosa L</i>	26
4.2 Kadar Glukosa Darah Tikus Hasil Induksi MLD-STZ dan Terapi Fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun <i>Ruellia tuberosa l</i>	26
4.3 Pengaruh Pemberian fraksi n-heksan dari ekstrak metanol <i>Ruellia Tuberosa L</i> terhadap aktivitas enzim α -amilase pada organ usus halus.....	28

4.4 Profil MDA pada usus halus tikus DM hasil induksi MLD-STZ dan terapi fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun <i>Ruellia tuberosa</i> l.....	32
---	----

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan.....	36
5.2 Saran	36

DAFTAR PUSTAKA	37
-----------------------------	----

LAMPIRAN	42
-----------------------	----

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 : Tanaman <i>Ruellia tuberosa</i> L.....	6
Gambar 2.2 : Struktur flavanoid dan metabolit sekunder lainnya pada ekstrak metanol pletekan.....	8
Gambar 2.3 : Anatomi usus halus	10
Gambar 2.4 : Struktur Streptozotocin	11
Gambar 2.5 : Mekanisme STZ Menginduksi Rusaknya Sel- β Pankreas	12
Gambar 2.6 : Mekanisme Pengalkilasian STZ yang Memicu Kerusakan DNA.....	13
Gambar 2.7 : Mekanisme Peroksidasi Lipid	15
Gambar 2.8 : Reaksi MDA dengan TBA	17
Gambar 4.2 : Perbandingan Kadar Glukosa Darah Tikus Sehat, Tikus sakit dan Tikus Terapi (sesudah terapi).....	27
Gambar 4.4 : Mekanisme Peroksidasi Lipid	34
Gambar 4.5 : Reaksi <i>scavenging</i> radikal bebas oleh Flavonoid	35

DAFTAR TABEL

Tabel 4.2	: Kadar Glukosa Darah Tikus sehat, Tikus sakit dan Tikus Terapi.....	27
Tabel 4.3.1	: Rataan Aktivitas α -amilase Hasil Isolasi Usus (Duodenum) Tikus.....	29
Tabel 4.3.2	: Rataan Aktivitas α -amilase Hasil Isolasi Usus (Jejunum) Tikus.....	30
Tabel 4.3.3	: Rataan Aktivitas α -amilase Hasil Isolasi Usus (Ileum) Tikus.....	31
Tabel 4.4.1	: Kadar MDA Tikus Sehat, Tikus Hasil Induksi MLD-STZ dan Tikus Hasil Terapi Fraksi n-heksan dari Ekstrak Metanol <i>Ruellia tuberosa l</i> pada organ Duodenum	32
Tabel 4.4.2	: Kadar MDA Tikus Sehat, Tikus Hasil Induksi MLD-STZ dan Tikus Hasil Terapi Fraksi n-heksan dari Ekstrak Metanol <i>Ruellia tuberosa l</i> pada organ Jejunum	32
Tabel 4.4.3	: Kadar MDA Tikus Sehat, Tikus Hasil Induksi MLD-STZ dan Tikus Hasil Terapi Fraksi n-heksan dari Ekstrak Metanol <i>Ruellia tuberosa l</i> pada organ Ileum.....	33

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A : Skema Kerja Penelitian.....	42
Lampiran B : Diagram Kerja Penelitian.....	43
Lampiran C : Preparasi Larutan	52
Lampiran D : Data dan Uji Statistik.....	57
Lampiran E : Sertifikat Laik Etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya Malang	95

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

BB	Berat Badan
DM	Diabetes Melitus
i.p	intraperitonal
MDA	Malondialdehid
MLD-STZ	Multiple Low Dose-Streptozotocin
ROS	Reactive Oxygen Species
TBA	Thiobarbituric Acid
μl	mikroliter



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus merupakan salah satu ancaman utama bagi kesehatan umat manusia pada abad 21. *World Health Organization* (WHO) membuat perkiraan bahwa pada tahun 2000 jumlah pengidap diabetes di atas umur 20 tahun berjumlah 150 juta orang dalam kurun waktu 25 tahun kemudian, pada tahun 2025, jumlah itu akan membengkak menjadi 300 juta orang. Di beberapa negara berkembang, terjadi peningkatan prevalensi penyakit degeneratif, seperti penyakit jantung koroner, hipertensi, hiperlipidemia, diabetes, dan lain-lain [1] [2].

Diabetes mellitus ditandai oleh adanya hiperglikemia karena kerusakan sekresi insulin, gangguan sekresi insulin atau keduanya. Tubuh tidak dapat memproduksi atau tidak dapat merespon hormon insulin yang dihasilkan oleh organ pankreas, sehingga kadar gula darah meningkat dan dapat menyebabkan komplikasi jangka pendek maupun jangka panjang pada penderita [3].

Hiperglikemia disebabkan produksi radikal bebas yang berlebihan ROS (*Reactive Oxygen Species*) sehingga memicu terjadinya stress oksidatif. Radikal bebas dalam tubuh menyebabkan kerusakan pada sel, terutama sel β pankreas dan disertai dengan peningkatan hasil peroksidasi lipid, yaitu malondialdehid (MDA). Sehingga MDA dapat digunakan sebagai indikator pengukuran radikal bebas dalam tubuh [4].

Pengembangan penelitian tanaman hipoglikemi diperlukan sebagai upaya pencegahan karena dapat menurunkan kadar gula darah. Beberapa tanaman yang berpotensi secara empiris dan telah terbukti secara ilmiah salah satunya adalah *Ruellia tuberosa* L / Pletekan. Pletekan, tanaman yang ternaturalisasi di Indonesia, digunakan sebagai obat tradisional pengobatan diabetes melitus. Ekstrak metanol atau etanol dari daun dan batang memiliki aktivitas hipoglikemi terhadap tikus dan kelinci yang diinjeksi alloxan [5] [6]. Aktivitas hipoglikemi diperoleh dari fraksi n-heksan ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa* L [7].

Aktivitas yang mempengaruhi absorpsi glukosa diantaranya inhibisi α -amilase, sebagai pendekatan terapi DM. Asam betulinat,

turunan lupana, berperan sebagai inhibitor α -amilase [8] [9]. Dengan adanya inhibitor α -amilase diperkirakan dapat menurunkan gula darah. Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan penelitian mengenai ekstrak pletekan (*Ruellia tuberosa* L) dalam pengujian aktivitas enzim α -amilase pada usus dan pengukuran kadar MDA pada hewan coba *Rattus norvegicus* hasil induksi MLD-STZ.

1.2 Perumusan Masalah

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

1. Bagaimana pengaruh pemberian fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa* L. (Pletekan) terhadap aktivitas enzim α -amilase usus tikus putih (*Rattus norvegicus*)?
2. Bagaimana pengaruh pemberian fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa* L. (Pletekan) terhadap kadar MDA pada tikus diabetes mellitus hasil induksi STZ?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang telah disebutkan di atas, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain wistar usia 2,5 bulan dengan berat badan rata-rata 100-210 gram sebanyak 18 ekor.
2. Dosis MLD-STZ 20 mg/kg BB per hari selama 5 hari berturut-turut. Penggunaan hewan coba telah menyertakan sertifikat laik etik No.250-KEP-UB dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya.
3. Terapi fraksi n-heksan ekstrak metanol dengan dosis 450/kg BB dilarutkan dengan minyak jagung diberikan pada hewan coba sebanyak 2 mL secara oral(sonde) sesuai batas rata-rata lambung tikus selama 14 hari (berturut-turut dosis tunggal).
4. Fraksi n-heksan ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa* L. (Pletekan) didapatkan dari ekstraksi dengan cara maserasi dalam pelarut metanol dan pemekatan.
5. Kadar MDA pada usus diukur dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dengan standar baku MDA.
6. Pengamatan aktivitas enzim α -amilase dilakukan dengan metode AOAC pada organ usus.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh pemberian fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun *Reullia tuberosa L* terhadap aktivitas enzim α -amilase usus tikus putih (*Rattus norvegicus*)
2. Mengetahui pengaruh pemberian fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun *Reullia tuberosa L* terhadap kadar MDA tikus diabetes mellitus hasil induksi STZ

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang manfaat fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa L*. sebagai terapi pada DM T1 sehingga dapat dijadikan dasar pembuatan obat untuk menurunkan kadar glukosa dalam darah.



BAB II

Tinjauan Pustaka

2.1 Diabetes Melitus (DM)

Diabetes Melitus (DM) atau kencing manis merupakan suatu penyakit kronis yang disebabkan autoimun pada sel beta di pankreas sehingga berkurangnya produksi insulin dan menjadi abnormal dan menyebabkan resistensi terhadap kerja insulin [10]. Hal ini dapat menyebabkan kadar glukosa dalam darah meningkat, sehingga dapat menyebabkan berbagai kerusakan dalam jaringan tubuh[11].

DM dibagi menjadi dua tipe ,yaitu DM tipe 1 (DM T1) dan DM tipe 2 (DM T2). Diabetes mellitus tipe 1 disebabkan oleh kerusakan sel beta pankreas. Adanya DM tipe 1 dapat diidentifikasi dengan ditemukannya antibodi anti *glutamic acid dehydrogenase*, sel islet autoantibody, atau autoantibody insulin di dalam darah. Penderita diabetes tipe 1 selalu memerlukan insulin untuk mencegah timbulnya ketosis spontan agar tetap dapat bertahan hidup. Diabetes mellitus tipe 2, yang paling sering dijumpai, ditandai dengan adanya gangguan sekresi dan kerja insulin. Hiperglikemi pada DM tipe 2 dapat dicegah dengan menggunakan obat antihiperglikemi oral disamping modifikasi diet. Diabetes mellitus tipe lain biasanya disebabkan oleh kelainan genetik atau mutasi genetik yang menyebabkan gangguan fungsi sel beta. Contoh diabetes melitus tipe lain adalah diabetes infantil dan diabetes gestasional. Diabetes melitus infantil adalah DM yang terjadi sejak bayi sedangkan DM gestasional adalah gangguan toleransi glukosa yang muncul pada saat hamil. Gejala DM gestasional mirip dengan DM tipe 2 [12].

Diabetes melitus adalah gangguan endokrin yang paling banyak dijumpai. Gejala-gejala akut diabetes mellitus disebabkan oleh efek insulin yang tidak memadai, karena insulin adalah satu-satunya hormon yang dapat menurunkan kadar glukosa darah. Salah satu gambaran diabetes melitus yang paling menonjol adalah peningkatan kadar glukosa darah atau hiperglikemia [13].

Hiperglikemia dijumpai pada seluruh pasien DM T1. Kadar glukosa darah terbanyak dijumpai antara 300-500 mg/dL pada 21 kasus (51,2%), lebih dari 500 mg/dL pada 15 (36,5%) kasus, dan antara 200-300 mg/dl pada 5 (12,3%) kasus. Diagnosis DM sudah

dapat ditegakkan bila memenuhi salah satu kriteria, yaitu bila ditemukan gejala klinis poliuria, polidipsia, berat badan menurun, dan kadar glukosa darah sewaktu lebih dari 200 mg/dL atau bila asimtomatis, maka kadar glukosa darah sewaktu harus lebih 200 mg/dL atau kadar gula darah puasa lebih tinggi dari normal atau dengan tes toleransi glukosa kadar glukosa darah puasa >140mg/dL atau 4-8 mmol/L (dimana 1 mmol/L = 18 mg/dL) [14].

2.2 Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar

Tikus yang biasa digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian adalah tikus putih jantan *Rattus norvegicus* strain Wistar. Klasifikasi *Rattus norvegicus* sebagai berikut[15]:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Sub Fillum	: Vertebrata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Sciurognathi
Famili	: Muridae
Sub-Famili	: Murinae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>
Galur/Strain	: Strain Wistar

Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain Wistar termasuk ke dalam hewan mamalia yang memiliki ekor panjang. Ciri-ciri galur ini yaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit. Telinga tikus ini tebal dan pendek dengan rambut halus. Mata tikus berwarna merah dan berekor panjang. Bobot badan tikus jantan pada umur dua belas minggu mencapai 240 gram sedangkan tikus betina mencapai 200 gram. Tikus memiliki lama hidup berkisar 267-500 hari dan betina 225-325 hari [16].

Pada tikus diabetes *non-obese* (NOD), kondisi sel-sel langerhans pankreas mengalami kerusakan (nekrosis) apabila dibandingkan tikus kontrol (normal). Kerusakan sel tersebut menunjukkan terjadi kerusakan atau degradasi pada sel β langerhans pankreas. Pada kondisi tersebut, limfosit dapat menembus ke Langerhans pankreas. Hal itu mengindikasikan bahwa telah terjadi proses autoimun pada sel β langerhans pankreas tersebut. Kejadian tersebut mirip dengan patofisiologi DM T1 pada manusia [17].

2.3 *Ruellia Tuberosa* L

Tanaman ini biasanya tumbuh di daerah tropis atau sub tropis, berupa semak. Berasal dari Amerika, ditemukan pada tahun 1901 yang telah lama ternaturalisasi di Jawa. *Ruellia tuberosa* L bernama lain pletekan, pletikan, ceplikan (Jawa), minnieroot, watercannon. Morfologi tanaman, batang berbentuk bulat, berwarna hijau kebiruan. Daunnya tunggal, berwarna hijau. Bunga kelopak berbentuk segitiga, dan mahkota berwarna ungu.



Gambar 2.1 Tanaman *Ruellia tuberosa* L

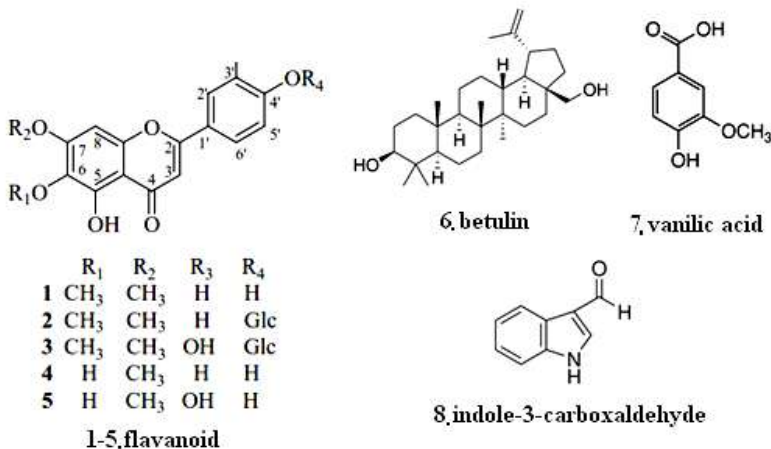
Klasifikasi pletekan adalah sebagai berikut:

- Kingdom : Plantae (tumbuhan)
- Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
- Divisio : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
- Class : Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
- Subclass : Asteridae
- Ordo : Scrophulariales
- Famili : Acanthaceae
- Genus : *Ruellia*
- Species : *Ruellia tuberosa*

Pletekan digunakan secara tradisional untuk obat penyakit ginjal, analgesik, antihipertensi, dan DM. Pengobatan DM, menggunakan daun dan batang. Secara ilmiah, khasiat ekstrak metanol dan etanol daun dan batang pletekan terbukti memiliki aktivitas hipoglikemi, hipolipidemi, hepatoprotektif, dan antioksidan. Bersifat non toksik pada dosis 5000 mg/Kg pada tikus dan kelinci yang diinduksi aloksan [5] [6].

Fraksi etilasetat dari ekstrak etanol daun pletekan (100 mg/Kg berat badan) memiliki aktivitas hipoglikemi tertinggi, dan fraksi n-heksan dari ekstrak etanol (150 mg/Kg berat badan) juga memiliki aktivitas hipoglikemi. Studi fitokimia dari fraksi etil asetat menunjukkan adanya triterpenoid dan flavanoid, sedangkan n-heksan menunjukkan fitosterol dan polifenol [6]. Kemungkinan mekanisme penurunan aktivitas kadar gula darah disebabkan kandungan flavanoid dan fitosterol. Flavanoid bertindak sebagai “*quenching free radical*”, sedangkan fitosterol kemungkinan bertindak merangsang sekresi insulin. Fitosterol contohnya beta sitosterol dapat merangsang sekresi insulin [18].

Menurut Chwan Fwu-Lin (2006) dari ekstraksi 12,5 Kg simplisia bagian batang dan daun pletekan dengan pelarut metanol, menghasilkan ekstrak yang mengandung 5 flavonoid yaitu: cismaritin (1, 54,2 mg), cirsimaritin (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-karboxaldehyd (8, 0,8 mg), dan komponen terbanyak dari fraksi etil asetat adalah triterpenoid berupa betulin, dan fraksi n-heksan mengandung polifenol dan fitosterol. Struktur senyawa seperti yang terlihat pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur flavanoid dan metabolit sekunder lainnya pada ekstrak metanol pletekan [7].

Komponen terbanyak dari fraksi etil asetat adalah triterpenoid berupa betulin, dan fraksi n-heksan mengandung polifenol dan fitosterol yang kemungkinan besar adalah betulin. Pada tikus yang diinjeksi betulin intraperitoneal (60, 180, 540 g/Kg. B.B), konsentrasi betulin pada plasma sebesar 0,13 µg/ml. Injeksi betulin (30, 100, 300 g/Kg.BB) lewat subkutan anjing menunjukkan konsentrasi plasma betulin yang sebesar 0,33 µg/ml [19].

Berdasarkan kelarutannya, beberapa penelitian mengenai proses ekstraksi betulin digunakan ekstraksi dengan pelarut toluene, n-heksan, n-heptan [20]. Betulin dari batang dan daun pletekan kering dapat diperoleh menggunakan ekstraksi metanol, ekstrak metanol dipartisi dengan etilasetat (EtOAc) dan air (H₂O), kemudian ekstrak etilasetat dieluasi dengan n-heksan/EtOAc (4:1) pada kolom silica gel [7].

Ekstrak daun *Ruellia tuberosa l* dalam pelarut metanol yang dapat menurunkan konsentrasi H₂O₂ menunjukkan bahwa mekanisme aksi antioksidan Ekstrak daun *Ruellia tuberosa l* didapat melalui kemampuan reduksinya [21] [22]. Secara in vivo, fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l*. 30

mg/Kg dan 90 mg/Kg yang diberikan pada model tikus inflamasi yg diinduksi λ -karagenan secara signifikan menurunkan penanda ROS yaitu nitrit oksida (NO) dan malondialdehid (MDA) pada edema (pembengkakan jaringan karena akumulasi cairan pada kondisi inflamasi) dan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan Superoksida dismutase (SOD), glutation reduktase (GR), dan glutation peroxidase (GPX) pada hati [23]. Selain memiliki aktivitas antioksidan, fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l.* kemungkinan memiliki aktivitas inhibitor terhadap enzim pencenaan [24].

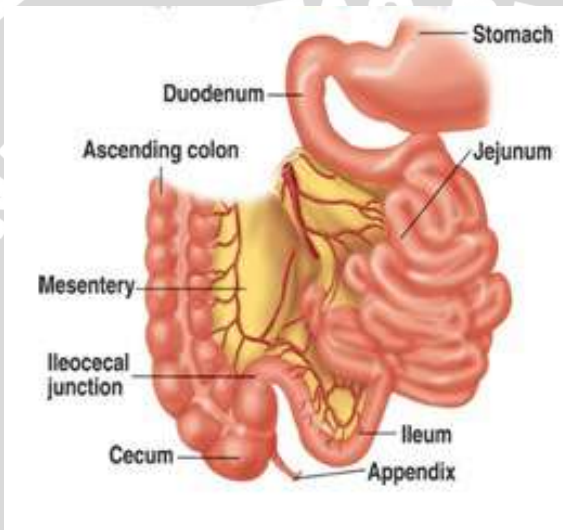
2.4 Usus halus

Usus halus merupakan tabung yang kompleks, berlipat-lipat yang membentang dari pilorus sampai katup ileosekal. Pada orang hidup panjang usus halus sekitar 12 kaki (22 kaki pada kadaver akibat relaksasi). Usus ini mengisi bagian tengah dan bawah abdomen. Ujung proksimalnya bergaris tengah sekitar 3,8 cm, tetapi semakin kebawah lambat laun garis tengahnya berkurang sampai menjadi sekitar 2,5 cm [25].

Usus halus dibagi menjadi duodenum, jejunum, dan ileum. Pembagian ini agak tidak tepat dan didasarkan pada sedikit perubahan struktur, dan yang relatif lebih penting berdasarkan perbedaan fungsi. Duodenum panjangnya sekitar 25 cm, mulai dari pilorus sampai kepada jejunum. Pemisahan duodenum dan jejunum ditandai oleh ligamentum treitz, suatu pita muskulofibrosa yang berorigo pada krus deks tra diafragma dekat hiatus esofagus dan berinsersio pada perbatasan duodenum dan jejunum. Ligamentum ini berperan sebagai ligamentum suspensorium (penggantung). Kira-kira duaperlima dari sisa usus halus adalah jejunum, dan tiga perlima terminalnya adalah ileum. Jejunum terletak di regio abdominalis media sebelah kiri, sedangkan ileum cenderung terletak di region abdominalis bawah kanan. Jejunum mulai pada juncture denojejunalis dan ileum berakhir pada juncture ileocaecalis [25] [26].

Lekukan-lekukan jejunum dan ileum melekat pada dinding posterior abdomen dengan perantaraan lipatan peritoneum yang berbentuk kipas yang dikenal sebagai messenterium usus halus.

Pangkal lipatan yang pendek melanjutkan diri sebagai peritoneum parietal pada dinding posterior abdomen sepanjang garis berjalan ke bawah dan ke kanan dari kiri vertebra lumbalis kedua ke daerah articulation sacroiliaca kanan. Akar mesenterium memungkinkan keluar dan masuknya cabang-cabang arteri vena mesenterica superior antara kedua lapisan peritoneum yang membentuk mesenterium [25] [26].

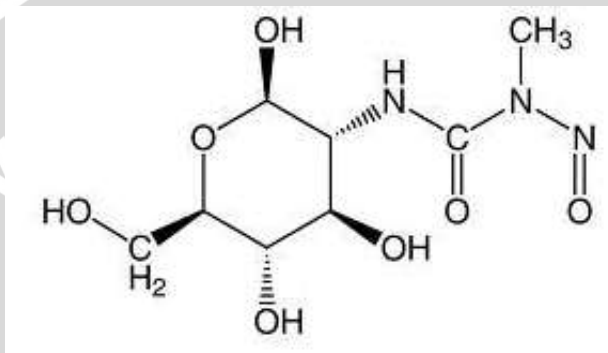


Gambar 2.3 Anatomi usus halus

2.5 Patogenesis Diabetes Melitus (DM) oleh Streptozotocin (STZ)

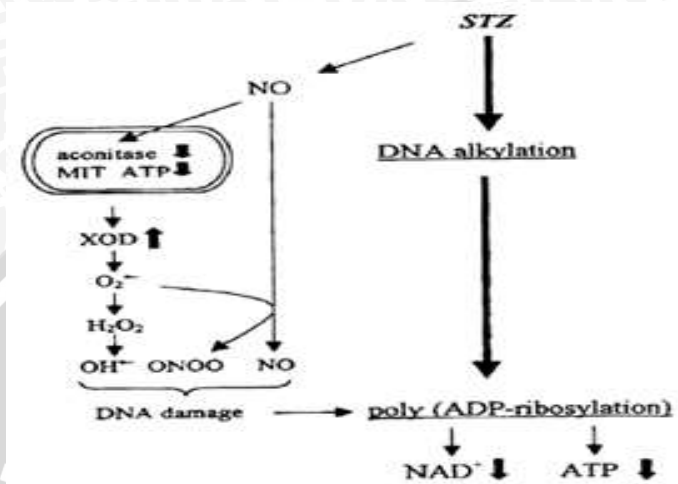
Streptozotocin (STZ) atau nama trivialnya 2-deoksi-2-(3-(metil-3-nitroureido)-D-glukopiranos) disintesis oleh *Streptomyces achromogenes* dan digunakan untuk induksi DM tipe 1 maupun DM tipe 2 [27]. STZ merupakan kelompok senyawa larut air yang berfungsi sebagai agen penambahan jumlah atom dalam molekul menjadi molekul yang lebih panjang dan bercabang. STZ dipecah secara spontan untuk memproduksi ion karbon yang reaktivitasnya tinggi dengan komponen alkali seluler meliputi DNA dan protein. Berat molekul STZ adalah 265 g/mol, tidak berwarna, 10

mengalami dekomposisi pada suhu 115 °C membentuk gas, larut dalam air. Substansi ini tidak stabil pada suhu kamar dan suhu lemari es (seharusnya disimpan pada suhu dibawah 20°C), stabil dalam larutan pH 4 dan suhu rendah. Perubahan morfologis sel beta pankreas sangat erat hubungannya dengan gangguan kestabilan glukosa setelah injeksi STZ [28].



Gambar 2.4 Struktur Streptozotocin

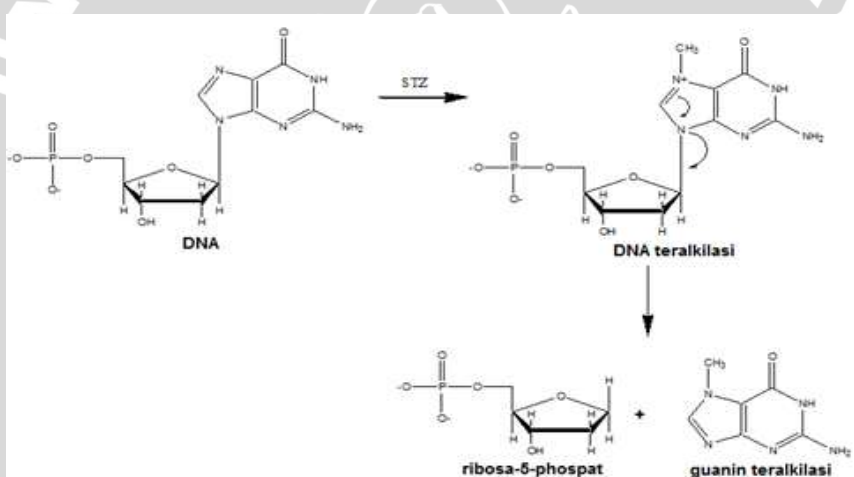
Dosis STZ yang digunakan untuk menghasilkan DM tipe 1 pada hewan coba yaitu dosis tinggi tunggal >40 mg/kg BB dan dosis rendah <40 mg/kg BB yang diberikan 5 hari berturut-turut (MLD-STZ, *multiple low doses streptozotocin*) [29]. STZ dapat pula menginduksi DM tipe 2 pada hewan coba dengan dosis tinggi tunggal 100 mg/kg BB pada tikus yang berumur 2 hari kelahiran [30]. Hasil penelitian Elias., *et al* (1994) [31], menunjukkan bahwa pemberian dosis rendah standar yang diberikan secara intraperitoneal lima hari berturut-turut pada mencit galur C57/KcJ akan menimbulkan gejala DM dalam waktu 3 minggu. Spesifitas STZ terhadap sel beta pankreas lebih besar dari pada siklofosamid dan alloxan. STZ dapat merusak sel beta pankreas melalui dua cara antara lain alkilasi DNA melalui gugus alkilnya, dan sebagai donor NO yang akan menambah jumlah NO di pankreas. NO yang berlebihan akan bereaksi dengan radikal superokso membentuk peroksinitrit yang toksik terhadap sel beta pankreas [32]. Mekanisme STZ menginduksi rusaknya sel- β pankreas dapat dilihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Mekanisme STZ Menginduksi Rusaknya Sel- β Pankreas. (MIT: Mitokondria; XOD: Xantine Oksidase, ATP: Adenosin Tripospat, NAD: Nikotinamid Adenin Dinukleotida) [33].

Gambar 2.5 menjelaskan bahwa STZ menyebabkan terjadinya alkilasi pada basa guanin DNA terutama pada posisi N ke-7. Pengalkilasian tersebut menyebabkan rantai DNA ribosa putus dan terjadi kerusakan DNA. Kerusakan DNA akan memicu produksi enzim poli (ADPRibosa) sintase, yaitu enzim yang diperlukan untuk memperbaiki kerusakan pada DNA. Enzim ini memerlukan Nikotinamida Adenin Dinukleotida (NAD) sebagai substratnya, sehingga kandungan NAD⁺ dalam sel menurun. Berkurangnya NAD⁺ selular menyebabkan penurunan jumlah ATP, dan akhirnya terjadi penghambatan sintesis dan sekresi insulin serta menginduksi hiperglikemia. Kemudian STZ sebagai donor NO eksogen mampu meningkatkan beberapa spesies oksigen reaktif (ROS) yakni radikal superoksida (O₂^{*}), radikal hidroksil (*OH), dan hidrogen peroksida (H₂O₂). Radikal NO dalam bentuk bebas ataupun dalam bentuk senyawa peroksinirit (ONOO⁻), hasil reaksi NO dengan anion superoksida (O₂⁻), bersifat sangat toksik terhadap sel- β pankreas karena menyebabkan kerusakan DNA pankreas. NO dapat

menghambat aktivitas enzim akonitase dalam siklus krebs. Keadaan ini mengurangi reaksi oksidasi glukosa dan pembentukan Adenosin trifosfat (ATP). Anion superoksida (O_2^-) dihasilkan oleh aktivitas STZ dalam mitokondria dan peningkatan aktivitas xantin oksidase. Dalam mitokondria, STZ menghambat siklus Krebs dan menurunkan jumlah pemakaian oksigen mitokondria. Produksi ATP mitokondria menjadi terbatas, selanjutnya mengakibatkan pengurangan secara drastis nukleotida sel- β pankreas. Peningkatan defosforilasi ATP akan memacu peningkatan pasokan substrat untuk enzim xantin oksidase, selanjutnya xantin oksidase akan mengkatalisis reaksi pembentukan O_2^* aktif [30]. Peningkatan O_2^* menyebabkan peningkatan H_2O_2 dan $*OH$ yang memiliki peran tinggi dalam kerusakan pankreas dan menginduksi hiperglikemia.



Gambar 2.6 Mekanisme Pengalkilasian STZ yang Memicu Kerusakan DNA [30].

2.6 Enzim α -amilase

Alfa-amilase merupakan enzim ekstraseluler yang menghidrolisis ikatan 1,4- α -D-glukanohidrolase. Alfa-amilase dibentuk oleh berbagai bakteri dan fungi. Aktifitas α -amilase ditentukan dengan mengukur hasil degradasi pati, biasanya dari penurunan kadar pati yang larut atau kadar dekstrinnya dengan

menggunakan substrat jenuh. Hilangnya substrat dapat diukur dengan pengurangan derajat pewarnaan iodium. Keaktifan α -amilase dinyatakan dengan pengukuran viskositas dan jumlah produksi yang terbentuk. Laju hidrolisis akan meningkat bila tingkat polimerisasi menurun dan laju hidrolisis akan lebih cepat pada rantai lurus [34].

Alfa amilase yang diekspresikan di saliva dan pankreas memiliki 97% kesamaan residu asam amino, dan 92% kesamaan pada domain katalitik [35]. Protein α -amilase memiliki tiga domain, yaitu domain A ($(\beta/\alpha)_8$ barel), domain B (diantara domain A dan C), dan domain C ($\alpha\beta$ sheet yang terhubung dengan domain A) [36]. Domain A terdiri dari 280-300 residu asam amino, merupakan pusat katalitik dengan triad katalitik Asp¹⁹⁷, Glu²³³, dan Asp³⁰⁰ [37]. Kalsium Ca²⁺ berada diantara domain A dan B kemungkinan berperan sebagai penstabil struktur tiga dimensi dan sebagai aktivator allosterik. Domain C tampaknya berupa domain yang independen dengan fungsi yang belum diketahui. Ion klorida terkadang ditemukan dalam beberapa α -amilase, terikat dekat sisi aktif untuk membantu reaksi katalisa.

Konsumsi zat yang bersifat inhibitor terhadap α -amilase di saliva atau usus, dan α -glukosidase di usus menyebabkan gangguan kerja enzim ini, sehingga menurunkan produk glukosa yang terserap dalam tubuh. Hal ini dapat membantu mengontrol level glukosa pada penderita DM. Beberapa metabolit sekunder seperti flavanoid, tanin, triterpenoid, dan fenolik memiliki aktivitas inhibitor terhadap α -amilase dengan aktivitas tertinggi dari golongan flavanoid [38].

2.7 Spektrofotometer UV-Vis

Pengukuran absorbansi dalam spektroskopi ultraviolet dan daerah tampak digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif bahan kimia. Absorpsi dalam daerah ultraviolet dan daerah tampak menyebabkan eksitasi elektron ikatan. Puncak absorpsi (λ_{maks}) dapat dihubungkan dengan jenis ikatan-ikatan yang terdapat pada spesies yang diukur

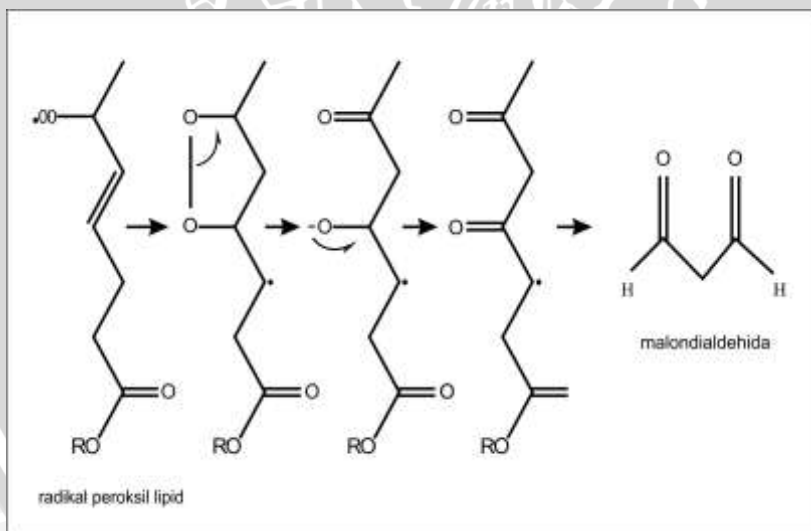
Absorbansi berbanding lurus terhadap konsentrasi. Hubungan antara absorbansi dan konsentrasi dijabarkan melalui persamaan Lambert-Beer [39].

$$A = a \cdot b \cdot c \text{ atau } A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

dimana a adalah absorptivitas analit dalam satuan $\text{cm}^{-1} \text{ppm}^{-1}$. Bila konsentrasi berupa molaritas maka absorptivitas diubah menjadi absorptivitas molar atau ekstingsi molar (ϵ) dengan satuan $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$.

2.8 Malondialdehid (MDA)

Keadaan hiperglikemia dapat menginduksi respon imun inflamasi dan stress oksidatif, serta kenaikan jumlah radikal bebas. Peningkatan jumlah radikal bebas di dalam tubuh akan menyebabkan modifikasi lipid, DNA, dan protein pada berbagai jaringan melalui siklus reaksi redoks yang bergantung pada $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ [40]. Salah satu contoh pembentukan radikal bebas adalah reaksi antara radikal bebas hidroksi dengan membran lipid, yang disebut dengan peroksidasi lipid akan menyebabkan kerusakan membran sel dan menghasilkan radikal Malondialdehid (MDA) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Selanjutnya ketidakseimbangan antara peningkatan kadar MDA dan penurunan kadar antioksidan endogen enzimatis, merupakan awal kerusakan oksidatif yang dikenal sebagai stress oksidatif.



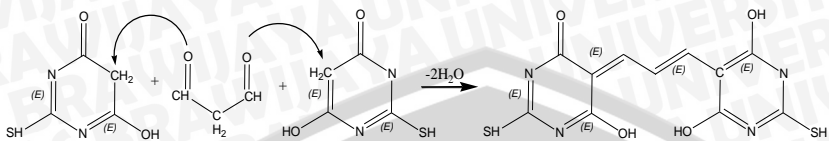
Gambar 2.7 Mekanisme pembentukan MDA dari peroksidasi lipid [41]

MDA merupakan senyawa organik dengan rumus molekul $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$. Senyawa ini golongan senyawa aldehid yang bersifat toksik dan sangat reaktif serta memiliki sifat mutagenik bagi sel manusia sehingga dapat memutasi gen DNA [42]. MDA merupakan produk hasil peroksidasi lipid dalam tubuh dan terdapat dalam bentuk atau terkompleks dengan jaringan, bahkan organ dalam tubuh. Reaksi ionisasi senyawa radikal bebas juga dapat membentuk MDA [43].

Senyawa aldehida dan keton seperti hidroksi alkenal dan MDA terbentuk dari bereaksinya molekul lemak dengan asam lemak tak-jenuh yang karbon metilennya telah teroksidasi, selanjutnya senyawa-senyawa ini telah diketahui bersifat toksik terhadap sel. Konsentrasi MDA dalam material biologi digunakan sebagai indikator kerusakan oksidatif pada lemak tak-jenuh sekaligus merupakan indikator keberadaan radikal bebas [43].

MDA penting dalam patogenesis pembuluh darah dalam komplikasi DM. Peningkatan MDA memiliki peran penting dalam kerusakan sel- β pankreas yang terkait dengan DM T1, hal tersebut ditunjukkan oleh jumlah radikal OH^* yang meningkat. Selanjutnya radikal OH^* akan membentuk reaksi rantai melalui pemberian 1 atom hidrogen dari membran sel, sehingga terjadi peroksidasi lipid. Dalam kondisi fisiologis, peroksida lipid ditemukan di dalam jaringan pada konsentrasi rendah, namun sebaliknya konsentrasi tinggi peroksida lipid ditunjukkan dalam plasma tikus diabetes [44].

Analisis MDA merupakan analisis radikal bebas secara tidak langsung dan mudah dalam menentukan jumlah radikal bebas yang terbentuk. Analisis radikal bebas secara langsung sangat sulit dilakukan, karena senyawa radikal sangat tidak stabil dan bersifat elektrofil, selain itu reaksinya pun berlangsung sangat cepat. Pengukuran MDA dapat dilakukan dengan pereaksi asam tiobarbiturat (*thiobarbituric acid*, TBA) dengan mekanisme reaksi penambahan nukleofilik membentuk senyawa MDA-TBA. Senyawa ini berwarna merah muda yang dapat diukur intensitasnya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm [43].



TBA

MDA

TBA

Merah Coklat

Gambar 2.8. Reaksi MDA dengan TBA

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB III Metode Penelitian

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan maret sampai dengan bulan juni 2014, di Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Biokimia, dan Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat penelitian

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 *eppendorf* 1,5 mL, rak tabung, mikropipet (20 - 1000 μ L), tabung propilen, pengangas air, neraca analitik (Mettler Lotedo AL 204) 4 digit belakang koma, 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 10,50,100ml, batang pengaduk, botol semprot, pipet tetes, tip 200 μ l, tip 1000 μ l, sarung tangan, *glucostick one touch ultra* dan glukometer digital (*One Touch Lifescan*), kertas saring, oven, penjepit (*block holder*), botol sampel, tisu, masker, aluminium foil, plastik *Wrap*, spidol marker, botol kaca, *skalpel* dan alat bedah, pisau mitokrom *Braun* no.21, plastik cetik, kertas label, termometer 0-100⁰C, cawan petri, mortar dan *pestle*, *freezer* suhu -20 ⁰C, kulkas 4 ⁰C, *hot plate*, mikropipet, *timer*, *magnetic stirrer*, *autoclave* (Electraozone sterilizer), pHmeter (Hanna Instruments HI 2211), sonikator.

3.2.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Ruellia tuberosa* L, tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain Wistar umur 2 bulan dengan berat rata-rata 100-210 gram sebanyak 18 ekor (tiap kandang 6 ekor tikus) yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang. Tikus dilakukan pembedahan tikus dibunuh

dengan cara dislokasi leher dan diambil organ usus. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapat sertifikat laik etik No.250-KEP-UB dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya.

3.2.3 Bahan kimia

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah aquades, metanol, n-hexan, Streptozotocin (STZ), NaCl fisiologis (0,9%), PBS-azida (*phosphate buffer saline-azida*), PBS pH 7, amilum, buffer sitrat pH 4,5, 3,5-*dinitrosalicylic acid* (DNS), *Trichloroacetic acid* (TCA), larutan baku MDA (BJ=0,997 g/L), Natrium-Thiobarbituric, HCl 1M, larutan 0,02 M Tris-HCl pH 6,5, PBS-tween PMSF, etanol absolut, Alkohol 70%.

3.3 Tahapan Penelitian

Adapun tahapan-tahapan penelitian adalah sebagai berikut:

1. Penyiapan tanaman
2. Pembuatan fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa L*
3. Penyiapan hewan coba tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain wistar
4. Pengukuran kadar glukosa darah dengan glukometer
5. Pembuatan larutan Streptozotocin (STZ) dan injeksi intraperitoneal (i.p) pada hewan coba
6. Terapi hewan coba DM dengan ekstrak *Ruellia tuberosa L*
7. Pembedahan hewan coba dan Pengambilan organ usus
8. Isolasi protein α -amilase usus
9. Pengujian aktivitas enzim α -amilase pada organ usus
10. Pengukuran kadar MDA dengan uji Thiobarbituric acid (TBA) pada organ usus
11. Analisis data

3.4 Metode Kerja

3.4.1 Penyiapan tanaman

Diambil 4 pucuk daun teratas beserta batang pletakan yang diperoleh di sekitar kecamatan Lawang-Malang. Daun dibersihkan, setelah itu dikeringkan pada suhu ruang dengan menghindari panas matahari langsung (*dried in shade*) selama ± 5 hari atau sampai kering. Kemudian daun pletakan yang telah kering diperkecil ukurannya.

3.4.2 Pembuatan fraksi n-heksan dari ekstrak metanol *Ruellia tuberosa* L.

Serbuk Pletakan kering (± 1000 g) diekstraksi dengan cara maserasi dalam pelarut metanol (3 L X 3) selama 72 jam. Ekstrak metanol dipisahkan menggunakan rotary evaporator dengan tekanan rendah. Ekstrak metanol pekat ditimbang dan dicatat. Ekstrak metanol pekat diekstrak dengan n-heksan (1:1) menggunakan corong pisah, dilakukan beberapa kali ekstraksi cair-cair dengan n-heksan hingga betul-betul terekstraksi optimal. Fraksi n-heksan diambil, dipisahkan dengan vakum rotary evaporator dan dicatat beratnya. Kemudian fraksi n-heksan ekstrak metanol dialiri dengan gas nitrogen dan ditimbang hingga mencapai berat konstan. Ekstrak pekat dari fraksi n-heksan dapat disimpan pada botol gelap pada suhu 4°C untuk pengujian selanjutnya.

3.4.3 Penyiapan hewan coba tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain wistar

Pada penyiapan hewan coba, tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang digunakan mempunyai berat badan 100-210 g dengan umur 2,5 bulan sebanyak 18 ekor yang dibagi dalam tiga kelompok, (A) kelompok tikus yang tidak diberikan perlakuan terapi (kontrol negatif); (B) kelompok tikus DM yang tidak diberikan terapi (kontrol positif); dan (C) kelompok tikus DM yang mendapatkan perlakuan terapi. Masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus dimana masing-masing kelompok tikus diberi tanda di bagian ekor untuk memudahkan pengamatan. Berat badan (BB) masing-masing hewan coba diukur untuk menentukan konsentrasi injeksi STZ per kg/BB tikus. Kondisi tikus dalam keadaan sehat yang ditandai oleh gerakan aktif, dan mata bersih.

Tikus dipelihara di Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler Jurusan Biologi, FMIPA-UB. Kotakan kandang berukuran 20 x 30 x 40 cm pada temperatur $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap. Sebelum percobaan, tikus diaklimatisasi selama 1 minggu. Selama percobaan, tikus diberi perlakuan sesuai *etical guidelines* yang dikeluarkan oleh komite etik.

3.4.4 Pegukuran kadar glukosa darah dengan glucometer pada awal, DM, dan terapi

Proses pengukuran kadar glukosa darah dilakukan sebanyak 3x, yaitu sebelum injeksi *Multiple Low Dose-Streptozotocin* (MLD-STZ) sebagai data kadar glukosa darah awal, setelah injeksi MLD-STZ bagi kelompok tikus DM (B) dan DM-terapi (C) sebagai data glukosa darah untuk memastikan bahwa hewan coba telah mengalami DM yang di tandai kadar gula darah >200 mg/dL, setelah terapi ekstrak *Ruelia tuberosa 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 menggunakan kit glucometer. Alat di set 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. Pengukuran glukosa darah dilakukan setelah tikus dipuasakan 12 jam. Uji dilakukan pada hari ke-0, hari ke-1, hari ke-5 dan hari ke-14 selama periode terapi.

3.4.5 Pembuatan larutan Strepzotocin (STZ) dan injeksi intraperitoneal (i.p) 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 *ependorf* dan siap untuk diinjeksikan.

Digunakan dosis 20 mg/kg BB sebanyak 5 kali yang dilakukan berturut-turut. Tikus diposisikan menghadap kearah frontal hingga terlihat bagian abdomenya. Pada bagian atas abdomen

tikus disemprot dengan ethanol 70%, kulit dicubit hingga terasa bagian ototnya, spuit dimasukkan pada bagian abdomen dan dicoba digerakkan, apabila terasa berat maka sudah masuk pada daerah intraperitoneal. Setelah yakin pada daerah intraperitoneal maka STZ segera dimasukkan secara perlahan. Selanjutnya abdomen tikus di semprot 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.

3.4.6 Terapi hewan coba DM dengan ekstrak *Ruellia tuberosa* L

Setelah kelompok tikus kelompok B (sakit), dan C (terapi) dinyatakan DM, tikus diterapi. Tikus kelompok A (sehat) dan B (sakit) diberi minyak jagung sebanyak 2 mL. Tikus DM kelompok C diterapi dengan fraksi n-heksan ekstrak metanol dosis 450/kg BB yang dilarutkan dalam 12 ml minyak jagung selama 14 hari (14 hari berturut-turut dosis tunggal). Pemberian terapi dilakukan dengan cara oral (sonde). Volume agen terapi yang diberikan sebanyak 2 mL berdasarkan ukuran rata-rata lambung tikus putih.

3.4.7 Pembedahan hewan coba dan pengambilan organ usus

Sebelum dilakukan pembedahan tikus dibunuh dengan cara dislokasi leher. Skalpel dan alat bedah disiapkan untuk membantu mengambil organ usus. Setelah tikus mati, hewan coba diletakkan pada nampan bedah dan ditata pada posisi ventral diatas. Diambil usus yang terletak terletak di antara lambung dan usus besar dan dicuci dengan NaCl fisiologis dan direndam dalam PBS-azida dan diberi label kemudian disimpan dalam suhu 4°C.

3.4.8 Isolasi protein α -amilase usus

Diambil organ usus yang telah diperoleh dan ditimbang sebanyak 0,5 g untuk mengetahui massanya. Kemudian ditambahkan dengan larutan PBS-tween PMSF sebanyak 5 kali volume dari sampel. Setelah itu, ditambah sedikit pasir kuarsa untuk mempermudah penggerusan organ. Organ digerus dengan mortar dingin yang diletakkan di atas balok es. Setelah diperoleh homogenat dimasukkan ke dalam tabung polipropilen yang telah disterilisasi dengan *autoclaf*. Kemudian dihomogenkan dengan vortex selama 10 menit, selanjutnya disonikasi dengan sonikator selama 10 menit dan

disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Supernatan yang diperoleh diambil dan ditambahkan dengan etanol absolute dingin dengan perbandingan 1:1 pada pendingin -20°C kemudian didiamkan selama satu hari hingga terbentuk endapan. Setelah itu disentrifugasi kembali selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Kemudian endapan diambil dan dikering-anginkan sampai bau etanol menghilang. Endapan yang diperoleh ditambahkan dengan larutan 0,02 M Tris-HCl pH 6,5 dengan perbandingan 1:1, selanjutnya diperoleh ekstrak kasar dari protein.

3.4.9 Pengujian aktivitas α -amilase pada organ usus

3.4.9.1 Pembuatan kurva standar glukosa

Dilartukan 250 mg glukosa dalam 250 ml aquades. Larutan tersebut kemudian diencerkan sehingga diperoleh stok standar dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan stok dibuat variasi konsentrasi larutan standar glukosa 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, dan 1000 ppm. Diambil 250 μl . Ditambahkan amilum 250 μl . Diinkubasi dengan suhu 30°C selama 20 menit. Kemudian larutan stok standar glukosa ditambah dengan 500 μl DNS, Kemudian larutan dipanaskan selama 10 menit. Setelah larutan panas lalu didinginkan dengan air mengalir. Dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm. Dengan regresi linear, dari hasil absorbansi dan konsentrasi glukosa, maka akan didapatkan persamaan matematik untuk standar glukosa, yang akan digunakan dalam pengukuran kadar enzim.

3.4.9.2 Pengukuran aktivitas enzim α -amilase pada organ usus

Diambil filtrat enzim hasil isolasi sebanyak 250 μl dan ditambahkan dengan 250 μl larutan amilum 1 %, kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 30°C . Setelah itu ditambahkan 500 μl DNS (3,5 dinitro salicylic acid). Kemudian larutan dipanaskan selama 10 menit. Setelah larutan panas, didinginkan dengan air mengalir dan ditambahkan 5 mL aquades. Kemudian diukur absorbansinya dengan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 550 nm. Aktivitas enzim α -amilase dapat dihitung dengan persamaan berikut:

Aktivitas enzim α -amilase = $C \times 1/T \times 1$ unit/1mikromol

dimana:

C = Konsentrasi glukosa per mL ekstrak enzim (mikromol)

T = Waktu inkubasi (menit)

1 unit enzim α -amilase = besarnya aktivitas enzim yang dibutuhkan untuk membebaskan 1 mikromol glukosa per menit per mL enzim.

3.4.10 Pengukuran kadar MDA dengan uji Thiobarbituric acid (TBA) pada organ usus

3.4.10.1 Pembuatan kurva standar Malondialdehid (MDA)

Larutan standar Malondialdehid (MDA) dengan variasi konsentrasi 0,1,2,3,4,5,6,7 dan 8 $\mu\text{g/mL}$ diambil masing-masing 100 μL , dimasukkan dalam tabung eppendorf yang berbeda. Kemudian ditambahkan 550 μL akuades pada masing-masing tabung eppendorf. Larutan standar ditambahkan 100 μL TCA 4%, 250 μL HCl 1 N dan 100 μL Natrium-Thiobarbiturat 1%. Pada setiap penambahan reagen, larutan campuran tersebut dihomogenkan dengan vortex. Eppendorf ditutup dengan aluminium foil untuk menghindari fluoresensi. Diinkubasi dalam penangas air pada posisi mengapung dengan suhu 100°C selama 30 menit. Kemudian larutan standar didinginkan pada suhu ruang. Selanjutnya MDA dengan konsentrasi 4 $\mu\text{g/mL}$ diukur absorbansinya pada range panjang gelombang 500-570 nm untuk menentukan λ_{max} MDA. Dari hasil λ_{max} tersebut, dapat dibuat kurva standar MDA dan didapatkan nilai absorbansi pada variasi konsentrasi (1,2,3,4,5,6,7 dan 8 $\mu\text{g/mL}$).

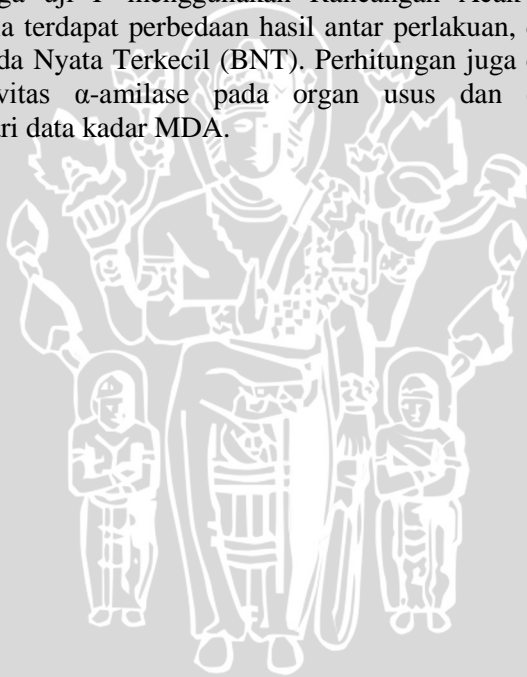
3.4.10.2 Pengukuran kadar MDA menggunakan uji Thiobarbituric Acid (TBA)

Organ usus sebanyak 0,5 gram dipotong kecil-kecil lalu digerus dalam mortar dingin yang diletakkan di atas balok es dan ditambahkan 1 mL NaCl fisiologis. Selanjutnya homogenat dipindah kedalam tabung eppendorf kecil dan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 20 menit dan diambil supernatannya. Supernatan diambil 100 μL , ditambah 550 μL akuades, 100 μL TCA 4%, 250 μL HCl 1N, dan 100 μL Natrium-Thiobarbiturat 1%. Pada setiap penambahan reagen, larutan campuran tersebut dihomogenkan

dengan vortex. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit. Lalu supernatan dipisahkan dan dipindahkan pada tabung eppendorf baru. Eppendorf ditutup dengan aluminium foil untuk menghindari fluoresensi. Larutan diinkubasi dalam penangas air pada posisi mengapung pada suhu 100°C selama 30 menit. Sampel diukur absorbansinya pada λ_{max} (530 nm) untuk uji TBA dan diplotkan pada kurva standar yang telah dibuat untuk menghitung konsentrasi sampel.

3.4.11 Analisa data

Pada analisa glukosa darah didapatkan data yang digunakan untuk melihat persentase efektifitas pemberian terapi. Data ini akan dianalisis dengan uji F menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Apabila terdapat perbedaan hasil antar perlakuan, dilakukan uji analisis Beda Nyata Terkecil (BNT). Perhitungan juga dilakukan terhadap aktivitas α -amilase pada organ usus dan dilakukan perhitungan dari data kadar MDA.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Fraksi n-heksan dari Ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa* l.

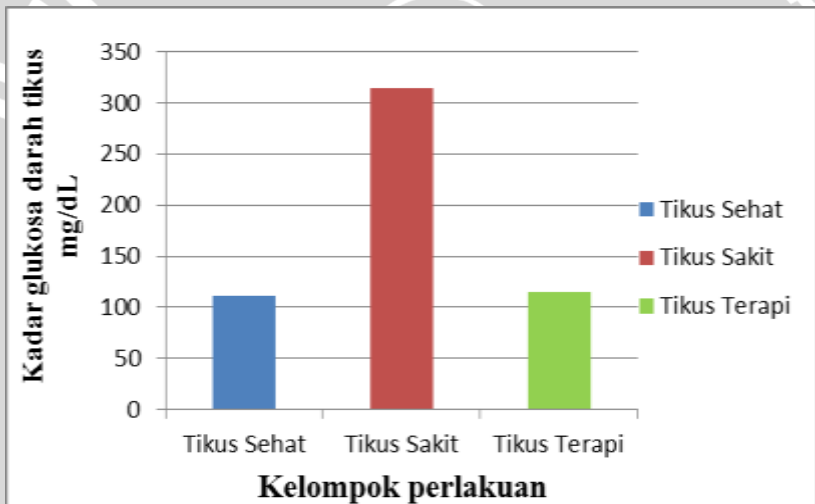
Pada penelitian dari hasil ekstraksi didapatkan ekstrak dalam fraksi n-heksan sebanyak 16,93 gram yang diduga mengandung komponen polifenol yang dapat berperan sebagai inhibitor enzim α -amilase, penetralisir radikal bebas, serta dapat menurunkan kadar malondialdehid. Hal ini didukung dengan penelitian yang dilakukan oleh Chwan Fwu-Lin (2006) dari ekstraksi 12,5 Kg simplisia bagian batang dan daun pletakan dengan pelarut metanol, menghasilkan ekstrak yang mengandung 5 flavonoid yaitu: cismartin (1, 54,2 mg), cirsimaritin (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), dan komponen terbanyak dari fraksi etil asetat adalah triterpenoid berupa betulin, dan fraksi n-heksan mengandung polifenol dan fitosterol. Sebaiknya untuk membuktikan adanya senyawa polifenol pada fraksi n-heksan ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa* l. dilakukan analisis Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi Cair Spektrofotometri Massa (LC-MS).

4.2 Kadar Glukosa Darah Tikus Hasil Induksi MLD-STZ dan Terapi Fraksi n-heksan metanol daun *Ruellia tuberosa* l.

Penyiapan tikus diabetes dilakukan dengan injeksi streptozotocin dosis rendah berulang (MLD-STZ) secara intraperitoneal (i.p). Pemberian streptozotocin dengan cara dosis rendah berulang (MLD-STZ) pada tikus dengan dosis 20 mg/kg BB/hari selama 5 hari secara intraperitoneal menyebabkan tikus menderita DM, ditandai dengan kerusakan sel β pankreas dan peningkatan kadar glukosa darah. Streptozotocin (STZ) merupakan nitrosourea yang bersifat sitotoksik spesifik bagi sel beta pankreas.

Tabel 4.2 Kadar Glukosa Darah Tikus Sehat, Tikus Sakit, dan Tikus Terapi

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Kadar Glukosa Darah (mg/dL)
Tikus Sehat	$111.67 \pm 9,56$
Tikus Sakit	314.5 ± 98.86
Tikus Terapi	114.5 ± 21.28



Gambar 4.2 Perbandingan kadar glukosa darah tikus sehat, tikus sakit, dan tikus terapi (sesudah terapi)

Berdasarkan hasil penelitian (Tabel 4.2 dan Gambar 4.2), menunjukkan bahwa kadar glukosa darah kelompok tikus sehat yaitu $111.67 \pm 9,56$ mg/dL termasuk dalam rentang kadar glukosa darah tikus normal. Sedangkan kadar glukosa darah tikus sakit yang terinduksi MLD-STZ mengalami kenaikan kadar glukosa darah yaitu 314.5 ± 98.86 mg/dL termasuk dalam rentang kadar glukosa darah tikus sakit yaitu > 200 mg/dL. Kadar glukosa darah tikus terapi

fraksi n-heksan ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l* yaitu $(114,5 \pm 21,28)$ mg/dL termasuk dalam rentang kadar glukosa darah tikus normal. Dari hasil analisis statistika menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata antara kadar glukosa darah pada tikus sehat dengan tikus sakit yang diinduksi dengan MLD-STZ. Peningkatan kadar glukosa darah pada tikus yang diinduksi dengan MLD-STZ terjadi karena kerusakan sel beta pankreas melalui autoimun sehingga menimbulkan terjadinya DM.

Pemberian fraksi n-heksan ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l* memberikan hasil penurunan kadar glukosa darah yang mendekati kadar glukosa darah tikus sehat. Dari hasil analisis statistika menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata antara kadar glukosa darah pada tikus terapi dengan tikus sakit yang diinduksi dengan MLD-STZ. Penurunan kadar glukosa darah setelah terapi ini terjadi karena adanya perbaikan sel beta pankreas, sehingga sekresi insulin akan meningkat akibatnya glukosa dalam darah dapat diedarkan ke dalam sel sehingga dapat diubah menjadi energi atau disimpan dalam bentuk glikogen. Perbaikan sel beta pankreas terkait dengan senyawa-senyawa yang terkandung dalam fraksi n-heksan ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l* yaitu flavonoid terbukti memiliki aktivitas antioksidan.

4.3 Pengaruh Pemberian Fraksi n-heksan Ekstrak Metanol *Ruellia tuberosa l* Terhadap Aktivitas Enzim α -Amilase Pada Organ Usus Halus

Usus halus atau usus kecil adalah bagian dari saluran pencernaan yang terletak di antara lambung dan usus besar. Usus halus terdiri dari tiga bagian yaitu usus dua belas jari (duodenum), usus kosong (jejunum), dan usus penyerapan (ileum). Aktivitas enzim α -amilase pada organ usus duodenum, jejunum, dan ileum akibat paparan MLD-STZ dan terapi fraksi n-heksan dari ekstrakmetanol daun *Ruellia tubesrossa l* diamati melalui uji aktivitas enzim α -amilase hasil isolasi organ usus halus tikus (*Rattus norvegicus*).

Tabel 4.3.1 Rataan Aktivitas α -amilase Hasil Isolasi Usus (Duodenum) Tikus

Perlakuan	Rataan Aktivitas α -amilase ($\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$)	Peningkatan Aktivitas α -amilase (%)	Penurunan Aktivitas α -amilase (%)
Tikus Sehat	0,881 \pm 0,084	0	0
Tikus Sakit	1,205 \pm 0,036	47,39	
Tikus Terapi	0,912 \pm 0,104		20,5

Berdasarkan hasil penelitian (Tabel 4.3.1) menunjukkan bahwa aktivitas α -amilase organ usus Duodenum kelompok tikus sehat yaitu (0,881 \pm 0,084) $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$. Sedangkan aktivitas α -amilase organ usus Duodenum kelompok tikus sakit yaitu (1,205 \pm 0,036) $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$, dan aktivitas α -amilase kelompok tikus terapi yaitu (0,912 \pm 0,104) $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$. Induksi MLD-STZ dosis 20 mg/kg BB dapat meningkatkan aktivitas α -amilase sebesar 47,39% pada tikus yang diinduksi dengan MLD-STZ dibandingkan dengan tikus sehat. Pemberian fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l* mampu menurunkan aktivitas α -amilase sebesar 20,5%. Dari hasil analisis statistika menunjukkan bahwa aktivitas α -amilase tikus sehat dengan tikus sakit pada organ usus Duodenum yang diinduksi dengan MLD-STZ terdapat perbedaan yang sangat nyata, sedangkan fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l* mampu menurunkan aktivitas α -amilase juga menunjukkan berbeda nyata dengan nilai BNT 1% sebesar 0,17.

Tabel 4.3.2 Rataan Aktivitas α -amilase Hasil Isolasi Usus (Jejunum) Tikus

Perlakuan	Rataan Aktivitas α -amilase ($\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$)	Peningkatan Aktivitas α -amilase (%)	Penurunan Aktivitas α -amilase (%)
Tikus Sehat	0,608 \pm 0,075	0	0
Tikus Sakit	0,994 \pm 0,058	38,23	
Tikus Terapi	0,494 \pm 0,050		65,11

Dari hasil penelitian (Tabel 4.3.2) menunjukkan bahwa aktivitas α -amilase organ usus Jejunum kelompok tikus sehat yaitu (0,608 \pm 0,075) $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$. Sedangkan aktivitas α -amilase organ usus Jejunum kelompok tikus sakit yaitu (0,994 \pm 0,058) $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$, dan aktivitas α -amilase organ usus Jejunum kelompok tikus terapi yaitu (0,494 \pm 0,050) $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$. Induksi MLD-STZ dosis 20 mg/kg BB dapat meningkatkan aktivitas α -amilase sebesar 38,23% pada tikus yang diinduksi dengan MLD-STZ dibandingkan dengan tikus sehat. Pemberian fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa* l mampu menurunkan aktivitas α -amilase sebesar 65,11%. Dari hasil analisis statistika menunjukkan bahwa aktivitas α -amilase tikus sehat dengan tikus sakit pada organ usus Jejunum yang diinduksi dengan MLD-STZ terdapat perbedaan yang sangat nyata, sedangkan pemberian fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa* l mampu menurunkan aktivitas α -amilase juga menunjukkan berbeda nyata dengan nilai BNT 1% sebesar 0,105.

Tabel 4.3.3 Rataan Aktivitas α -amilase Hasil Isolasi Usus Ileum Tikus

Perlakuan	Rataan Aktivitas α -amilase ($\mu\text{mol/mL.menit}$)	Peningkatan Aktivitas α -amilase (%)	Penurunan Aktivitas α -amilase (%)
Tikus Sehat	0,255 \pm 0,035	0	0
Tikus Sakit	0,502 \pm 0,031	49,2	
Tikus Terapi	0,378 \pm 0,043		32,8

Hasil penelitian (Tabel 4.3.3) menunjukkan bahwa aktivitas α -amilase organ usus Ileum kelompok tikus sehat yaitu (0,255 \pm 0,035) $\mu\text{mol/mL.menit}$. Sedangkan aktivitas α -amilase organ usus Ileum kelompok tikus sakit yaitu (0,502 \pm 0,031) $\mu\text{mol/mL.menit}$, dan aktivitas α -amilase organ usus Ileum kelompok tikus terapi yaitu (0,378 \pm 0,043) $\mu\text{mol/mL.menit}$. Induksi MLD-STZ dosis 20 mg/kg BB dapat meningkatkan aktivitas α -amilase sebesar 49,2% pada tikus yang diinduksi dengan MLD-STZ dibandingkan dengan tikus sehat. Pemberian fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l* mampu menurunkan aktivitas α -amilase sebesar 32,8%. Dari hasil analisis statistika menunjukkan bahwa aktivitas α -amilase tikus sehat dengan tikus sakit pada organ usus Ileum yang diinduksi dengan MLD-STZ terdapat perbedaan yang sangat nyata, sedangkan pemberian fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l* mampu menurunkan aktivitas α -amilase juga menunjukkan berbeda nyata dengan nilai BNT 1% sebesar 0,0723.

Penurunan aktivitas enzim α -amilase disebabkan adanya komponen polifenol yang terkandung dalam fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l* yang bertindak sebagai inhibitor enzim α -amilase. Adanya inhibitor α -amilase dapat memperlambat pencernaan pati dan penyerapan glukosa sehingga dapat menurunkan glukosa dalam darah.

4.4 Profil Malondialdehid (MDA) pada Usus Halus Tikus DM Hasil Induksi MLD-STZ dan Terapi Fraksi n-heksan dari Ekstrak Metanol Daun *Ruellia tuberosa* l

Pada penelitian menunjukkan bahwa terapi fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa* l dapat digunakan sebagai terapi tikus putih jantan yang terpapar MLD-STZ dengan dosis 20 mg/kg BB tikus selama 5 hari berturut-turut secara intraperitorial yang dapat menyebabkan tikus menderita DM.

Tabel 4.4.1 Kadar MDA Tikus Sehat, Tikus Hasil Induksi MLD-STZ dan Tikus Hasil Terapi Fraksi n-heksan dari Ekstrak Metanol *Ruellia tuberosa* l pada organ Duodenum

Perlakuan	Rata-rata Kadar MDA (µg/mL)	Peningkatan Kerusakan Oksidatif (%)	Penurunan Kerusakan Oksidatif (%)
Tikus Sehat	4,551±0,271	0	0
Tikus Sakit	7,467±0,172	65,52	
Tikus Terapi	5,279±0,222		29,30

Tabel 4.4.2 Kadar MDA Tikus Sehat, Tikus Hasil Induksi MLD-STZ dan Tikus Hasil Terapi Fraksi n-heksan dari Ekstrak Metanol *Ruellia tuberosa* l pada organ Jejunum

Perlakuan	Rata-rata Kadar MDA (µg/mL)	Peningkatan Kerusakan Oksidatif (%)	Penurunan Kerusakan Oksidatif (%)
Tikus Sehat	4,072±0,149	0	0
Tikus Sakit	7,508±0,190	84,38	

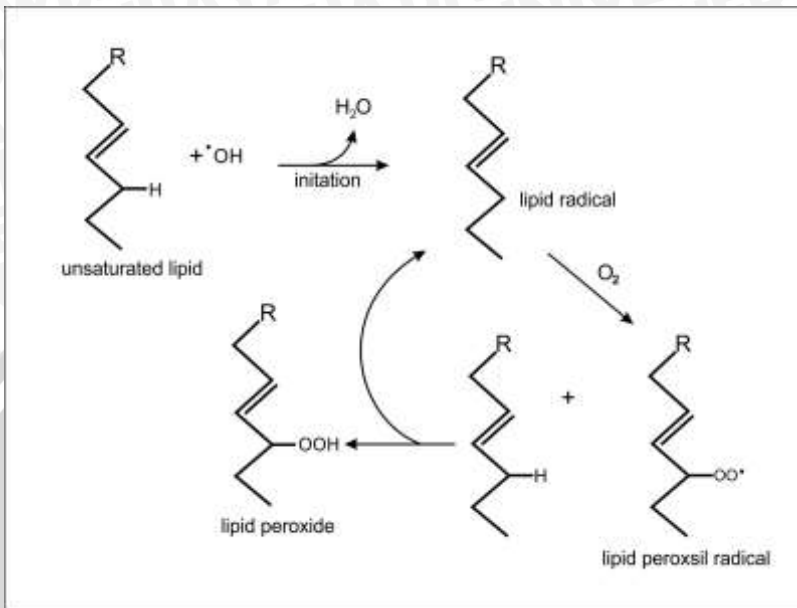
Tikus Terapi	4,616±0,185	38,52
--------------	-------------	-------

Tabel 4.4.3 Kadar MDA Tikus Sehat, Tikus Hasil Induksi MLD-STZ dan Tikus Hasil Terapi Fraksi n-heksan dari Ekstrak Metanol *Ruellia tuberosa l* pada organ Ileum

Perlakuan	Rata-rata Kadar MDA (µg/mL)	Peningkatan Kerusakan Oksidatif (%)	Penurunan Kerusakan Oksidatif (%)
Tikus Sehat	4,271±0,125	0	0
Tikus Sakit	7,256±0,187	69,89	
Tikus Terapi	5,350±0,195		26,26

Kadar MDA tikus hasil induksi MLD-STZ pada organ Duodenum, Jejunum dan Ileum lebih tinggi daripada kadar MDA pada tikus sehat dan tikus terapi fraksi n-heksan ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l*. Hal ini menunjukkan bahwa paparan MLD-STZ dapat menyebabkan peroksidasi lipid dan meningkatkan kadar MDA pada usus halus. Terapi Pemberian fraksi n-heksan ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l* dapat menurunkan kadar MDA pada organ Duodenum, Jejunum, Ileum berturut-turut sebesar 29,30 %, 38,52 %, dan 26,26%. Hal ini juga sesuai dengan hasil statistik bahwa Pemberian fraksi n-heksan ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l* berbeda secara signifikan ($p < 0,01$) dengan tikus sakit diabetes mellitus. Hal ini menunjukkan adanya penghambatan peroksidasi lipid oleh fraksi n-heksan ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l* yang mampu menangkap radikal bebas.

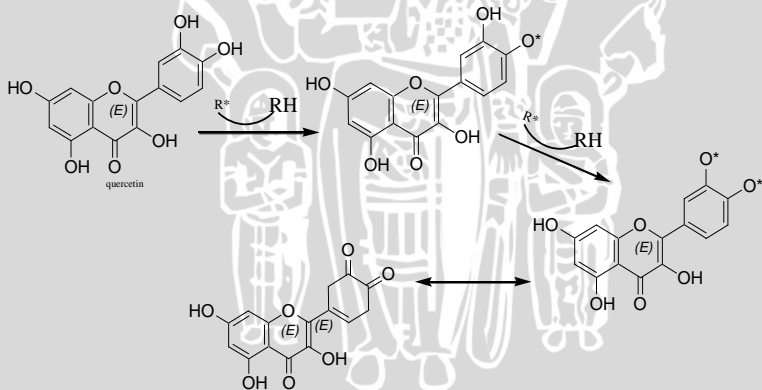
Paparan MLD-STZ dapat meningkatkan produksi radikal bebas berlebih dan memicu terjadinya stress oksidatif. Stress oksidatif merupakan keadaan dimana jumlah oksidan (radikal bebas) dan antioksidan tidak seimbang di dalam tubuh.



Gambar 4.4 Mekanisme Reaksi Peroksidasi Lipid

Mekanisme reaksi peroksidasi lipid diawali dengan inisiasi yang meliputi pengambilan atom hidrogen dari asam lemak tak jenuh oleh oksigen bebas yang terdapat pada OH^* . Radikal lipid dapat mengalami penataan ulang membentuk diena terkonjugasi. Apabila radikal lipid tersebut bereaksi dengan oksigen (O_2), maka akan terjadi reaksi propagasi antara pentadienil dengan O_2 membentuk radikal peroksil (ROO^*). Hasil dari reaksi ini akan menjadi inisiator baru untuk bereaksi dengan asam lemak tak jenuh yang lain sehingga menghasilkan produk radikal baru berupa lipid hidroperoksida (ROOH). Lipid hidroperoksida merupakan produk primer peroksidasi yang bersifat sitotoksik. Langkah selanjutnya adalah reaksi terminasi, yaitu kombinasi dua radikal menjadi suatu produk non radikal. Reaksi peroksidasi asam lemak tak jenuh terus berlangsung hingga dihasilkan metabolit sekunder, salah satunya adalah Malondialdehid (MDA) yang merupakan hasil akhir dari peroksidasi asam arakidonat dan beberapa asam lemak tak jenuh yang lain.

Kandungan polifenol terutama flavonoid yang terdapat pada fraksi n-heksan ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l* dapat menghambat peroksidasi lipid pada usus tikus diabetes mellitus hasil induksi MLD-STZ karena flavonoid dapat bertindak sebagai *scavenger* radikal bebas. Adanya gugus hidroksi tersubstitusi pada posisi ortho dan para terhadap gugus $-OH$ dan $-OR$ dapat memberikan efek antioksidan. Peredaman radikal bebas senyawa flavonoid dipengaruhi oleh jumlah dan posisi hidrogen fenolik dalam molekulnya. Flavonoid memiliki kemampuan mendonorkan atom hidrogen (H) dari gugus hidroksil (OH) fenolik saat bereaksi dengan radikal bebas (R^*). Reaksi ini menghasilkan radikal fenoksil flavonoid (FIO*) yang memiliki reaktivitas lebih rendah. Radikal fenoksil flavonoid (FIO*) dapat diserang kembali sehingga terbentuk fenoksil flavonoid (FIO*) kedua. Radikal fenoksil flavonoid (FIO*) memiliki ikatan rangkap terkonjugasi yang dapat menstabilkan stukturanya dengan delokalisasi electron ataupun resonansi sehingga melalui reaksi tersebut flavonoid dapat menghambat peroksidasi lipid yang diinisiasi oleh radikal bebas. Reaksi *scavenging* (penangkapan) radikal bebas oleh flavonoid diperlihatkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Reaksi *scavenging* radikal bebas oleh flavonoid

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l* dapat memberikan pengaruh terhadap aktivitas enzim α -amilase usus tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan MLD-STZ ditunjukkan dengan semakin berkurangnya aktivitas enzim α -amilase setelah diterapi.
2. Pemberian fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l* mampu menurunkan kadar MDA pada organ usus halus (Duodenum, Jejunum, Ileum) tikus diabetes mellitus hasil induksi MLD-STZ berturut-turut sebesar 29,30 %, 38,52 %, dan 26,26 %.

5.2 Saran

Untuk penelitian lanjutan sebaiknya dilakukan analisis Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi Cair Spektrofotometri Massa (LC-MS) pada fraksi n-heksan ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l*.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Suyono, S., 2010, **Diabetes Melitus di Indonesia**, Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam, Edisi V, Interna Publishing, Jakarta Pusat.
- [2] Alla Alwan., 2011, **Global status report on noncommunicable diseases 2010**, WHO press, www.who.int/nmh/publications/ncd_report_full_en.pdf, diakses tanggal 10 Februari 2014.
- [3] Mathew C, Van Holde, G Ahern., 2000, **Biochemistry**, third edition. Addison-weasley Publishing Company, San Fransisco.
- [4] Mosaad, A., A. Seif, dan A.A. Youssef., 2004, **Evaluation of Some Biochemical Changes in Diabetic Patiens**, *Clinica Chimica Acta*, Vol. 346, pp. 161-170.
- [5] M. Rajan, V.Kishor Kumar, Satheesh Kumar, Kotam Reddy Swathi, Sangam Haritha., 2012, **Antidiabetic, antihyperlipidaemic / and hepatoprotective activity of methanolic extract of Ruellia tuberosa Linn leaves in normal and alloxan induced diabetic rats**, *Jurnal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 4(6): 2860-2868.
- [6] Durre Shahwar, Saif Ullaha, Mobasher Ahmad, Semi Ullah, Naeem Ahmad, Muhammad Akmal Khan., 2011, **Hypoglycemic Activity of Ruellia tuberosa Linn (Acanthaceae) in Normal and Alloxan-Induced Diabetic Rabbit**. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 7(2): 107–115.
- [7] Chwan-Fwu Lin, Yu-Ling Huang, Lee-Ying Cheng, Shuenn-Jyi Sheu and Chien-Chih Chen., 2006, **Bioactive flavonoids from Ruellia tuberosa**. *J Chin Med* 17(3): 103-109.
- [8] Alqahtani, A.; Hamid, K.; Kam, A.; Wong, K.H.; Abdelhak, and Z.; Razmovski-Naumovski, V.; Chan, K.; Li, K.M.; Groundwater, P.W.; Li, G.Q., 2013, **The Pentacyclic Triterpenoids in Herbal Medicines and Their Pharmacological Activities in Diabetes**

and Diabetic Complications, Current Medicinal Chemistry, Vol. 20,7: 908-931.

- [9] Karthic K, Kirthiram KS, Sadasivam S, Thayumanavan B., 2008, **Identification of α -amylase inhibitors from *Syzygium cumini* Linn seeds**, Indian J, Exp. Biol, 2008; 46: 677-680.
- [10] D'adamo, P.J., 2008, **Diet Sehat Diabetes sesuai Golongan Darah**, Delapratasa, Yogyakarta.
- [11] World Health Organization, 2012, Diabetes Mellitus, <http://www.who.int/mediacentre/factsheet/fs138/en>, diakses tanggal 10 februari 2014.
- [12] Dannis L., Dan L, Eugene B, Stephen L, Jameson J. Harrison., 2005, **Principles of Internal Medicine**, McGraw-Hill, New York.
- [13] Soegondo, Sidartawan., 2007, **Penatalaksanaan Diabetes Mellitus Terpadu**, Balai Penerbit FKUI, Jakarta.
- [14] Sari, 2002, **Gambaran Klinis dan Laboratoris Diabetes Mellitus tipe-1 pada Anak Saat Pertama Kali Datang ke Bagian IKA-RSCM**, Vol: 4(1):26-30, Jakarta.
- [15] Boolatin, R.A., and K.A. Stiles., 1991, **College Zoology**, 10th Edition. Mc Millan Publishing, Co, Inc. Boston.
- [16] Sirois, M., 2005, **Laboratory Animal Medicine : Principles and Procedures**, Elsevier Mosby.St. Louis, Missouri, USA.
- [17] Ress, D.A., and J.C. Alcolado., 2005, **Animal Models of Diabetes Mellitus**, Diabetic Medicine, 22: 359-370.
- [18] Ivorra MD, Paya M, and Villar A., 1990, **Effect of beta-sitosterol-3-beta-D-glucoside on insulin secretion in vivo in diabetic rats and in vitro in isolated rat islets of Langerhans**, Pharmazie. 45(4):271-3
- [19] Sebastian Jäger, Melanie N. Laszczyk, and Armin Scheffler., 2008, **A Preliminary Pharmacokinetic Study of Betulin, the Main Pentacyclic Triterpene from Extract of Outer Bark of Birch (*Betulae alba cortex*)**, J. Molecules 2008, 13, 3224-3235.
- [20] Green, B.; Bentley, M.B.; Chung, B.Y.; Lynch, N.G.; and Jensen, B.L, 2007, **Allobetulin and its derivatives:**

Synthesis and biological activity, J. Chem. Educ. 84, 1985–1987.

- [21] Agnieszka Szuster-Ciesielska, Krzysztof Plewka, Jadwiga Daniluk, Martyna Kandefor-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 influencing intracellular signaling**. Toxicology. Vol 280, 3:152-163.
- [22] Duo-Bin Mao, Yong-Qiang Feng, Yan-Hong Bai, and Chun-Ping Xu., 2012, **Novel biotransformation of betulin to produce betulone by Rhodotorula mucilaginosa**. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 43: 825–829.
- [23] Lin YC, Cheng HY, Huang TH, Huang HW, Lee YH, Peng WH., 2009. **Analgesic and anti-inflammatory activities of Torenia concolor Lindley var. formosana Yamazaki and betulin in mice**. Am J Chin Med. 37(1):97-111.
- [24] Atta-ur-Rahman, Seema Zareen, M. Iqbal Choudhary,* M. Nadeem Akhtar, and Shamsun Nahar Khan., 2008. **α -Glucosidase Inhibitory Activity of Triterpenoids from Cichorium intybus**, J. Nat. Prod. 71: 910–913.
- [25] Guyton A.C., and Hall J.E., 2005, Buku Ajar Fisiologi Kedokteran, Edisi ke-9, EGC, Jakarta.
- [26] Manif Niko, Kartadinata., 2008, **Obstruksi Ileus**, Cermin Dunia, Jakarta.
- [27] Akbarzadeh, A., D. Norouzian, M.R. Mehrabi, Sh. Jamshidi, A. Farhang, A. Allahverdi, M.A. Mofidian and B.L. Rad, 2007, **Induction Of Diabetes By Streptozotocin In Rats**, vol.22(2): 60-64, Indian Journal of Clinical Biochemistry, India
- [28] Hussain H.E.M., 2002, **Reverse of Diabetic Retinopathy in Streptozotocin Induced Diabetic Rats Using Tradisional Indian Anti Diabetic Plan**

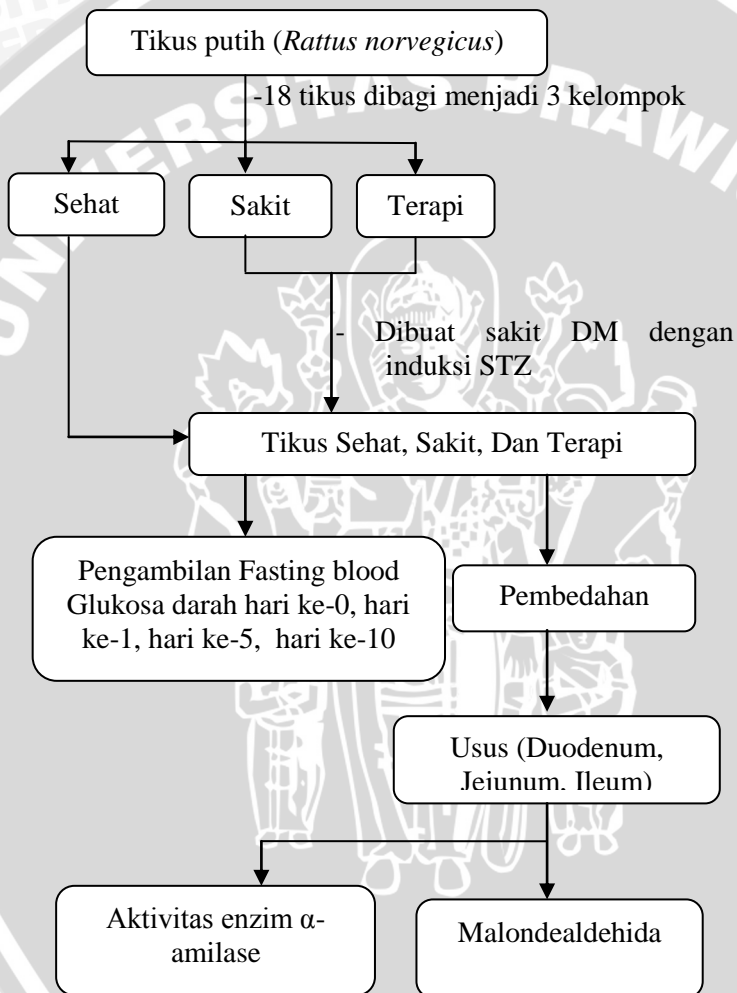
- Azadirachta Indika (L)**, Vol.17 (2): 115-123, Indian Journal of Clinical Biochemistry, India.
- [29] Palmer, J.P., 1997, **What is The Best Way to Predict IDDM**, Lancet, Vol 343:1377-1378.
- [30] Nugroho, E. A., 2006, **Hewan Percobaan Diabetes Mellitus : Patologi dan Mekanisme Aksi Diabetogenik**, Biodiversitas, Vol.7 No.4, hal. 378-382.
- [31] Elias, D., H. Prigozin., N. Polak., M. Rapoport., W. Lohse., and I. R. Cohen., 1994, **Autoimmun Diabetes Induced By The Beta Cell Toxin STZ Immunity to The 60 kDa Heat Shock Protein and to Insulin**, Diabetes 48: 992-998.
- [32] Szkudelski, T., 2001, **The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cell of The Rat Pancreas**, T. Physiol. Res.50:536-546.
- [33] Nurdiana, N.P., Setyawati, dan A. Mulyohadi, 1998, **Efek Streptozotocin sebagai Bahan Diabetogenik pada Tikus Wistar dengan Cara Pemberian Intraperitoneal dan Intravena**, Majalah Kedokteran Unibraw, Vol XIV/2/1998, hal. 66-73.
- [34] Sobreira A.G., Nascimento R.S., Taborda M.L., CunhaMorales A.A., Pepe deMoraes L., Araripe F.G.T., SoniaMaria dan Jos'e C.U., 2011, **Biochemical And Structural Characterization Of Amy1: An Alpha- Amylase Fromcryptococcus Flavus Expressed In Saccharomyces Cerevisiae**, SAGE-Hindawi access to research, enzyme research, volume 2011, Article ID 157294, 2-5.
- [35] Ramasubbu N, Paloth V, Luo Y, Brayer GD, Levine MJ., 1996, **Structure of human salivary alphaamylase at 1.6 A resolution: Implications for its role in the oral cavity**, Acta Crystallogr., Sect. D.: Biol. Crystallogr. 52: 435-446.
- [36] Van der Maarel MJEC, Van der Veen B, Uitdehaag JC, Leemhuis H, Dijkhuizen L., 2002 **Properties and applications of starch-converting enzymes of the a-amylase family**, J. Biotechnol. 94: 137-155.

- [37] Brayer GD, Luo Y, Withers SG. 1995., **The structure of human pancreatic a-amylase at 1.8 A resolution and comparisons with related enzymes**, Protein Sci. 4: 1730-1742.
- [38] Paloma Michelle de Sales, Paula Monteiro de Souza, Luiz Alberto Simeoni, Pérola de Oliveira Magalhães, Dâmaris Silveira., 2012, **a-Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Source**, J Pharm Pharmaceut Sci 15(1) 141 – 183.
- [39] Khopkar S., 2007, **Konsep Dasar kimia Analitik**, UI Press, Jakarta.
- [40] Grotto, D., L.S. Maria, J. Valentini, C. Paniz, G. Schmitt, Solange Cristina Garcia^{I,*}; Valdeci Juarez Pomblum^{II}; João Batista T. Rocha^{III}; Marcelo Farina^{IV}., 2009, **Importance of the Lipid Peroxidation Biomarkers and Methodological Aspects for Malondialdehyde Quantification**, Quím. Nova vol.32(1), ISSN 0100-4042 São Paulo, Brazil.
- [41] Setiawan, B. dan E. Suhartono, 2005, **Stres Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Melitus**. Majalah Kedokteran Indonesia, Vol 55(2):87-90.
- [42] Niedhernhofer, L.J., J.S. Daniels, C.A. Rouzer, R.E. Greene, dan L.J. Marnett, 2003, **Malondialdehyde, a Product of Lipid Peroxidation, Is Mutagenic in Human Cell**, Vol.278(33):31426-31433, Journal of Biological and Chemistry.
- [43] Bintang, M., 2010, **Biokimia-Teknik Penelitian**, Penerbit Erlangga, Jakarta.
- [44] Manimaran, A. and Chellappan, 2009, **Activities of Antioxidant Enzyme and Lipid Peroxidation in Ovarian Cancer Patients**, 2 (2): 68-72,ISSN 1995-8943, Academic Journal of Cancer Research, IDOSI Publications.

Lampiran

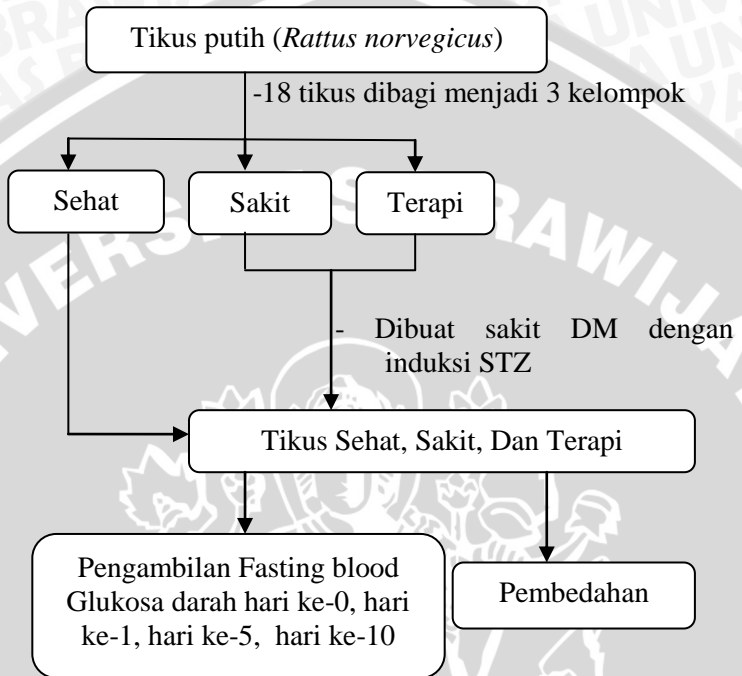
Lampiran A Skema Kerja

A.1 Skema Kerja Penelitian



Lampiran B Diagram Kerja Penelitian

B.1 Penyiapan Hewan Coba



B.2 Pembuatan senyawa bioaktif ekstrak *Ruellia tuberosa* L dan fraksi n-heksan

Ruellia tuberosa L

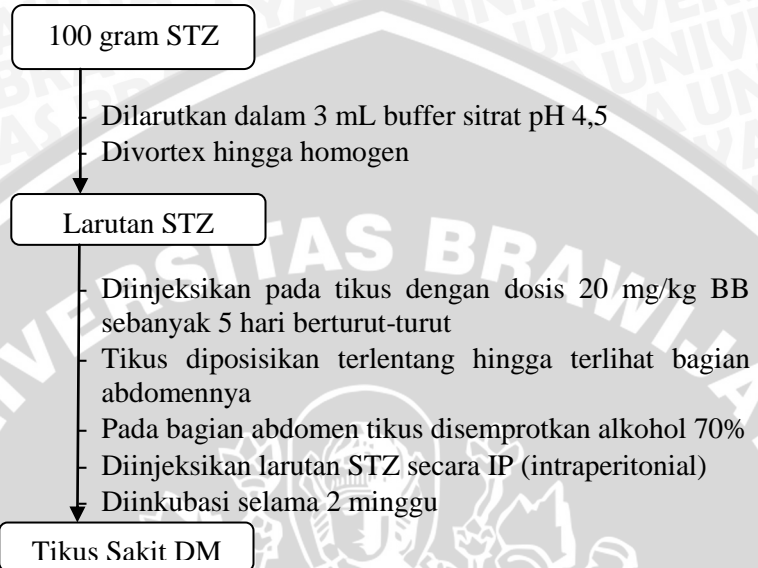
- Diambil 4 pucuk daun teratas beserta batang pletekan
- Dicuci bersih dan dipotong kecil-kecil
- Dikeringkan dalam suhu ruang selama ± 5 hari
- Diblender

Serbuk *Ruellia tuberosa* L kering

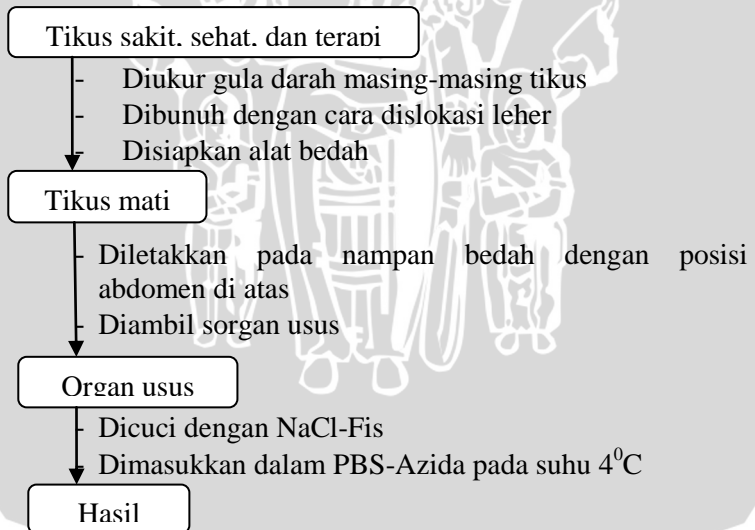
- Diambil sebanyak 1000 g
- Diekstraksi dengan metanol (3L X 3) selama 72 jam
- Dipekatkan dengan rotary evaporator
- Ditimbang dan dicatat
- Ekstrak dipisahkan dengan n-heksan (1:1) menggunakan corong pisah, dilakukan beberapa kali ekstraksi cair-cair dengan n-heksan hingga betulin terekstraksi optimal.
- Diambil fraksi n-heksan ekstrak metanol dan dipekatkan dengan rotary evaporator
- Dialiri dengan gas nitrogen
- Ditimbang dan dicatat
- Ekstrak disimpan dalam botol gelap pada suhu 4°C

Fraksi n-heksan ekstrak metanol

B.3 Pembuatan larutan STZ dan injeksi STZ



B.4 Pengambilan organ usus



B.5 Pembuatan kurva standar MDA

Larutan standar MDA

Dibuat konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8 $\mu\text{g/mL}$

Diambil masing-masing 100 μL

Dimasukkan dalam tabung eppendorf yang berbeda

Ditambahkan 550 μL akuades

Ditambahkan 100 μL TCA 4%

Ditambahkan 250 μL HCl 1 N

Ditambahkan 100 μL Natrium-Thiobarbiturat 1%

Divortex

Eppendorf ditutup dengan aluminium foil

Diinkubasi dalam penangas air pada posisi mengupung dengan suhu 100°C selama 30 menit

Didinginkan pada suhu ruang

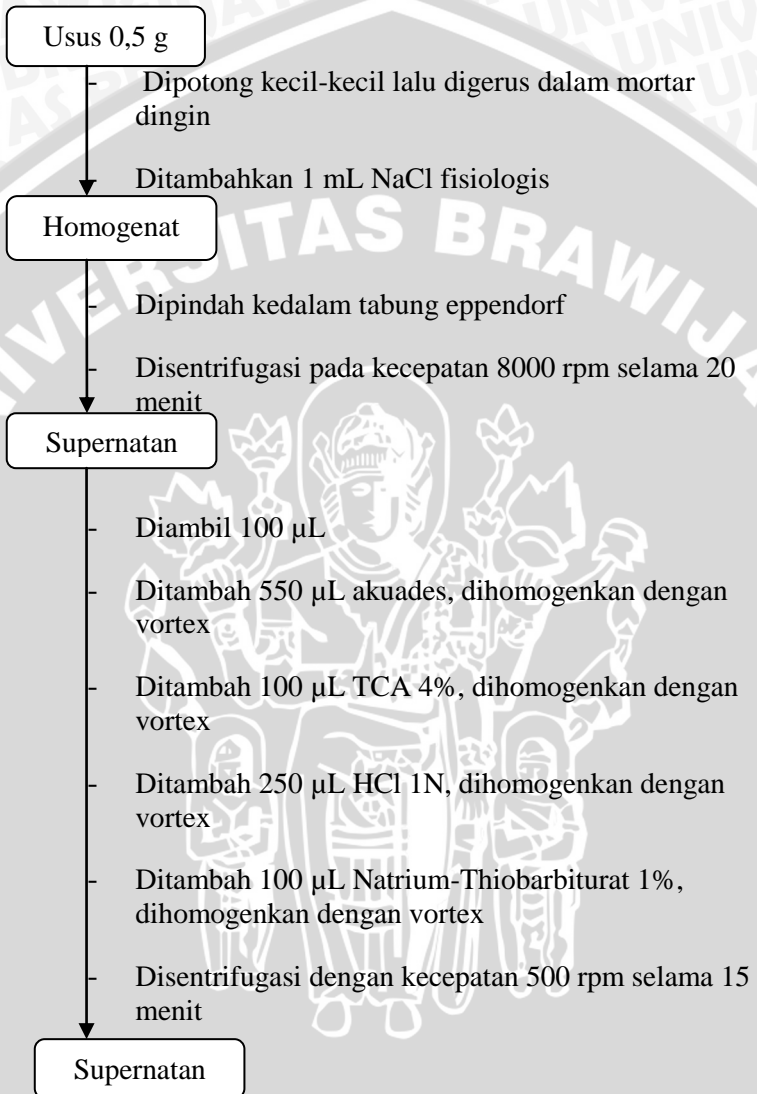
Diukur absorbansi pada range panjang gelombang 500-570 nm (Konsentrasi 4 $\mu\text{g/mL}$) untuk menentukan λ_{max} MDA

Diukur absorbansi pada variasi konsentrasi (1,2,3,5,6,7 dan 8 $\mu\text{g/mL}$)

Dibuat kurva standar MDA

Kurva standar MDA

B.6 Pengukuran kadar MDA



Supernatan

Dimasukkan dalam tabung eppendorf baru

Eppendorf ditutup dengan aluminium foil

Diinkubasi dalam penangas air pada suhu 100°C selama 30 menit

Dibiarkan pada suhu ruang

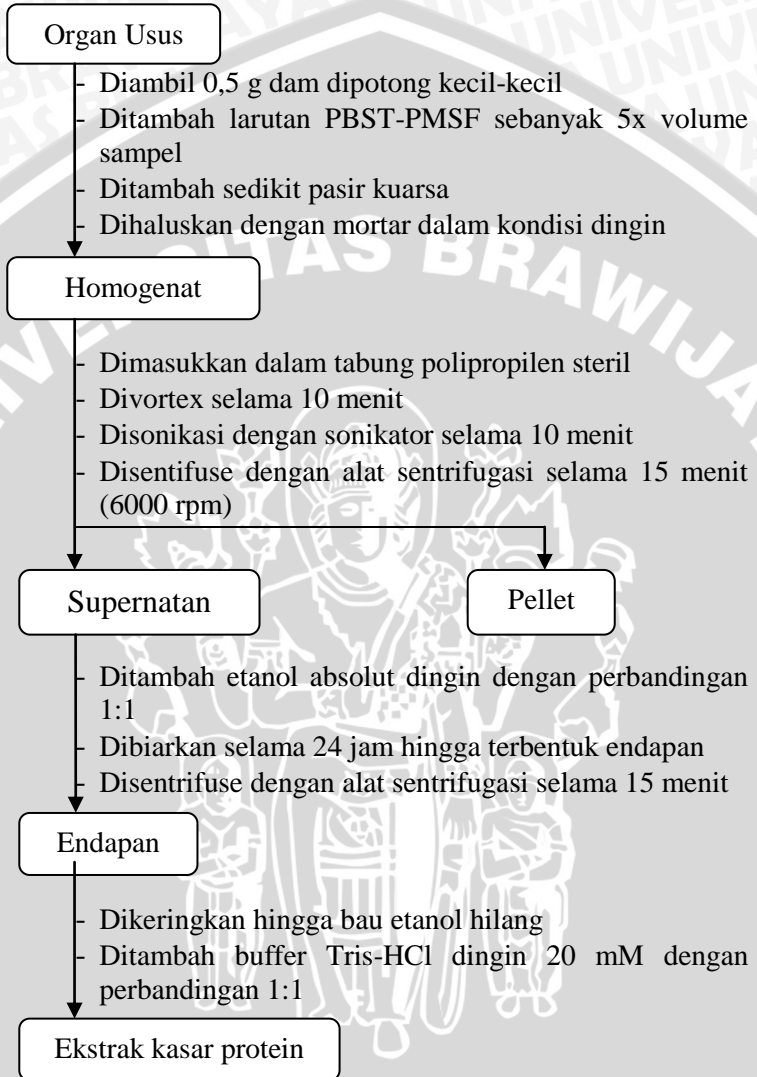
Diukur absorbansinya pada λ_{\max} (530 nm)

Diplotkan pada kurva standar

Kurva standar MDA



B.7 Isolasi protein



B.8 Pembuatan kurva standar glukosa

250 mg glukosa

- Dilarutkan dengan 250 ml aquadest
- Diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm
- Dibuat variasi konsentrasi 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, dan 1000 ppm
- Diambil 250 μ l dari tiap konsentrasi glukosa
- Ditambah 250 μ l amilum
- Diinkubasi dengan suhu 30°C selama 20 menit
- Ditambah 500 μ l DNS dan dipanaskan selama 10 menit
- Larutan didinginkan dengan air mengalir
- Ditambah aquades 5 ml
- ↓ Diukur absorbansi pada panjang gelombang 550 nm

Kurva standar glukosa

B.9 Uji aktivitas enzim α -amilase

Ekstrak protein usus

Diambil 250 μ l

Ditambah 250 μ l larutan substrat (amilum)

Diinkubasi pada suhu 30 $^{\circ}$ C selama 20 menit

Ditambahkan 500 μ l DNS (3,5 dinitro salicylic acid)

Dipanaskan 10 menit

Didinginkan dengan air mengalir

Ditambahkan 5 ml aquades

Diukur absorbansi pada panjang gelombang 550 nm

Dihitung aktivitas enzim α -amilase

Hasil

Lampiran C. Preparasi Larutan

C.1 Pembuatan Larutan Buffer Sitrat pH 4,5

Pembuatan buffer sitrat 0,2 M dibuat dengan mencampurkan 2,1076 gram asam sitrat dan 2,9449 gram natrium sitrat dilarutkan dengan 30 mL aquades steril, kemudian distirer dan diatur pHnya pada 4,5. Kemudian dipindah pada labu ukur 50 mL dan ditandabatas dengan akuades, dihomogenkan. Selanjutnya dipindah pada botol gelap dan disterilisasi dengan autoclave.

C.2 Pembuatan Larutan Streptozotocin

Streptozotocin 100 mg dilarutkan dalam 3mL buffer sitrat pH 4,5 yang telah di buat sebelumnya. Kemudian dihomogenkan. Larutan STZ yang digunakan dengan dosis 20 mg/kg BB adalah:

$$\frac{\text{BB Tikus (gram)}}{1000 (\text{gram})} \times 20 \text{ mg}$$

Konsentrasi Larutan STZ adalah 100 mg/ 3 mL = 100 mg/ 3000 μ L. Larutan STZ yang diinjeksikan adalah 0,033 mg ~ 1 μ L. STZ yang harus diambil adalah:

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

C.3 Pembuatan Larutan Phospat Buffer Saline (PBS) pH 7,4

KCl sebanyak 0,1 gram, KH_2PO_4 sebanyak 0,1 gram, NaCl sebanyak 4 gram, dan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebanyak 1,08 gram dicampur dan dilarutkan dalam 250 mL akuades steril dan dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer dalam gelas kimia 500 mL. pH larutan diatur 7,4 dengan larutan NaOH 1M menggunakan pH meter. Kemudian dipindahkan larutan ke dalam labu ukur 500 mL dan ditandabatkan dengan akuades steril.

C.4 Pembuatan Larutan PBS-Azida

Menggunakan larutan PBS yang telah dibuat sebelumnya, 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 larutan dihomogenkan dengan magnet stirer.

C.5 Pembuatan Larutan NaCl-Fis 0,9%

$$\text{Pembuatan larutan NaCl-Fis } 0,9 \% = \frac{0,9 \text{ gram}}{100 \text{ mL}} \times 500 \text{ mL} =$$

4,5 gram, tahap pertama adalah menimbang larutan NaCl sebanyak 4,5 gram dan dilarutkan terlebih dahulu dalam 100 mL akuades steril. Lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan ditandabatkan dengan akuades.

C.6 Pembuatan TCA

Membuat TCA 100mL yaitu dengan menggunakan padatan TCA sebanyak 10 gram dan dilarutkan dalam akuabides dalam labu ukur 100 mL.

C.7 Pembuatan HCl 1 N untuk 100 mL

$$N = M \cdot e$$

$$\text{Mol} = M \times V$$

$$= 1 \times V$$

$$= 0,1 \text{ mol}$$

$$\text{Berat} = \text{mol} \times \text{BM}$$

$$= 0,1 \text{ mol} \times 36,5 \text{ g/mol}$$

$$= 3,65 \text{ gram}$$

$$P = 1,268 \text{ g/mL}$$

$$V = \frac{100}{37} \times 2,878 = 7,780 \text{ mL}$$

Dipipet 7,780 mL atau 7780 μL HCl 37% dengan mikropipet, kemudian dimasukkan labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas.

C.8 Pembuatan Natrium-Thiobarbituric untuk 100 mL

Thiobarbituric acid ditimbang 0,868 gram, ditambahkan 0,241 gram NaOH. Kemudian dilarutkan dalam akuabides dan diencerkan dalam labu takar 100 mL.

C.9 Preparasi Larutan Stok MDA

Stok kit MDA:

$$\text{Densitas} = 0,997 \text{ g/L}$$

$$= 0,997 \cdot 10^3 \mu\text{g/mL}$$

Stok Larutan MDA konsentrasi 8 µg/mL

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \times 0,997 \cdot 10^3 \mu\text{g/mL} = 10 \text{ mL} \times 8 \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = 0,08 \text{ mL} = 80 \mu\text{L}$$

1 Diambil Stok kit MDA 80 µL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok Larutan MDA konsentrasi 7 µg/mL

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \times 8 \mu\text{g/mL} = 10 \text{ mL} \times 7 \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = 8,75 \text{ mL} = 8750 \mu\text{L}$$

Diambil Stok larutan MDA konsentrasi 8 µg/mL sebanyak 8750 µL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok Larutan MDA konsentrasi 6 µg/mL

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \times 7 \mu\text{g/mL} = 10 \text{ mL} \times 6 \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = 8,571 \text{ mL} = 8571 \mu\text{L}$$

Diambil Stok larutan MDA konsentrasi 7 µg/mL sebanyak 8571 µL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok Larutan MDA konsentrasi 5 µg/mL

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \times 6 \mu\text{g/mL} = 10 \text{ mL} \times 5 \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = 8,333 \text{ mL} = 8333 \mu\text{L}$$

Diambil Stok larutan MDA konsentrasi 6 µg/mL sebanyak 8333 µL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok Larutan MDA konsentrasi 4 µg/mL

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \times 5 \mu\text{g/mL} = 10 \text{ mL} \times 4 \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = 8 \text{ mL} = 8000 \mu\text{L}$$

Diambil Stok larutan MDA konsentrasi 5 µg/mL sebanyak 8000 µL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok Larutan MDA konsentrasi 3 µg/mL

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$
$$V_1 \times 4 \mu\text{g/mL} = 10 \text{ mL} \times 3 \mu\text{g/mL}$$
$$V_1 = 7,5 \text{ mL} = 7500 \mu\text{L}$$

Diambil Stok larutan MDA konsentrasi 4 µg/mL sebanyak 7500 µL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok Larutan MDA konsentrasi 2 µg/mL

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$
$$V_1 \times 3 \mu\text{g/mL} = 10 \text{ mL} \times 2 \mu\text{g/mL}$$
$$V_1 = 6,667 \text{ mL} = 6667 \mu\text{L}$$

Diambil Stok larutan MDA konsentrasi 3 µg/mL sebanyak 6667 µL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok Larutan MDA konsentrasi 1 µg/mL

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$
$$V_1 \times 2 \mu\text{g/mL} = 10 \text{ mL} \times 3 \mu\text{g/mL}$$
$$V_1 = 5 \text{ mL} = 5000 \mu\text{L}$$

Diambil Stok larutan MDA konsentrasi 2 µg/mL sebanyak 5000 µL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

C.10 Pembuatan Larutan Stok Glukosa 1000 ppm

Ditimbang 0,25 gram tirosin, kemudian dilarutkan dengan 25 mL akuades dalam gelas kimia. Kemudian diencerkan dengan akuades di dalam labu ukur 250 mL sampai tanda batas.

Stok Larutan Glukosa konsentrasi 200 ppm

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$
$$1000 \text{ ppm} = 100 \text{ mL} \times 200 \text{ ppm}$$
$$V_1 = 20 \text{ mL}$$

Diambil Stok kit glukosa 20 mL dengan pipet ukur dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 100 mL.

Stok Larutan Glukosa konsentrasi 400 ppm

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$
$$1000 \text{ ppm} = 100 \text{ mL} \times 400 \text{ ppm}$$
$$V_1 = 40 \text{ mL}$$

Diambil Stok kit glukosa 40 mL dengan pipet ukur dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 100 mL.

Stok Larutan Glukosa konsentrasi 600 ppm

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$1000 \text{ ppm} = 100 \text{ mL} \times 600 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 60 \text{ mL}$$

Diambil Stok kit glukosa 60 mL dengan pipet ukur dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 100 mL.

Stok Larutan Glukosa konsentrasi 800 ppm

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$1000 \text{ ppm} = 100 \text{ mL} \times 800 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 80 \text{ mL}$$

Diambil Stok kit glukosa 80 mL dengan pipet ukur dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 100 mL.



Lampiran D. Data Dan Uji Statistik

D.1 Data Glukosa darah Tikus (mg/dL)

Tabel 1.1 Data Glukosa Darah Tikus Sebelum Terapi

Pengulangan	Rataan Kadar Glukosa Darah		
	T.Sehat	T.Sakit	T.Terapi
1	122	250	317
2	114	256	286
3	105	312	432
4	119	540	403
5	108	267	454
6	102	398	502
Jumlah	670	2023	2394
Rata-rata	111,67	337,167	684
SD	7,9666	113,65	82,743

Tabel 1.2. Data Glukosa Darah Tikus Sesudah Terapi selama 14 hari (mg/dL)

Pengulangan	Rataan Kadar Glukosa Darah		
	T.Sehat	T.Sakit	T.Terapi
1	114	222	102
2	112	405	105
3	105	233	110
4	108	459	98
5	129	247	116
6	102	321	156
Jumlah	670	1887	687
Rata-rata	111,67	314,5	114,5
SD	9,564	98,86	21,277

D.1.1 Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$\begin{aligned}FK &= \frac{[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij}]^2}{np} \\&= \frac{[670 + 1887 + 687]^2}{6 \times 3} \\&= \frac{10523536}{18} \\&= 584640,8889\end{aligned}$$

D.1.2 Menghitung jumlah kuadrat (JK)

$$\begin{aligned}JK \text{ total} &= \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK \\&= (114^2 + 112^2 + \dots + 156^2) - 584640,8889 \\&= 798528 - 584640,8889 \\&= 213887,1111 \\JK \text{ perlakuan (JK}_p) &= \frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_1} - FK \\&= \frac{[670^2 + 1887^2 + 687^2]}{6} - 584640,8889 \\&= 746939,6667 - 584640,8889 \\&= 162298,7778\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{JK galat percobaan (JKG)} &= \text{JKtotal} - \text{JKperlakuan} \\
 &= 213887,1111 - 162298,7778 \\
 &= 51588,3333
 \end{aligned}$$

D.1.3 Menghitung kuadrat tengah (KT) setiap sumber karagaman

$$\begin{aligned}
 \text{dB total} &= (n.\alpha) - 1 \\
 &= (6.3) - 1 \\
 &= 17 \\
 \text{dB perlakuan} &= \alpha - 1 = 3 - 1 = 2
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kuadrat Tengah perlakuan (KTp)} &= \frac{JK_p}{db_{\text{perlakuan}}} \\
 &= \frac{162298,7778}{2} \\
 &= 81149,3889
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kuadrat Tengah galat percobaan (KTG)} &= \frac{JK_{GP}}{db_{\text{percobaan}}} \\
 &= \frac{51588,3333}{15} \\
 &= 3439,2222
 \end{aligned}$$

D.1.4 Menghitung nilai F

$$\begin{aligned}
 \text{Fhitung} &= \frac{KT_p}{KT_G} \\
 &= \frac{81149,3889}{3439,2222} \\
 &= 23,59527
 \end{aligned}$$

F_{tabel} (0,01; 2; 15) pada taraf nyata 1% = 6,36

Tabel 1.3. Analisa Ragam Satu Arah Pengaruh Pemberian Fraksi n-heksan Ekstrak Metanol *Ruellia tuberosa* l Terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus DM

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel}
Perlakuan	2	162298,7778	81149.3889	23,59527	6,36
Galat Percobaan	15	51588,3333	3439.2222		
Total	17	213887,1111	84588,6109		

Berdasarkan perhitungan di atas terlihat bahwa nilai F_{hitung} > F_{tabel}. Pemberian fraksi n-heksan ekstrak metanol *Ruellia tuberosa* l mempunyai pengaruh yang sangat nyata terhadap kadar glukosa darah tikus DM.

D.1.5 Menghitung nilai BNT 1%

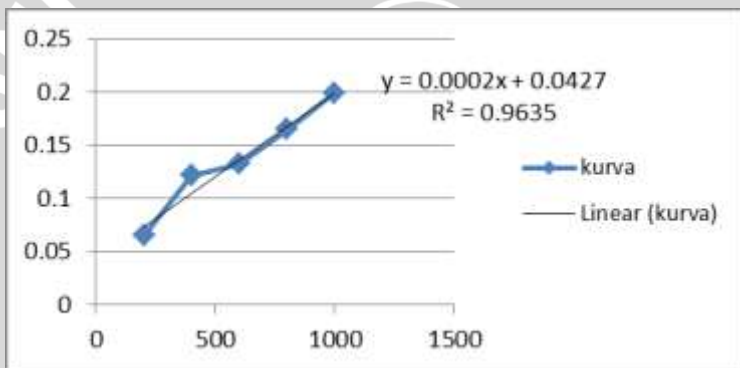
$$\begin{aligned}
 \text{BNT } (\alpha) &= t_{\alpha/2}^{dbg} \sqrt{\frac{2KT_{galat}}{n}} \\
 &= t_{\text{tabel}}^{(0,01/2, 15)} \sqrt{\frac{2(3439,2222)}{6}} \\
 &= 3,29 \times 13,822 \\
 &= 45,47
 \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan uji BNT 1% perlakuan tersebut memberikan beda yang sangat nyata, ditunjukkan dengan nilai uji memiliki nilai lebih besar dari uji BNT 1% (45,47).

D.2 Pembuatan Kurva Baku

Tabel 2.1 Absorbansi Larutan Baku Glukosa 550 nm

ppm sampel	A1	A2	A3	Arata-rata
200	0,064	0,065	0,065	0,0646
400	0,121	0,122	0,121	0,1213
600	0,133	0,132	0,133	0,1326
800	0,165	0,164	0,165	0,1646
1000	0,199	0,2	0,199	0,1993



Gambar 2.1 Kurva Baku Glukosa

D.3 Data aktivitas enzim α -amilase organ Duodenum

Tabel 3.1 Data aktivitas enzim α -amilase organ Duodenum :

Perlakuan	Duodenum	A ₁	A ₂	A ₃	A _{rata-rata}	Aktivitas α -Amilase
Sehat	1	0,717	0,718	0,719	0,718	0,997
	2	0,553	0,554	0,552	0,553	0,768
	3	0,676	0,677	0,675	0,676	0,939
	4	0,658	0,657	0,659	0,658	0,914
	5	0,587	0,589	0,588	0,588	0,817
	6	0,612	0,615	0,616	0,614	0,853
Sakit	1	0,855	0,855	0,856	0,855	1,188
	2	0,907	0,909	0,906	0,907	1,260
	3	0,88	0,88	0,881	0,880	1,223
	4	0,874	0,876	0,876	0,875	1,216
	5	0,83	0,832	0,834	0,832	1,155
	6	0,856	0,857	0,857	0,857	1,189
Terapi	1	0,638	0,638	0,632	0,636	0,883
	2	0,724	0,72	0,728	0,724	1,005
	3	0,525	0,524	0,524	0,524	0,728
	4	0,681	0,682	0,682	0,682	0,947
	5	0,649	0,648	0,649	0,649	0,901
	6	0,725	0,726	0,725	0,725	1,007

Pengukuran aktivitas kontrol α -amilase dengan waktu inkubasi 20 menit

Persamaan kurva baku glukosa: $y = 0,0002x$

Dimana $x = \frac{0,718 \times 3590 \mu\text{g/mL}}{0,0002}$

Untuk menentukan aktivitas enzim α -amilase digunakan persamaan:

$$\text{Aktivitas enzim} = C \times 1/T \times 1 \text{ unit/1mikromol}$$

$$= 3590 \mu\text{g/mL} \times 1/20\text{menit} \times 1/180$$

$$= 0,997 \text{ unit}$$

Presentase peningkatan aktivitas enzim α -Amilase:

$$\begin{aligned} \% \text{ aktivitas sakit} &= \frac{\text{rataaan sakit} - \text{rataaan sehat}}{\text{rataaan sakit}} \times 100\% \\ &= \frac{1,205 - 0,881}{1,205} \times 100\% \\ &= 47,39\% \end{aligned}$$

Presentase penurunan aktivitas enzim α -Amilase:

$$\begin{aligned} \% \text{ aktivitas terapi} &= \frac{\text{rataaan sakit} - \text{rataaan terapi}}{\text{rataaan terapi}} \times 100\% \\ &= \frac{1,205 - 0,912}{0,912} \times 100\% \\ &= 20,5\% \end{aligned}$$

Tabel 3.2 Rataan Aktivitas α -amilase Hasil Isolasi Usus (Duodenum) Tikus

Perlakuan	Rataan Aktivitas α -amilase ($\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$)	Peningkatan Aktivitas α -amilase (%)	Penurunan Aktivitas α -amilase (%)
Tikus Sehat	0,881 \pm 0,084	0	0
Tikus Sakit	1,205 \pm 0,036	47,39	-
Tikus Terapi	0,912 \pm 0,104	-	20,5

D.3.1 Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$\text{FK} = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{np}$$

$$= \frac{[5,288 + 7,232 + 5,472]^2}{6 \times 3}$$

$$= 17,984$$

D.3.2 Menghitung jumlah kuadrat (JK)

$$\text{JK total} = \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - \text{FK}$$

$$= (0,997^2 + 0,768^2 + \dots + 1,007^2) - 17,984$$

$$= 18,464 - 17,984$$

$$= 0,48$$

$$\text{JK perlakuan (JKp)} = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_1} - \text{FK}$$

$$= \frac{[5,288^2 + 7,232^2 + 5,472^2]}{6} - 17,984$$

$$= 18,368 - 17,984$$

$$= 0,384$$

$$\text{JK galat percobaan (JKG)} = \text{JKtotal} - \text{JKperlakuan}$$

$$= 0,48 - 0,384$$

$$= 0,096$$

D.3.3 Menghitung kuadrat tengah (KT) setiap sumber karagaman

$$\text{dB total} = (n.\alpha) - 1$$

$$= (6.3) - 1$$

$$= 17$$

$$dB \text{ perlakuan} = \alpha - 1 = 3 - 1 = 2$$

$$\begin{aligned} \text{Kuadrat Tengah perlakuan (KTp)} &= \frac{JK_p}{db_{perlakuan}} \\ &= \frac{0,384}{2} \\ &= 0,192 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kuadrat Tengah galat percobaan (KTG)} &= \frac{JK_{GP}}{db_{percobaan}} \\ &= \frac{0,096}{15} \\ &= 0,008 \end{aligned}$$

D.3.4 Menghitung nilai F

$$\begin{aligned} F_{hitung} &= \frac{KT_p}{KT_G} \\ &= \frac{0,192}{0,008} \\ &= 24 \end{aligned}$$

Ftabel (0,01; 2; 15) pada taraf nyata 1% = 6,358

Tabel 3.3 Analisa Ragam Satu Arah Aktivitas Enzim α -amilase organ Duodenum

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel}
Perlakuan	2	0,384	0,192	24	6,358
Galat Percobaan	15	0,096	0,008		
Total	17	0,48	0,2		

Berdasarkan perhitungan di atas terlihat bahwa nilai $F_{hitung} > F_{tabel}$. Pemberian fraksi n-heksan ekstrak metanol *Ruellia tuberosa* l mempunyai pengaruh yang sangat nyata terhadap aktivitas enzim α -amilase organ Duodenum.

D.3.5 Menghitung nilai BNT 1%

$$\begin{aligned} \text{BNT } (\alpha) &= t_{dbg}^{\alpha/2} \sqrt{\frac{2KT_{galat}}{n}} \\ &= t_{tabel}^{(0,01/2, 15)} \sqrt{\frac{2(0,008)}{6}} \\ &= 3,286 \times 0,052 \\ &= 0,17 \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan uji BNT 1% perlakuan tersebut memberikan beda yang sangat nyata, ditunjukkan dengan nilai uji memiliki nilai lebih besar dari uji BNT 1% (0,17).

D.4 Data Aktivitas enzim α -amilase pada organ Jejunum

Tabel 4.1 Data Aktivitas enzim α -amilase pada organ Jejunum:

Perlakuan	Jejunum	A ₁	A ₂	A ₃	A _{rata-rata}	Aktivitas α -Amilase
Sehat	1	0,472	0,474	0,473	0,473	0,657
	2	0,33	0,331	0,331	0,331	0,459
	3	0,445	0,448	0,449	0,447	0,621
	4	0,473	0,472	0,474	0,473	0,657
	5	0,465	0,467	0,467	0,466	0,648
	6	0,437	0,438	0,438	0,438	0,608
Sakit	1	0,718	0,719	0,719	0,719	0,998
	2	0,721	0,725	0,725	0,724	1,005
	3	0,787	0,785	0,785	0,786	1,091
	4	0,656	0,658	0,659	0,658	0,913
	5	0,718	0,72	0,719	0,719	0,999
	6	0,689	0,69	0,692	0,690	0,959
Terapi	1	0,413	0,411	0,411	0,412	0,572
	2	0,457	0,458	0,458	0,458	0,636
	3	0,426	0,426	0,428	0,427	0,593
	4	0,448	0,449	0,447	0,448	0,622
	5	0,451	0,453	0,455	0,453	0,629
	6	0,402	0,404	0,406	0,404	0,561

Pengukuran aktivitas kontrol α -amilase dengan waktu inkubasi 20 menit

Persamaan kurva baku glukosa: $y = 0,0002x$

Dimana $x = \frac{0,473}{0,0002} = 2365 \mu\text{g/mL}$

Untuk menentukan aktivitas enzim α -amilase digunakan persamaan:

$$\text{Aktivitas enzim} = C \times 1/T \times 1 \text{ unit/1mikromol}$$

$$= 2365 \mu\text{g/mL} \times 1/20\text{menit} \times 1\text{unit}/180$$

$$= 0,657 \text{ unit}$$

Prosentase peningkatan aktivitas enzim α -Amilase:

$$\begin{aligned} \% \text{ aktivitas sakit} &= \frac{\text{rataaan sakit} - \text{rataaan sehat}}{\text{rataaan sakit}} \times 100\% \\ &= \frac{0,994 - 0,608}{0,994} \times 100\% \\ &= 38,23 \% \end{aligned}$$

Prosentase penurunan aktivitas enzim α -Amilase:

$$\begin{aligned} \% \text{ aktivitas terapi} &= \frac{\text{rataaan sakit} - \text{rataaan terapi}}{\text{rataaan terapi}} \times 100\% \\ &= \frac{0,994 - 0,602}{0,602} \times 100\% \\ &= 65,11 \% \end{aligned}$$

Tabel 4.2 Rataan Aktivitas α -amilase Hasil Isolasi Usus (Jejunum) Tikus

Perlakuan	Rataan Aktivitas α -amilase ($\mu\text{mol/mL.menit}$)	Peningkatan Aktivitas α -amilase (%)	Penurunan Aktivitas α -amilase (%)
Tikus Sehat	0,608 \pm 0,075	0	0
Tikus Sakit	0,994 \pm 0,058	38,23	
Tikus Terapi	0,494 \pm 0,0501		65,11

D.4.1 Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$\begin{aligned} \text{FK} &= \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{np} \\ &= \frac{[3,65 + 5,965 + 3,612]^2}{6 \times 3} \\ &= 9,719 \end{aligned}$$

D.4.2 Menghitung jumlah kuadrat (JK)

$$\begin{aligned} \text{JK total} &= \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - \text{FK} \\ &= (0,657^2 + 0,459^2 + \dots + 0,561^2) - 9,719 \\ &= 10,377 - 9,719 \\ &= 0,658 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK perlakuan (JK}_p) &= \left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right] - \text{FK} \\ &= \frac{n_1}{6} [3,65^2 + 5,965^2 + 3,612^2] - 9,719 \\ &= 10,325 - 9,719 \\ &= 0,606 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK galat percobaan (JKG)} &= \text{JKtotal} - \text{JKperlakuan} \\ &= 0,658 - 0,606 \\ &= 0,052 \end{aligned}$$

D.4.3 Menghitung kuadrat tengah (KT) setiap sumber karagaman

$$\begin{aligned} \text{dB total} &= (n \cdot \alpha) - 1 \\ &= (6 \cdot 3) - 1 \\ &= 17 \\ \text{dB perlakuan} &= \alpha - 1 = 3 - 1 = 2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kuadrat Tengah perlakuan (KT}_p) &= \frac{JK_p}{db_{\text{perlakuan}}} \\ &= \frac{0,606}{2} \\ &= 0,303 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kuadrat Tengah galat percobaan (KTG)} &= \frac{JK_{GP}}{db_{\text{percobaan}}} \\ &= \frac{0,052}{15} \\ &= 0,003 \end{aligned}$$

D.4.4 Menghitung nilai F

$$\begin{aligned} F_{\text{hitung}} &= \frac{KT_p}{KT_G} \\ &= \frac{0,303}{0,003} \\ &= 101 \end{aligned}$$

$F_{\text{tabel}} (0,01; 2; 15)$ pada taraf nyata 1% = 6,358

Tabel 4.3 Analisa Ragam Satu Arah Aktivitas Enzim α -amilase organ Jejunum

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F_{hitung}	F_{tabel}
Perlakuan	2	0,606	0,303	101	6,358
Galat Percobaan	15	0,052	0,003		
Total	17	0,658	0,306		

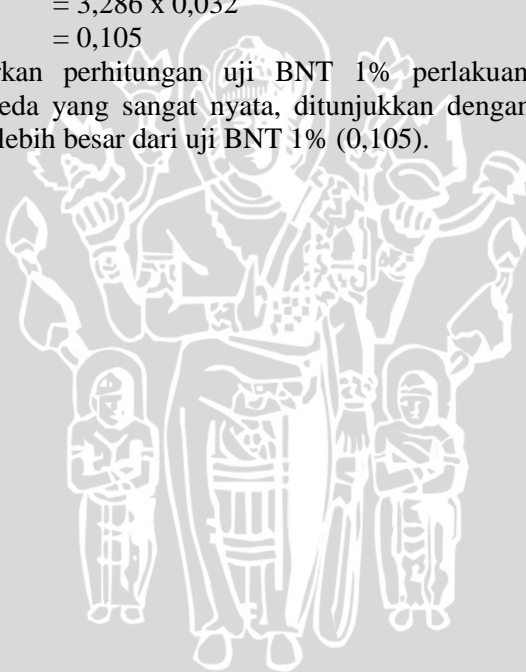
Berdasarkan perhitungan di atas terlihat bahwa nilai $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$. Pemberian fraksi n-heksan ekstrak metanol *Ruellia tuberosa*

/ mempunyai pengaruh yang sangat nyata terhadap aktivitas enzim α -amilase organ Jejunum.

D.4.6 Menghitung nilai BNT 1%

$$\begin{aligned} \text{BNT } (\alpha) &= t_{dbg}^{\alpha/2} \sqrt{\frac{2KTgalat}{n}} \\ &= t_{\text{tabel}}^{(0,01/2, 6)} \sqrt{\frac{2(0,003)}{6}} \\ &= 3,286 \times 0,032 \\ &= 0,105 \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan uji BNT 1% perlakuan tersebut memberikan beda yang sangat nyata, ditunjukkan dengan nilai uji memiliki nilai lebih besar dari uji BNT 1% (0,105).



D.5 Data aktivitas enzim α -amilase organ Ileum

Tabel 5.1 Data aktivitas enzim α -amilase organ Ileum:

Perlakuan	Ileum	A ₁	A ₂	A ₃	A _{rata-rata}	Aktivitas α -Amilase
Sehat	1	0,173	0,176	0,175	0,175	0,243
	2	0,207	0,206	0,206	0,206	0,287
	3	0,146	0,147	0,147	0,147	0,204
	4	0,197	0,197	0,196	0,197	0,273
	5	0,169	0,168	0,168	0,168	0,234
	6	0,211	0,213	0,213	0,212	0,295
Sakit	1	0,385	0,383	0,386	0,385	0,534
	2	0,376	0,377	0,376	0,376	0,523
	3	0,343	0,341	0,344	0,343	0,476
	4	0,328	0,327	0,328	0,328	0,455
	5	0,364	0,365	0,366	0,365	0,507
	6	0,376	0,374	0,375	0,375	0,521
Terapi	1	0,242	0,244	0,245	0,244	0,338
	2	0,286	0,287	0,286	0,286	0,398
	3	0,314	0,315	0,314	0,314	0,436
	4	0,258	0,258	0,257	0,258	0,358
	5	0,237	0,236	0,236	0,236	0,328
	6	0,293	0,295	0,296	0,295	0,409

Pengukuran aktivitas kontrol α -amilase dengan waktu inkubasi 20 menit

Persamaan kurva baku glukosa: $y = 0,0002x$

Dimana $x = \frac{0,15}{0,0002} = 873,33 \mu\text{g/mL}$

Untuk menentukan aktivitas enzim α -amilase digunakan persamaan:

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim} &= C \times 1/T \times 1 \text{ unit/1mikromol} \\ &= 873,333 \mu\text{g/mL} \times 1/20 \text{ menit} \times 1 \text{ unit/180} \\ &= 0,243 \text{ unit} \end{aligned}$$

Presentase peningkatan aktivitas enzim α -Amilase:

$$\begin{aligned} \% \text{ aktivitas sakit} &= \frac{\text{rataaan sakit} - \text{rataaan sehat}}{\text{rataaan sakit}} \times 100\% \\ &= \frac{0,502 - 0,255}{0,502} \times 100\% \\ &= 49,20 \% \end{aligned}$$

Presentase penurunan aktivitas enzim α -Amilase:

$$\begin{aligned} \% \text{ aktivitas terapi} &= \frac{\text{rataaan sakit} - \text{rataaan terapi}}{\text{rataaan terapi}} \times 100\% \\ &= \frac{0,502 - 0,378}{0,378} \times 100\% \\ &= 32,8 \% \end{aligned}$$

Tabel 5.2 Rataan Aktivitas α -amilase Hasil Isolasi Usus (Ileum) Tikus

Perlakuan	Rataan Aktivitas α -amilase ($\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$)	Peningkatan Aktivitas α -amilase (%)	Penurunan Aktivitas α -amilase (%)
Tikus Sehat	0,255 \pm 0,035	0	0
Tikus Sakit	0,502 \pm 0,031	49,2	
Tikus Terapi	0,378 \pm 0,043		32,8

D.5.1 Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$\begin{aligned} \text{FK} &= \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{np} \\ &= \frac{[1,535 + 3,016 + 2,267]^2}{6 \times 3} \\ &= 2,582 \end{aligned}$$

D.5.2 Menghitung jumlah kuadrat (JK)

$$\begin{aligned} \text{JK total} &= \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - \text{FK} \\ &= (0,243^2 + 0,287^2 + \dots + 0,409^2) - 2,585 \\ &= 2,786 - 2,585 \\ &= 0,201 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK perlakuan (JKp)} &= \frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_1} - \text{FK} \\ &= \frac{[1,535^2 + 3,016^2 + 2,267^2]}{6} - 2,585 \\ &= 2,765 - 2,585 \\ &= 0,18 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{JK galat percobaan (JKG)} &= \text{JK}_{\text{total}} - \text{JK}_{\text{perlakuan}} \\
 &= 0,201 - 0,18 \\
 &= 0,021
 \end{aligned}$$

D.5.3 Menghitung kuadrat tengah (KT) setiap sumber karagaman

$$\begin{aligned}
 \text{dB total} &= (n \cdot \alpha) - 1 \\
 &= (6 \cdot 3) - 1 \\
 &= 17 \\
 \text{dB perlakuan} &= \alpha - 1 = 3 - 1 = 2
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kuadrat Tengah perlakuan (KT}_p) &= \frac{\text{JK}_p}{\text{db}_{\text{perlakuan}}} \\
 &= \frac{0,18}{2} \\
 &= 0,09
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kuadrat Tengah galat percobaan (KTG)} &= \frac{\text{JK}_{\text{GP}}}{\text{db}_{\text{percobaan}}} \\
 &= \frac{0,021}{15} \\
 &= 0,0014
 \end{aligned}$$

D.5.4 Menghitung nilai F

$$\begin{aligned}
 \text{Fhitung} &= \frac{\text{KT}_p}{\text{KT}_G} \\
 &= \frac{0,09}{0,0014} \\
 &= 64,28
 \end{aligned}$$

$$\text{Ftabel (0,01; 2; 15) pada taraf nyata 1\%} = 6,358$$

Tabel 5.3 Analisa Ragam Satu Arah Aktivitas Enzim α -amilase organ Ileum

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel}
Perlakuan	2	0,18	0,009	64,28	6,358
Galat Percobaan	15	0,021	0,0014		
Total	17	0,201	0,0914		

Berdasarkan perhitungan di atas terlihat bahwa nilai $F_{hitung} > F_{tabel}$. Pemberian fraksi n-heksan ekstrak metanol *Ruellia tuberosa l* berpengaruh terhadap aktivitas enzim α -amilase organ Ileum.

D.5.5 Menghitung nilai BNT 1%

$$\begin{aligned}
 \text{BNT } (\alpha) &= t_{\text{dbg}}^{\alpha/2} \sqrt{\frac{2KT_{\text{galat}}}{n}} \\
 &= t_{\text{tabel}}^{(0,01/2, 15)} \sqrt{\frac{2(0,0014)}{6}} \\
 &= 3,286 \times 0,022 \\
 &= 0,0723
 \end{aligned}$$

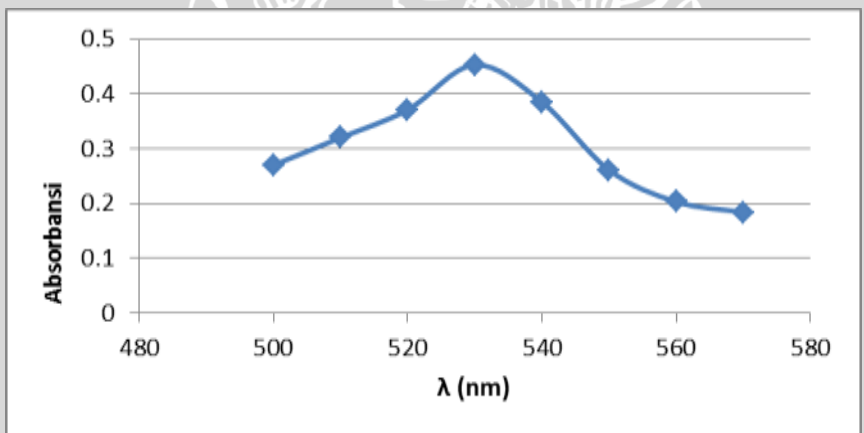
Berdasarkan perhitungan uji BNT 1% perlakuan tersebut memberikan beda yang sangat nyata, ditunjukkan dengan nilai uji memiliki nilai lebih besar dari uji BNT 1% (0,0723).

D.6 Data Kadar Malondialdehid (MDA)

D.6.1 Penentuan panjang gelombang maksimum

Tabel 6.1 Absorbansi Larutan Standard Malondialdehid (MDA) 4 $\mu\text{g/mL}$ pada berbagai panjang gelombang

λ (nm)	Absorbansi
500	0,27
510	0,32
520	0,371
530	0,453
540	0,385
550	0,261
560	0,203
570	0,184



Gambar 6.1 Kurva serapan MDA

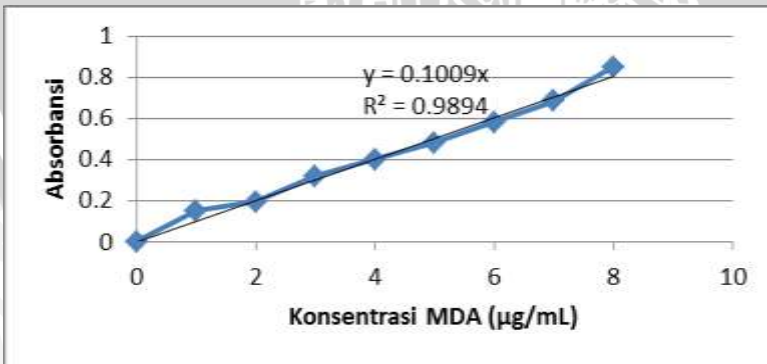
Absorbansi larutan standar MDA terbesar didapatkan pada panjang gelombang 530 nm, yaitu sebesar 0,453 yang dilakukan

pengukuran menggunakan larutan MDA pada konsentrasi 4 µg/mL dengan variasi panjang gelombang. Panjang gelombang ini merupakan panjang gelombang maksimum yang digunakan untuk pengukuran absorbansi larutan standar MDA dan sampel.

D.6.2 Kurva baku larutan Malondialdehid (MDA)

**Tabel 6.2 Absorbansi Larutan Standar Malondialdehid (MDA)
λmaks = 530 nm pada berbagai konsentrasi**

Konsentrasi MDA (µg/mL)	Absorbansi
0	0
1	0.15
2	0.194
3	0.32
4	0.401
5	0.48
6	0.58
7	0.685
8	0.85



Gambar 6.2 Kurva Baku MDA pada λmaks = 530 nm

D.7 Data absorbansi MDA

Tabel 7.1 Data Absorbansi MDA Organ Duodenum

Perlakuan	Duodenum	A ₁	A ₂	A ₃	A _{rata-rata}
Sehat	1	0,456	0,458	0,458	0.457
	2	0,494	0,496	0,496	0.495
	3	0,472	0,473	0,472	0.472
	4	0,425	0,427	0,427	0.426
	5	0,429	0,428	0,429	0.429
	6	0,475	0,474	0,476	0.475
Sakit	1	0,759	0,758	0,758	0.758
	2	0,765	0,765	0,766	0.765
	3	0,749	0,742	0,743	0.745
	4	0,771	0,774	0,774	0.773
	5	0,730	0,731	0,731	0.731
	6	0,733	0,732	0,735	0.733
Terapi	1	0,562	0,563	0,563	0.563
	2	0,538	0,537	0,537	0.537
	3	0,551	0,552	0,554	0.552
	4	0,516	0,514	0,518	0.516
	5	0,525	0,524	0,524	0.524
	6	0,511	0,499	0,500	0.503

Tabel 7.2 Data Absorbansi MDA Organ Jejunum

Perlakuan	Jejunum	A ₁	A ₂	A ₃	A _{rata-rata}
Sehat	1	0,432	0,433	0,433	0,433
	2	0,398	0,397	0,397	0,397
	3	0,416	0,417	0,416	0,416
	4	0,421	0,421	0,423	0,422
	5	0,395	0,393	0,395	0,394
	6	0,405	0,401	0,403	0,403
Sakit	1	0,743	0,742	0,742	0,742
	2	0,788	0,787	0,786	0,787
	3	0,767	0,766	0,767	0,767
	4	0,756	0,756	0,755	0,756
	5	0,763	0,760	0,762	0,762

	6	0,734	0,732	0,731	0,732
Terapi	1	0,482	0,484	0,483	0,483
	2	0,453	0,454	0,455	0,454
	3	0,461	0,463	0,462	0,462
	4	0,459	0,460	0,460	0,460
	5	0,493	0,494	0,492	0,493
	6	0,441	0,445	0,443	0,443

Tabel 7.3 Data Absorbansi MDA Organ Ileum

Perlakuan	Ileum	A₁	A₂	A₃	A_{rata-rata}
Sehat	1	0,448	0,448	0,447	0,448
	2	0,433	0,433	0,434	0,433
	3	0,418	0,417	0,416	0,417
	4	0,427	0,425	0,428	0,427
	5	0,419	0,417	0,419	0,418
	6	0,443	0,443	0,442	0,443
Sakit	1	0,716	0,717	0,718	0,717
	2	0,754	0,755	0,754	0,754
	3	0,737	0,736	0,736	0,736
	4	0,745	0,744	0,743	0,744
	5	0,739	0,739	0,738	0,739
	6	0,702	0,703	0,703	0,703
Terapi	1	0,532	0,534	0,534	0,533
	2	0,521	0,523	0,524	0,523
	3	0,553	0,555	0,556	0,554
	4	0,566	0,567	0,568	0,567
	5	0,547	0,545	0,546	0,546
	6	0,514	0,516	0,516	0,515

Tabel 7.4 Data MDA Organ Duodenum

Perlakuan	Duodenum	A ₁	A ₂	A ₃	A _{rata-rata}
Sehat	1	4,519	4,539	4,539	4,532
	2	4,896	4,916	4,916	4,909
	3	4,678	4,688	4,678	4,681
	4	4,212	4,232	4,232	4,225
	5	4,252	4,242	4,252	4,248
	6	4,708	4,698	4,717	4,708
Sakit	1	7,522	7,512	7,513	7,516
	2	7,582	7,582	7,592	7,585
	3	7,423	7,354	7,364	7,380
	4	7,641	7,671	7,671	7,661
	5	7,235	7,245	7,245	7,241
	6	7,265	7,255	7,284	7,268
Terapi	1	5,570	5,580	5,580	5576
	2	5,332	5,322	5,322	5,325
	3	5,461	5,471	5,490	5,474
	4	5,114	5,094	5,134	5,114
	5	5,203	5,193	5,193	5,196
	6	5,064	4,945	4,955	4,988

Tabel 7.5 Data MDA Organ Jejunum

Perlakuan	Jejunum	A ₁	A ₂	A ₃	A _{rata-rata}
Sehat	1	4,281	4,291	4,291	4,288
	2	3,944	3,934	3,934	3,938
	3	4,123	4,133	4,123	4,126
	4	4,172	4,172	4,192	4,179
	5	3,915	3,895	3,915	3,908
	6	4,014	3,974	3,994	3,994
Sakit	1	7,364	7,354	7,354	7,357
	2	7,810	7,800	7,780	7,799
	3	7,602	7,592	7,602	7,598

	4	7,493	7,492	7,483	7,489	
	5	7,562	7,532	7,552	7,548	
	6	7,274	7,255	7,245	7,258	
	Terapi	1	4,777	4,797	4,787	4,787
		2	4,489	4,499	4,510	4,499
		3	4,569	4,589	4,579	4,579
4		4,549	4,560	4,559	4,556	
5		4,886	4,896	4,876	4,886	
6		4,371	4,410	4,390	4,390	

Tabel 7.6 Data MDA Organ Ileum

Perlakuan	Ileum	A₁	A₂	A₃	A_{rata-rata}
Sehat	1	4,440	4,440	4,430	4,437
	2	4,291	4,291	4,301	4,295
	3	4,143	4,133	4,123	4,133
	4	4,232	4,212	4,242	4,229
	5	4,153	4,133	4,153	4,146
	6	4,390	4,390	4,380	4,387
Sakit	1	7,096	7,106	7,116	7,106
	2	7,473	7,482	7,473	7,476
	3	7,304	7,294	7,294	7,297
	4	7,383	7,374	7,364	7,374
	5	7,324	7,324	7,314	7,321
	6	6,957	6,967	6,967	6,964
Terapi	1	5,272	5,292	5,292	5,286
	2	5,163	5,183	5,193	5,180
	3	5,481	5,500	5,510	5,497
	4	5,609	5,619	5,629	5,619
	5	5,421	5,401	5,411	5,411
	6	5,094	5,114	5,114	5,107

D.8 Perhitungan Kadar MDA

Perhitungan kadar MDA dilakukan untuk semua nilai absorbansi dengan menggunakan persamaan kurva standar MDA $y = 0,1009x$. Sehingga dapat dihitung kadar MDA sebagai nilai x . Misalnya pada kelompok tikus control 1 organ Duodenum memiliki rata-rata nilai absorbansi sebesar 0.356.

$$\begin{aligned}y &= 0,1009x \\ &= \frac{0.356}{0,1009} \\ &= 3,528 \mu\text{g/ml}\end{aligned}$$

Tabel 8.1 Data Kadar MDA Organ Duodenum

Perlakuan	Sehat	Sakit	Terapi
1	4,532	7,516	5,576
2	4,909	7,585	5,325
3	4,681	7,529	5,474
4	4,225	7,661	5,114
5	4,248	7,241	5,196
6	4,708	7,268	4,988
Jumlah	27,304	44,800	31,675
rata-rata	4,551	7,467	5,279

Prosentase peningkatan kerusakan oksidatif organ Duodenum pada tikus putih yang diterapi fraksi n-heksan ekstrak metanol *Ruellia tuberosa l* adalah:

$$\% \text{ kadar MDA} = \frac{\text{Rataan sehat} - \text{Rataan Sakit}}{\text{Rataan sehat}} \times 100\%$$

$$= \frac{4,551 - 7,467}{4,511} \times 100\% = 65,52 \%$$

Prosentase penurunan kerusakan oksidatif organ Duodenum pada tikus putih yang diterapi fraksi n-heksan ekstrak metanol *Ruellia tuberosa l* adalah:

$$\begin{aligned} \% \text{ kadar MDA} &= \frac{\text{Rataan DM} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan DM}} \times 100\% \\ &= \frac{7,467 - 5,279}{7,467} \times 100\% = 29,30\% \end{aligned}$$

Tabel 8.2 Rataan Kadar MDA Tikus Sehat, Tikus Hasil Induksi MLD-STZ dan Tikus Hasil Terapi fraksi n-heksan ekstrak metanol *Ruellia tuberosa l* pada organ Duodenum

Perlakuan	Rata-rata Kadar MDA (µg/mL)	Peningkatan Kerusakan Oksidatif (%)	Penurunan Kerusakan Oksidatif (%)
Tikus Sehat	4,551±0,271	0	0
Tikus Sakit	7,467±0,172	65,52	
Tikus Terapi	5,279±0,222		29,30

Tabel 8.3 Data Kadar MDA Organ Jejunum

Perlakuan	Sehat	Sakit	Terapi
1	4,288	7,357	4,787
2	3,938	7,799	4,499
3	4,126	7,598	4,579
4	4,179	7,489	4,556
5	3,908	7,548	4,886
6	3,994	7,258	4,390
jumlah	24,433	45,051	27,697
rata-rata	4,072	7,508	4,616

Prosentase peningkatan kerusakan oksidatif organ Jejunum pada tikus putih yang diterapi fraksi n-heksan ekstrak metanol *Ruellia tuberosa l* adalah:

$$\begin{aligned} \% \text{ kadar MDA} &= \frac{\text{Rataan sehat} - \text{Rataan Sakit}}{\text{Rataan sehat}} \times 100\% \\ &= \frac{4,072 - 7,508}{4,072} \times 100\% = 84,38\% \end{aligned}$$

Prosentase penurunan kerusakan oksidatif organ Jejunum pada tikus putih yang diterapi fraksi n-heksan ekstrak metanol *Ruellia tuberosa l* adalah:

$$\begin{aligned} \% \text{ kadar MDA} &= \frac{\text{Rataan DM} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan DM}} \times 100\% \\ &= \frac{7,508 - 4,616}{7,508} \times 100\% = 38,52\% \end{aligned}$$

Tabel 8.4 Rataan Kadar MDA Tikus Sehat, Tikus Hasil Induksi MLD-STZ dan Tikus Hasil Terapi fraksi n-heksan ekstrak metanol *Ruellia tuberosa l* pada organ Jejunum

Perlakuan	Rata-rata Kadar MDA (µg/mL)	Peningkatan Kerusakan Oksidatif (%)	Penurunan Kerusakan Oksidatif (%)
Tikus Sehat	4,072±0,149	0	0
Tikus Sakit	7,508±0,190	84,38	
Tikus Terapi	4,616±0,185		38,52

Tabel 8.5 Data Kadar MDA Organ Ileum

Perlakuan	Sehat	Sakit	Terapi
1	4,437	7,106	5,286
2	4,295	7,476	5,180
3	4,133	7,298	5,497
4	4,229	7,374	5,619
5	4,146	7,321	5,411
6	4,387	6,964	5,107
Jumlah	25,626	43,538	32,101
rata-rata	4,271	7,256	5,350

Prosentase peningkatan kerusakan oksidatif organ Ileum pada tikus putih yang diterapi fraksi n-heksan ekstrak metanol *Ruellia tuberosa l* adalah:

$$\begin{aligned} \% \text{ kadar MDA} &= \frac{\text{Rataan sehat} - \text{Rataan Sakit}}{\text{Rataan sehat}} \times 100\% \\ &= \frac{4,271 - 7,256}{4,271} \times 100\% = 69,89\% \end{aligned}$$

Prosentase penurunan kerusakan oksidatif organ Ileum pada tikus putih yang diterapi fraksi n-heksan ekstrak metanol *Ruellia tuberosa l* adalah:

$$\begin{aligned} \% \text{ kadar MDA} &= \frac{\text{Rataan DM} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan DM}} \times 100\% \\ &= \frac{7,256 - 5,350}{7,256} \times 100\% = 26,26\% \end{aligned}$$

Tabel 8.6 Rataan Kadar MDA Tikus Sehat, Tikus Hasil Induksi MLD-STZ dan Tikus Hasil Terapi fraksi n-heksan ekstrak metanol *Ruellia tuberosa l* pada organ Ileum

Perlakuan	Rata-rata Kadar MDA (µg/mL)	Peningkatan Kerusakan Oksidatif (%)	Penurunan Kerusakan Oksidatif (%)
Tikus Sehat	4,271±0,125	0	0
Tikus Sakit	7,256±0,187	69,89	
Tikus Terapi	5,350±0,195		26,26

D.9 Data dan Uji Statistik Kadar MDA

D.9.1 Data dan Uji Statistik Kadar MDA Organ Duodenum

D.9.1.1 Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$\begin{aligned}
 FK &= \frac{[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij}]^2}{np} \\
 &= \frac{[27,304 + 44,800 + 31,675]^2}{6 \times 3} \\
 &= 598,342
 \end{aligned}$$

D.9.1.2 Menghitung jumlah kuadrat (JK)

$$\begin{aligned}
 \text{a. JK total} &= \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 - FK \\
 &= (4,532^2 + 4,909^2 + \dots + 4,988^2) - 598,342 \\
 &= 626,742 - 598,342 \\
 &= 28,4
 \end{aligned}$$

$$\text{b. JK perlakuan (JK}_p) = \frac{[\sum_{i=1}^p (\sum_{j=1}^n Y_{ij})^2]}{n_i} - FK$$

$$= \frac{[27,304^2 + 44,800^2 + 31,675^2]}{6} - 598,342$$

$$= 27,637$$

c. JK galat percobaan (JKG) = JKtotal - JK perlakuan
 $= 28,4 - 27,637$
 $= 0,763$

D.9.1.3 Menghitung kuadrat tengah (KT) setiap sumber karagaman

dB total = $(n.\alpha)-1$
 $= (6.3)-1$
 $= 17$

dB perlakuan = $\alpha-1 = 3-1 = 2$

a. Kuadrat Tengah Perlakuan (KT_p) = $\frac{JK_p}{dB_{perlakuan}}$
 $= \frac{27,637}{2} = 13,818$

b. Kuadrat Tengah Galat Percobaan (KT_G) = $\frac{JK_{GP}}{dB_{percobaan}}$
 $= \frac{0,763}{15} = 0,050$

D.9.1.4 Menghitung nilai F

$$F_{hitung} = \frac{KT_p}{KT_G}$$

$$= \frac{13,818}{0,050}$$

$$= 276,36$$

F_{tabel} (0,01; 2; 15) pada taraf nyata 1% = 6,358

Tabel 9.1 Analisa Ragam Satu Arah Kadar MDA

Sumber keragaman	dB	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel} (0,01)
Perlakuan	2	27,637	13,818	276,36	6,358
Galat	15	0,763	0,050		
Total	17	28,4	13,868		

Berdasarkan perhitungan di atas terlihat bahwa nilai $F_{hitung} > F_{tabel}$. Pemberian fraksi n-heksan ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l* mempunyai pengaruh yang sangat nyata terhadap kadar MDA organ Duodenum.

D.9.1.5 Menghitung nilai BNT 1%

Untuk mengetahui beda nyata, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

$$\begin{aligned}
 \text{BNT } (\alpha) &= t_{\text{dbg}}^{\alpha/2} \sqrt{\frac{2KT_{\text{galat}}}{n}} \\
 &= t_{\text{dbg}}^{0,01/2} \sqrt{\frac{2KT_{\text{galat}}}{n}} \\
 \text{BNT } (0,01) &= t_{\text{tabel}}^{(0,01/2, 15)} \sqrt{\frac{2(0,050)}{6}} \\
 &= 3,286 \times 0,053 \\
 &= 0,174
 \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan uji BNT 1% perlakuan tersebut memberikan beda yang sangat nyata, ditunjukkan dengan nilai uji memiliki nilai lebih besar dari uji BNT 1% (0,174).

D.9.2 Data dan Uji Statistik Kadar MDA Organ Jejunum

D.9.2. 1 Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$\text{FK} = \frac{[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij}]^2}{np}$$

$$= \frac{[24,433 + 45,051 + 27,697]^2}{6 \times 3}$$

$$= 524,674$$

D.9.2.2 Menghitung jumlah kuadrat (JK)

a. JK total = $\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 - FK$

$$= (4,288^2 + 3,938^2 + \dots + 4,390^2) - 524,674$$

$$= 566,089 - 524,674$$

$$= 41,415$$

b. JK perlakuan (JKp) = $\frac{[\sum_{i=1}^p (\sum_{j=1}^n Y_{ij})^2]}{n_1} - FK$

$$= \frac{[24,433^2 + 45,051^2 + 27,697^2]}{6} - 524,674$$

$$= 565,614 - 524,674$$

$$= 40,94$$

c. JK galat percobaan (JKG) = JKtotal - JK perlakuan

$$= 41,415 - 40,94$$

$$= 0,475$$

D.9.2.3 Menghitung kuadrat tengah (KT) setiap sumber keragaman

dB total = $(n.\alpha) - 1$

$$= (6.3) - 1$$

$$= 17$$

dB perlakuan = $\alpha - 1 = 3 - 1 = 2$

$$\begin{aligned}
 \text{a. Kuadrat Tengah Perlakuan (KT}_p) &= \frac{JK_p}{dB_{\text{perlakuan}}} \\
 &= \frac{40,94}{2} = 20,47
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{b. Kuadrat Tengah Galat Percoaban (KT}_G) &= \frac{JK_{GP}}{dB_{\text{percoaban}}} \\
 &= \frac{0,475}{15} = 0,032
 \end{aligned}$$

D.9.2.4 Menghitung nilai F

$$\begin{aligned}
 \text{Fhitung} &= \frac{KT_p}{KT_G} \\
 &= \frac{20,47}{0,032} \\
 &= 639,687
 \end{aligned}$$

$$\text{Ftabel (0,01; 2; 15) pada taraf nyata 1\%} = 6,358$$

Tabel 9.2 Analisa Ragam Satu Arah Kadar MDA

Sumber keragaman	d B	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel} (0,01)
Perlakuan	2	40,94	20,47	639,687	6,358
Galat	15	0,475	0,032		
Total	17	41,415	20,502		

Berdasarkan perhitungan di atas terlihat bahwa nilai $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$. Pemberian fraksi n-heksan ekstrak metanol daun *Ruellia tuberosa l* mempunyai pengaruh yang sangat nyata terhadap kadar MDA organ Jejunum.

D.9.2.5 Menghitung nilai BNT 1%

Untuk mengetahui beda nyata, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

$$\begin{aligned} \text{BNT } (\alpha) &= t_{\text{dbg}}^{\alpha/2} \sqrt{\frac{2KT_{\text{galat}}}{n}} \\ &= t_{\text{dbg}}^{0,01/2} \sqrt{\frac{2KT_{\text{galat}}}{n}} \end{aligned}$$

$$\text{BNT } (0,01) = t_{\text{tabel}}^{(0,01/2, 15)} \sqrt{\frac{2(0,032)}{6}} = 3,286 (0,042) = 0,138$$

Berdasarkan perhitungan uji BNT 1% perlakuan tersebut memberikan beda yang sangat nyata, ditunjukkan dengan nilai uji memiliki nilai lebih besar dari uji BNT 1% (0,138).

D.9.3 Data dan Uji Statistik Kadar MDA Organ Ileum

D.9.3.1 Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$\begin{aligned} \text{FK} &= \frac{[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij}]^2}{np} \\ &= \frac{[25,626 + 43,538 + 32,101]^2}{6 \times 3} \\ &= 569,700 \end{aligned}$$

D.9.3.2 Menghitung jumlah kuadrat (JK)

$$\begin{aligned} \text{a. JK total} &= \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 - \text{FK} \\ &= (4,437^2 + 4,295^2 + \dots + 5,107^2) - 569,700 \\ &= 597,568 - 569,700 \\ &= 27,868 \end{aligned}$$

$$\text{b. JK perlakuan (JK}_p) = \frac{[\sum_{i=1}^p (\sum_{j=1}^n Y_{ij})^2]}{n_i} - \text{FK}$$

$$= \frac{[25,626^2 + 43,538^2 + 32,101^2]}{6} - 569,700$$

$$= 582,774 - 569,700$$

$$= 13,074$$

$$\begin{aligned} \text{c. JK galat percobaan (JKG)} &= \text{JKtotal} - \text{JK perlakuan} \\ &= 27,868 - 13,074 \\ &= 14,794 \end{aligned}$$

D.9.3.3 Menghitung kuadrat tengah (KT) setiap sumber karagaman

$$\begin{aligned} \text{dB total} &= (n.\alpha)-1 \\ &= (6.3)-1 \\ &= 17 \end{aligned}$$

$$\text{dB perlakuan} = \alpha-1 = 3-1 = 2$$

$$\begin{aligned} \text{a. Kuadrat Tengah Perlakuan (KT}_p) &= \frac{\text{JK}_p}{\text{dB}_{\text{perlakuan}}} \\ &= \frac{13,074}{2} \\ &= 6,537 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{a. Kuadrat Tengah Galat Percobaan (KT}_G) &= \frac{\text{JK}_{GP}}{\text{dB}_{\text{percobaan}}} \\ &= \frac{14,794}{15} \\ &= 0,986 \end{aligned}$$

D.9.3.4 Menghitung nilai F

$$\text{Fhitung} = \frac{KT_p}{KT_G}$$

$$= \frac{6,537}{0,986}$$

$$= 6,629$$

F_{tabel} (0,01; 2; 15) pada taraf nyata 1% = 6,358

Tabel 9.3 Analisa Ragam Satu Arah Kadar MDA

Sumber keragaman	dB	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel} (0,01)
Perlakuan	2	13,074	6,537	6,629	6,358
Galat	15	14,794	0,986		
Total	17	27,868	7,532		

Berdasarkan perhitungan di atas terlihat bahwa nilai F_{hitung} > F_{tabel}. Pemberian ekstrak *Ruellia tuberosa l* mempunyai pengaruh yang sangat nyata terhadap kadar MDA organ Jejunum.

D.9.3.5 Menghitung nilai BNT 1%

Untuk mengetahui beda nyata, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

$$\text{BNT } (\alpha) = t_{\text{dbg}}^{\alpha/2} \sqrt{\frac{2KT_{\text{galat}}}{n}}$$

$$= t_{\text{dbg}}^{0,01/2} \sqrt{\frac{2KT_{\text{galat}}}{n}}$$

$$\text{BNT } (0,01) = t_{\text{tabel}}^{(0,01/2, 15)} \sqrt{\frac{2(0,986)}{6}} = 3,286 (0,234) = 0,769$$

Berdasarkan perhitungan uji BNT 1% perlakuan tersebut memberikan beda yang sangat nyata, ditunjukkan dengan nilai uji memiliki nilai lebih besar dari uji BNT 1% (0,769).

Lampiran E. Sertifikat Laik Etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya Malang



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"**

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 tuberosa* 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. 15600903 198802 2 001