

**Pengaruh Pemberian Herbal *Spray* Berbasis Bioaktif dari
Spirulina (*Spirulina* sp.) terhadap Ekspresi iNOS pada Sel β -
pankreas dan Aktivitas Protease pada Luka Tikus DM Tipe 1**

SKRIPSI

Oleh:

RACHMAWATI DWI AGUSTIN

105090200111030



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

**Pengaruh Pemberian Herbal *Spray* Berbasis Bioaktif dari
Spirulina (*Spirulina* sp.) terhadap Ekspresi iNOS pada Sel β -
pankreas dan Aktivitas Protease pada Luka Tikus DM Tipe 1**

SKRIPSI

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

Oleh:

RACHMAWATI DWI AGUSTIN
105090200111030



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

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Pengaruh Pemberian Herbal *Spray* Berbasis Bioaktif dari *Spirulina* (*Spirulina* sp.) terhadap Ekspresi iNOS pada Sel β -pankreas dan Aktivitas Protease pada Luka Tikus DM Tipe 1

Oleh:

RACHMAWATI DWI AGUSTIN
105090200111030

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. 196009031988022001

Prof.Dr.Ir. Chanif Mahdi, MS
NIP. 195204121980021001

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Edi Priyo Utomo, MS
NIP. 195712271986031003

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rachmawati Dwi Agustin

NIM : 105090200111030

Jurusan : Kimia

Penulisan skripsi berjudul:

Pengaruh Pemberian Herbal *Spray* Berbasis Bioaktif dari *Spirulina* (*Spirulina* sp.) terhadap Ekspresi iNOS pada Sel β -pankreas dan Aktivitas Protease pada Luka Tikus DM Tipe 1

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 diisi 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, Januari 2014

Yang menyatakan,

(Rachmawati Dwi Agustin)

NIM. 105090200111030

Pengaruh Pemberian Herbal *Spray* Berbasis Bioaktif dari *Spirulina* (*Spirulina* sp.) terhadap Ekspresi iNOS pada Sel β -pankreas dan Aktivitas Protease pada Luka Tikus DM Tipe 1

ABSTRAK

Diabetes Melitus (DM) merupakan penyakit yang disebabkan oleh gangguan metabolisme karbohidrat. DM juga dapat disebabkan oleh rusaknya sel-sel β dari pulau-pulau Langerhans pada pankreas yang berfungsi sebagai penghasil insulin. Pada penderita DM ketika terluka akan lebih sulit dalam proses penyembuhan lukanya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian herbal *spray* *Spirulina* terhadap perubahan luka sayatan, penurunan ekspresi iNOS pada sel β -pankreas dan aktivitas protease pada luka tikus hasil induksi MLD STZ (*Multi Low Dose Streptozotocin*) dengan dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari berturut-turut. Pada penelitian ini menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) sebanyak 15 ekor yang dibagi dalam 3 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor, tiga kelompok tersebut adalah kelompok tikus sehat dengan luka sayatan di punggung, kelompok tikus DM dengan luka sayatan dan kelompok tikus DM dengan luka sayatan yang diberi terapi herbal *spray* *Spirulina* selama 14 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian herbal *spray* *Spirulina* dapat mengurangi panjang luka sayatan pada tikus DM tipe 1 dari 4,28 cm menjadi 0,5 cm, mampu menurunkan ekspresi iNOS pada sel β -pankreas tikus DM tipe 1 serta mampu menurunkan aktivitas protease pada luka tikus DM tipe 1 sebesar 48,23%.

Kata kunci: DM tipe 1, luka, herbal *spray* *Spirulina*, ekspresi iNOS, aktivitas protease

The Effect of Herbal Medicine based on *Spray* of Bioactive Spirulina (*Spirulina* sp.) against iNOS in Pancreatic β -Cells and Protease Activity on Wound type 1 Diabetic Rats

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a disease caused by disorders of carbohydrate metabolism. DM can also be caused by the destruction of β cells of the islands of Langerhans in the pancreas that functions as an insulin-producing. In patients with DM when injured will be more difficult in the wound healing process. This study aims to determine the effect of Spirulina herbal *spray* against changes cuts, reduction in iNOS expression in β -cells of the pancreas and protease activity in wound induction results MLD STZ rats (*Multi Low Dose Streptozotocin*) at a dose of 20 mg / kg for 5 consecutive days in a row. In this study using 15 rats (*Rattus norvegicus*) were divided into three groups with each group consisting of 5 rats, the three groups are groups of healthy mice with skin wound on his back, a group of diabetic rats with wound and groups diabetic rats with wound and to get therapy of Spirulina herbal *spray* during 14 days. The results showed that administration of Spirulina herbal *spray* can reduce the length of incision wounds in diabetic rats from 4,28 cm until 0,5 cm, were able to decrease the expression of iNOS in pancreatic β -cells of DM type 1 rats and be able to decrease of 48,23% protease activity in wound DM type 1 rats.

Keywords: DM type 1, wound, herbal *spray* Spirulina, iNOS expression, protease activity

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa karena berkat rahmat dan anugerahNya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul **“Pengaruh Pemberian Herbal *Spray* Berbasis Bioaktif dari *Spirulina* (*Spirulina* sp.) terhadap Ekspresi iNOS pada Sel β -pankreas dan Aktivitas Protease pada Luka Tikus DM Tipe 1”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, di Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang.

Penulisan tugas akhir ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan berbagai pihak. Oleh sebab itu, penulis memberikan penghargaan dan terima kasih kepada:

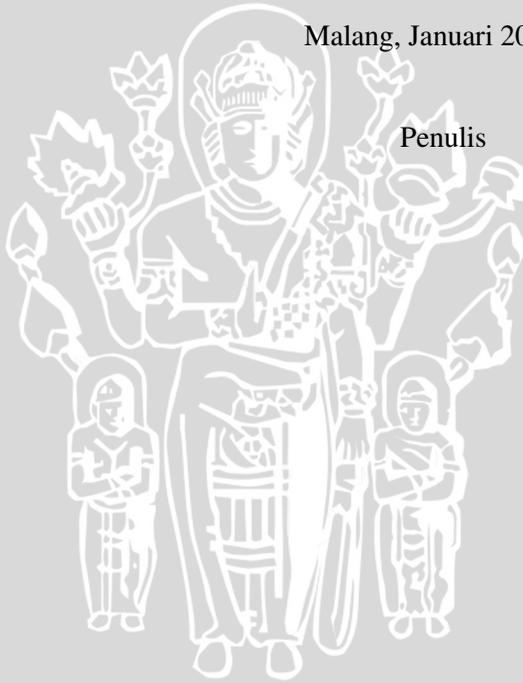
1. Prof.Dr. drh. Aulanni`am, DES dan Prof.Dr.Ir. Chanif Mahdi, MS, selaku dosen pembimbing I dan pembimbing II yang telah meluangkan banyak waktu untuk memberikan bimbingan, arahan, serta dukungan dalam penyelesaian tugas akhir ini.
2. Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc, Drs. Sutrisno, M.Si, dan segenap dosen bidang minat Biokimia yang telah memberikan arahan dan saran dalam penyelesaian tugas akhir ini.
3. Drs. Mohammad Misbah Khunur, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan bimbingan, arahan dan saran dalam penyelesaian tugas akhir ini.
4. Dr. Sasangka Prasetyawan, MS, selaku dosen penasehat akademik yang telah memberikan bimbingan, arahan, dukungan, serta nasehat selama masa studi.
5. Dr. Edi Priyo Utomo, MS, selaku Ketua Jurusan Kimia, serta segenap Staf Pengajar dan Karyawan Jurusan Kimia untuk semua perhatian yang telah diberikan kepada penulis.
6. Ayah Sulaiman, Almh. Ibu Titik Asridiatin, Kakak Yuli Astutik Fatmawati, Kakak Hafit Kurdianto, dan seluruh keluarga yang selalu mendoakan, memberikan dukungan, semangat dan kasih sayang kepada penulis.
7. Kartika Rahma, Balqis Kurniasari, Hema Aprilia Setyo Windari, Hikmanita Lisan Nashukha, Fetty Alvionita, Nadhir Dicky Perdana, Ilmimada Harfiya, serta seluruh keluarga besar Kimia khususnya angkatan 2010 yang telah banyak memberikan semangat dan cerita indah selama masa studi.

8. Pak Harmaji, Pak Maryono, Kakak Vivi Shofia, Kakak Anita Herawati, Kakak Rizka Nizar, Kakak Hilman Nurmahdi, Kakak Elhaq dan seluruh pihak Laboratorium Biokimia FMIPA UB yang telah banyak membantu hingga terselesaikannya tugas akhir ini.
9. Seluruh keluarga besar Kertosariro 53C yang telah menjadi keluarga kedua dan seluruh pihak yang terlibat yang telah banyak membantu hingga terselesaikannya tugas akhir ini.

Tugas akhir ini tentunya masih terdapat banyak kesalahan dan kekurangan. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran demi penyempurnaan tugas akhir ini.

Malang, Januari 2014

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISITILAH DAN LAMBANG	xv
BAB I PENDAHULUAN	
1. 1. Latar Belakang Masalah	1
1. 2. Perumusan Masalah.....	3
1. 3. Batasan Masalah.....	3
1. 4. Tujuan Penelitian.....	4
1. 5. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2. 1 <i>Spirulina (Spirulina sp.)</i>	5
2. 2 Senyawa Antioksidan dalam <i>Spirulina (Spirulina sp.)</i>	7
2. 3 Diabetes Melitus.....	8
2. 4 Streptozotocin (STZ).....	9
2. 5 Hewan Coba	11
2. 6 Luka.....	12
2. 7 Pankreas	12
2. 8 Enzim Protease	13
2. 9 Pengukuran Aktivitas Enzim Protease	14
2. 10 Ekspresi iNOS (inducible Nitric Oxigen Synthase) .	15
2. 11 Imunohistokimia.....	16
BAB III METODE PENELITIAN	
3. 1 Waktu dan Tempat Penelitian	17
3. 2 Alat dan Bahan Penelitian	
3.2.1 Alat Penelitian	17
3.2.2 Bahan Penelitian	17
3. 3 Tahapan Penelitian	18

3.4	Metode Kerja	
3.4.1	Pembuatan Herbal <i>Spirulina</i> Berbasis Bioaktif <i>Spirulina</i> (<i>Spirulina sp.</i>).....	19
3.4.2	Uji Fitokimia Ekstrak <i>Spirulina</i> (<i>Spirulina sp.</i>).....	19
3.4.3	Analisis Ekstrak <i>Spirulina</i> Menggunakan Metode Kromatografi Cair-Spektrometri Massa	20
3.4.4	Preparasi Hewan Coba Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Strain Wistar.....	20
3.4.5	Pembuatan Larutan Streptozotocin dan Induksi MLD-STZ pada Hewan Coba.....	21
3.4.6	Pengukuran Glukosa Darah dan Pengukuran Luka pada Hewan Coba.....	21
3.4.7	Terapi Hewan Coba DM dengan Herbal <i>spray</i> Berbasis Bioaktif <i>Spirulina</i>	21
3.4.8	Pengambilan Organ Pankreas dan Organ Kulit	22
3.4.9	Isolasi Protease dari Organ Kulit	22
3.4.10	Penentuan Aktivitas Enzim Protease	
3.4.10.1	Pembuatan Kurva Baku Tirosin....	23
3.4.10.2	Pengukuran Aktivitas Protease Hasil Isolasi dari Kulit.....	23
3.4.11	Embedding Pankreas.....	23
3.4.12	Pembuatan Preparat Pankreas	24
3.4.13	Ekspresi iNOS dengan metode Imunohistokimia	24
3.5	Analisa Data	25

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Hasil Uji Fitokimia Ekstrak <i>Spirulina</i> (<i>Spirulina sp.</i>).....	26
4.2	Analisis Ekstrak <i>Spirulina</i> Menggunakan Metode Kromatografi Cair-Spektrometri Massa.....	26
4.3	Induksi MLD-STZ terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus.....	27
4.4	Terapi Hewan Coba terhadap Panjang Luka Tikus..	32

4.5 Pengaruh Pemberian Herbal <i>Spirulina</i> (<i>Spirulina</i> sp.) terhadap Aktivitas Protease pada Luka Tikus DM T1.....	33
4.6 Pengaruh Pemberian Herbal <i>Spirulina</i> (<i>Spirulina</i> sp.) Terhadap Ekspresi iNOS pada Sel β -pankreas Tikus DM T1.....	36
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	40
5.2 Saran.....	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN.....	47



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1:	<i>Spirulina</i> sp.....	6
Gambar 2.2:	Karakteristik kimia senyawa flavonoid jenis kuersetin sebagai antioksidan	8
Gambar 2.3:	Mekanisme reaksi alkilasi DNA oleh paparan STZ terhadap kerusakan sel β pankreas	9
Gambar 2.4:	Struktur Streptozotocin.....	10
Gambar 2.5:	Pankreas.....	13
Gambar 4.1:	Hasil analisa Kromatografi Cair-Spektrometri Massa pada kuersetin.....	27
Gambar 4.2:	Mekanisme pengalkilasian STZ yang memicu kerusakan DNA	29
Gambar 4.3:	Perbandingan kadar glukosa darah tikus sehat, tikus sakit, dan tikus terapi	30
Gambar 4.4:	Reaksi <i>scavenging</i> radikal bebas (R^*) oleh senyawa polifenol.....	31
Gambar 4.5:	Perbandingan panjang luka rata-rata tikus sehat, tikus sakit, dan tkus terapi	32
Gambar 4.6:	Perbandingan aktivitas protease rata-rata tikus sehat, tikus sakit, dan tikus terapi	34
Gambar 4.7:	Ekspresi iNOS pada pulau langerhans. Perbesaran 400x.....	37
Gambar 4.8:	Mekanisme terbentuknya NO^* endogen yang dikatalisis oleh iNOS akibat adanya peradangan.	39
Gambar D.1:	Kurva serapan tirosin.....	65
Gambar D.2:	Kurva baku tirosin	66
Gambar E.1:	Jenis-jenis senyawa flavonoid yang termati pada Kromatografi Cair-Spektrometri Massa.....	71

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	: Komposisi Kimia dari <i>Spirulina</i> (% berat kering)	6
Tabel 4.1	: Kadar Glukosa Darah Tikus Sehat, Tikus Sakit, dan Tikus Terapi	29
Tabel 4.2	: Panjang Luka Rata-rata Tikus Sehat, Tikus Sakit, dan Tikus Terapi	32
Tabel 4.3	: Rataan Aktivitas Protease Hasil Isolasi dari Kulit Luka Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>).....	33
Tabel C.1	: Rataan Kadar Glukosa Darah (mg/dL).....	61
Tabel D.1	: Absorbansi Larutan Baku Tirosin 20 ppm.....	65
Tabel D.2.1:	Absorbansi Larutan Baku Tirosin 275 nm.....	66
Tabel D.2.2:	Data Absorbansi Tirosin.....	66



DAFTAR LAMPIRAN

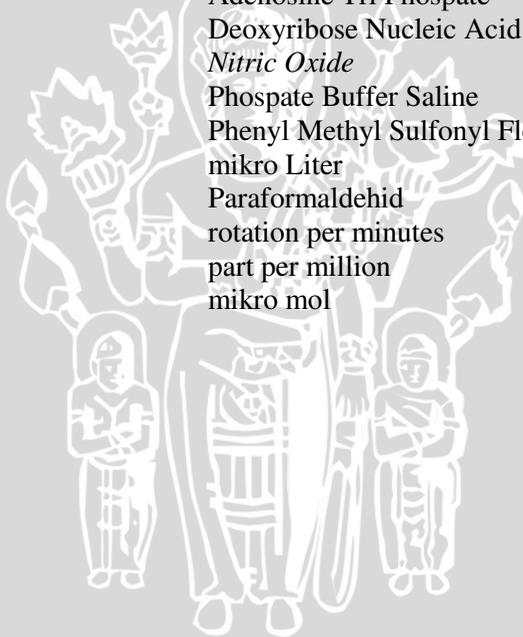
Lampiran A. Skema Kerja.....	47
A.1 Skema Kerja Penelitian	47
A.2 Pembuatan Herbal <i>spray Spirulina (Spirulina sp.)</i>	48
A.3 Uji Fitokimia	48
A.3.1 Flavonoid.....	48
A.3.2 Terpenoid.....	49
A.3.3 Alkaloid	49
A.4 Preparasi Hewan Coba	50
A.5 Pembuatan larutan STZ dan injeksi STZ.....	50
A.6 Prosedur Kerja Perlakuan Hewan Coba	51
A.7 Pengambilan organ pankreas dan kulit.....	51
A.8 Isolasi Protease dari Organ Kulit.....	52
A.8.1 Isolasi Enzim	52
A.8.2 Pembuatan Larutan Blanko	53
A.9 Penentuan Aktivitas Enzim Protease.....	53
A.9.1 Pembuatan Larutan Stok Tirosin	53
A.9.2 Pembuatan Larutan Tirosin Standar	54
A.9.3 Penentuan λ maksimum Tirosin	54
A.9.4 Pembuatan Kurva Baku Tirosin	54
A.9.5 Pembuatan Larutan Kasein.....	55
A.9.6 Pengukuran Aktivitas Protease.....	55
A.10 Embedding Pankreas	56
A.11 Pembuatan Preparat Pankreas.....	56
A.12 Ekspresi iNOS dengan Metode Imunohistokimia.....	57
Lampiran B. Preparasi Larutan	58
B.1 Pembuatan Larutan Buffer Sitrat pH 4,5	58
B.2 Pembuatan Larutan Streptozotocin.....	58
B.3 Pembuatan Larutan Phospat Buffer Saline (PBS) pH 7,4.....	58
B.4 Pembuatan Larutan Azida (NaN_3) 1%	58
B.5 Pembuatan Larutan PBS-Azida	59
B.6 Pembuatan Larutan NaCl-Fis 0,9%	59
B.7 Pembuatan Larutan PFA (Paraformaldehid) 4%	59
B.8 Pembuatan Larutan Etanol Bertingkat.....	59

B.9 Pembuatan TCA 4%	60
B.10 Pembuatan Larutan Tirosin Standar	60
B.11 Pembuatan Larutan NaH_2PO_4 0,2 M (Mr= 137,99 g/mol) (asam).....	60
B.12 Pembuatan Larutan Na_2HPO_4 0,2 M (Mr= 141,96 g/mol) (basa).....	60
B.13 Pembuatan Larutan Buffer Fosfat 0,2 M pH 7	61
B.14 Pembuatan Larutan Kasein 500 ppm.....	61
B.15 Pembuatan Larutan Stok Tirosin 500 ppm.....	61
Lampiran C. Data dan Uji Statistika Kadar Glukosa Darah.....	61
Lampiran D. Data dan Uji Statistika Aktivitas Protease.....	65
Lampiran E. Hasil Analisa dengan Kromatografi Cair-Spektroskopi Massa.....	71
Lampiran F. Sertifikat Laik Etik	72



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

DM	Diabetes Melitus
iNOS	<i>inducible Nitric Oxygen Synthase</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
MLD STZ	<i>Multi Low Dose Streptozotocin</i>
TCA	Tri Chloro Acetic Acid
pH	power of Hidrogen
UV	Ultra Violet
λ	panjang gelombang
nm	nano meter
mmol/L	mili mol per Liter
mg/dL	mili gram per desi Liter
ATP	Adenosine Tri Phospate
DNA	Deoxyribose Nucleic Acid
NO	<i>Nitric Oxide</i>
PBS	Phosphate Buffer Saline
PMSF	Phenyl Methyl Sulfonyl Flouride
μ L	mikro Liter
PFA	Paraformaldehid
rpm	rotation per minutes
ppm	part per million
μ mol	mikro mol



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Diabetes Melitus (DM) dalam beberapa tahun terakhir ini bukan lagi merupakan penyakit yang awam bagi masyarakat dan semakin tahun jumlah penderitanya semakin meningkat. Populasi penderita DM di Indonesia diperkirakan berkisar antara 1,5 sampai 2,5% kecuali Manado 6%, dengan jumlah penduduk sekitar 200 juta jiwa sehingga kurang lebih 3-5 juta penduduk Indonesia menderita diabetes. Tercatat pada tahun 1995, jumlah penderita diabetes di Indonesia mencapai 5 juta jiwa. Pada tahun 2005 diperkirakan akan mencapai 12 juta penderita [1]. Semakin meningkatnya penyebaran penyakit diabetes melitus ini tidak diiringi dengan pengobatan yang bekerja secara efektif dan efisien, maka perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengobati penyakit DM secara efektif dan efisien dari potensi tanaman herbal yang banyak dihasilkan di Negara Indonesia.

Diabetes melitus adalah suatu penyakit yang timbul akibat gangguan metabolisme karbohidrat, gangguan ini akan menyebabkan keadaan hiperglikemia. DM juga dapat disebabkan oleh rusaknya sel-sel β dari pulau-pulau Langerhans pada pankreas yang berfungsi sebagai penghasil insulin [2]. Diabetes melitus dapat diklasifikasikan menjadi dua tipe, yaitu diabetes melitus tipe I dan diabetes melitus tipe II. Dalam penelitian ini akan membahas penyembuhan dari penyakit DM tipe I yang merupakan jenis diabetes melitus yang bergantung pada insulin, kelainan terletak pada sel β pankreas. Sel ini tidak mampu mensekresi insulin dalam kuantitas dan kualitas yang cukup atau tidak terjadi sekresi insulin, sehingga mengakibatkan kekurangan insulin secara absolut [3]. Kerusakan sel β pankreas menyebabkan konsentrasi glukosa darah tinggi (hiperglikemia) [4]. Keadaan ini memicu terjadinya autooksidasi glukosa yang akan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) [5].

Pada penderita DM ketika terluka akan lebih sulit dalam proses penyembuhan lukanya akibat kadar glukosa darah yang tinggi yang dapat mengganggu fungsi kekebalan tubuh dalam menghadapi masuknya virus atau kuman serta memicu produksi ROS yang berlebih. Sehingga secara tidak langsung juga memicu terjadinya peningkatan aktivitas enzim protease yang berlebih yang dapat

menyebabkan kerusakan jaringan dan tidak lagi berperan dalam penyembuhan luka untuk membunuh bakteri pada sel yang mengalami inflamasi [6].

Peningkatan produksi ROS dapat dilakukan dengan menginduksi tubuh tikus sebagai hewan coba dengan MLD-STZ sehingga dapat menghasilkan radikal nitrogen oksida (NO) dalam jumlah banyak yang akan bereaksi dengan superoksida membentuk peroksinitrit (ONOO^-) [7]. Pembentukan NO ini berperan dalam penghancuran sel β -pankreas, maka dapat digunakan sebagai parameter untuk mengetahui kerusakan yang terjadi pada sel β pankreas melalui Ekspresi iNOS dengan metode imunohistokimia.

Pemanfaatan Spirulina sebagai obat diabetes melitus tipe 1 (DM T1) dikarenakan Spirulina memiliki daya potensi besar untuk mengobati luka sayatan pada penderita diabetes, serta dapat berpotensi menurunkan kadar glukosa darah. Hal ini diperkuat dengan adanya kandungan antioksidan pada ekstrak Spirulina sebanyak 76% [8]. Spirulina juga mengandung banyak protein, asam lemak esensial seperti γ Linoleic Acid, vitamin, mineral serta pigmen baik β -karoten dan klorofil α maupun fikosianin yang juga merupakan senyawa antioksidan [8]. Karena berpotensi dapat menurunkan kadar glukosa darah dengan jumlah antioksidan yang melimpah, maka Spirulina juga dapat memperbaiki sel β pankreas akibat pembentukan NO dan dapat bertindak sebagai *scavenger* ROS yang akan menghambat aktivitas protease pada organ kulit. Herbal *spray* berbahan dasar ekstrak Spirulina lebih praktis daripada metode sonde ataupun dalam bentuk tablet dikarenakan penggunaan herbal *spray* cukup dengan disemprotkan pada bagian luka sayatan penderita diabetes. Herbal *spray* bekerja dari luar maupun dalam tubuh. Cairan hasil semprotan Herbal *spray* akan masuk ke dalam tubuh melalui luka. Berdasarkan uraian tersebut, maka perlu dilakukan penelitian mengenai herbal *spray* berbasis bioaktif Spirulina dalam menghambat protease berlebih dalam tubuh sehingga dapat membantu penutupan luka dan membunuh bakteri pada sel yang mengalami inflamasi serta dapat memperbaiki kerusakan pankreas yang ditunjukkan melalui ekspresi iNOS pada organ pankreas untuk tikus DM T1.

1.2 Perumusan Masalah

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

1. Apakah terdapat perubahan pada luka sayatan tikus DM T1 yang telah diinduksi dengan MLD-STZ setelah pemberian herbal *spray* berbasis bioaktif Spirulina?
2. Bagaimana pengaruh pemberian herbal *spray* berbasis bioaktif Spirulina terhadap ekspresi iNOS pada sel β -pankreas tikus DM T1?
3. Bagaimana pengaruh pemberian herbal *spray* berbasis bioaktif Spirulina terhadap aktivitas protease pada luka tikus DM T1?

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 3 bulan dengan berat badan rata-rata 130-230 gram, yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler Jurusan Biologi FMIPA UB. Perlakuan terhadap tikus telah mendapatkan sertifikat laik etik oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No: 175-KEP-UB.
2. Dosis MLD-STZ yang diberikan pada tikus adalah 20 mg/kg BB per hari selama 5 hari berturut-turut dan diinkubasi selama 2 minggu. Sehingga diperoleh tikus DM tipe 1 dengan kadar glukosa darah > 200 mg/dl. Kadar glukosa darah diukur menggunakan glukometer digital.
3. Terapi herbal *spray* berbasis bioaktif Spirulina diberikan pada luka tikus DM T1 selama 14 hari berturut-turut dengan cara *dispray* pada luka tikus DM T1. Kemudian diamati dan diukur panjang luka tikus.
4. Herbal *spray* dibuat dengan cara mengekstrak Spirulina (*Spirulina* sp.) menggunakan pelarut air, pemanasan dan penyaringan. Kemudian ekstrak dilarutkan dalam *ringer solution* jenis NaCl-Fisiologis 0,9%.
5. Pengukuran aktivitas protease terhadap kulit luka tikus DM T1 menggunakan kasein sebagai substrat yang diukur dengan metode Spektrofotometri UV.

6. Pengamatan perbaikan sel β -pankreas pada tikus DM T1 dengan ekspresi iNOS melalui metode imunohistokimia pada preparat organ pankreas.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang di atas penelitian ini bertujuan sebagai berikut:

1. Mengetahui perubahan luka sayatan pada tikus DM T1 yang telah diinduksi dengan MLD-STZ setelah pemberian herbal *spray* berbasis bioaktif Spirulina.
2. Mengetahui pengaruh pemberian herbal *spray* berbasis bioaktif Spirulina terhadap penurunan ekspresi iNOS pada sel β -pankreas tikus DM T1.
3. Mengetahui pengaruh pemberian herbal *spray* berbasis bioaktif Spirulina terhadap aktivitas protease pada luka tikus DM T1.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah dapat memberikan informasi mengenai manfaat herbal *spray* berbasis bioaktif Spirulina (*Spirulina* sp.) sebagai pengobatan alternatif luka Diabetes Melitus yang dapat mengurangi efek kerusakan organ tubuh yang terjadi akibat Diabetes Melitus.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Spirulina* (*Spirulina* sp.)

Spirulina merupakan golongan alga hijau biru yang dapat ditemukan pada perairan tawar maupun asin. Golongan alga ini telah lama digunakan sebagai sumber bahan makanan di Meksiko dan Afrika dikarenakan kandungan proteinnya yang tinggi mencapai 60-70% [9]. Saat ini terdapat sekitar 2.000 jenis *Spirulina* di dunia. *Spirulina* memiliki ciri-ciri morfologi yang berbentuk benang atau filamen dengan berpilin yang berbentuk spiral [10].

Spirulina sp. dapat menghasilkan berbagai senyawa bioaktif yang bernilai tinggi. Spesies mikroalga ini kaya akan protein, asam lemak essensial seperti γ Linoleic Acid, vitamin, mineral serta pigmen baik β -karoten dan klorofil α maupun fikosianin [11]. Ekstrak air *Spirulina* juga terbukti memiliki efek antioksidan sebesar 76% [8]. Potensi mikroalga *Spirulina* sebagai suplementasi untuk penyakit diabetes karena kandungan asam lemak gamma linoleat dan antioksidan dalam *Spirulina*, yang mengatur metabolisme lemak dengan baik, serta kandungan protein yang tinggi didalamnya akan meningkatkan respon insulin.

Spirulina juga mengandung mineral yang baik bagi tubuh salah satunya kandungan kromium yang baik juga bagi penderita diabetes untuk merangsang kinerja pankreas memproduksi insulin. Selain itu *Spirulina* juga kaya akan berbagai macam asam-asam amino (36,84% asam amino essensial dan 63,19% asam amino non-essensial), 11 jenis vitamin (seperti Niasin, Tiamin, Riboflavin), 13 jenis asam lemak (seperti grup omega 3, grup monoenoat, grup omega 6, beberapa asam-asam lemak jenuh), 11 jenis mineral terutama mangan dan kalium pigmen dan enzim, seperti klorofil, β -karoten, karotenoid, fikosianin, enzim superoksida dismutase [12].

β -karoten dan klorofil α yang terkandung dalam *Spirulina* merupakan antioksidan. Antioksidan adalah senyawa yang dapat mengurangi dampak negatif yang ditimbulkan oleh radikal bebas. β -karoten dapat melindungi tubuh dan dapat mencegah berbagai penyakit, menghambat pertumbuhan sel kanker, mencegah serangan jantung, katarak, mengobati penyakit kulit, dan meningkatkan fungsi kekebalan tubuh [13]. Selain memiliki banyak kandungan yang berperan sebagai antioksidan, berdasarkan penelitian *Spirulina* juga

positif mengandung senyawa flavonoid yang merupakan senyawa antioksidan tersier dan umum terdapat dalam pigmen tumbuhan [14].

Spirulina yang terbukti mengandung senyawa flavonoid mampu menurunkan kadar glukosa darah melalui beberapa mekanisme. Pemberian terapi menggunakan *Spirulina platensis* pada tikus dengan kondisi diabetes mampu meningkatkan plasma insulin, C-peptida, dan hemoglobin darah tikus. Selain itu juga meningkatkan aktivitas enzim heksokinase dan menurunkan aktivitas enzim glukosa-6-fosfat (G6P). Secara oral, pemberian Spirulina 15 mg/kg BB mampu menurunkan kadar glukosa darah tikus hasil induksi streptozotocin, dari 232,33 mg/dL menjadi 114,00 mg/dL [15]

Klasifikasi Spirulina adalah sebagai berikut [16]:

- Kingdom : Protista
- Divisi : Cyanophyta
- Kelas : Cyanophyceae
- Ordo : Nostocales
- Famili : Oscilatoriaceae
- Genus : Spirulina
- Spesies : *Spirulina* sp.



Gambar 2.1 *Spirulina* sp. [17]

Tabel 2.1 Komposisi Kimia dari Spirulina (% berat kering) [18]

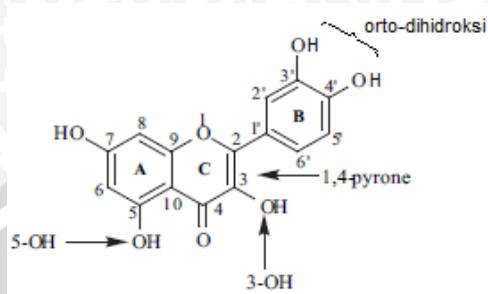
Komposisi Kimia	Konsentrasi (%)
Protein	60-71
Karbohidrat	13-16
Lemak	6-7

2.2 Senyawa Antioksidan dalam Spirulina (*Spirulina* sp.)

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut dapat diredam [19]. Berdasarkan sumber perolehannya ada 2 macam antioksidan, yaitu antioksidan alami dan antioksidan buatan (sintetik). Ciri khas adanya senyawa antioksidan adalah dengan banyaknya senyawa fenol atau terdapatnya gugus -OH dalam suatu senyawa. Tubuh manusia tidak mempunyai cadangan antioksidan dalam jumlah berlebih, sehingga jika terjadi paparan radikal berlebih maka tubuh membutuhkan antioksidan eksogen. Adanya kekhawatiran akan kemungkinan efek samping yang belum diketahui dari antioksidan sintetik menyebabkan antioksidan alami menjadi alternatif yang sangat dibutuhkan [20].

Antioksidan alami mampu melindungi tubuh terhadap kerusakan yang disebabkan spesies oksigen reaktif, mampu menghambat terjadinya penyakit degeneratif serta mampu menghambat peroksidasi lipid pada makanan. Antioksidan alami umumnya mempunyai gugus hidroksi dalam struktur molekulnya [19].

Pada *Spirulina* terdapat beberapa senyawa bioaktif yang berperan sebagai antioksidan, salah satunya adalah flavonoid jenis kuersetin. Kuersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) merupakan golongan flavonoid yang memiliki kemampuan menangkap radikal bebas dan spesi oksigen reaktif seperti anion superoksida dan radikal hidroksil [21]. Pada kuersetin, adanya struktur *o*-hidroksi pada cincin B memberikan derajat stabilitas yang tinggi pada radikal fenoksil melalui delokalisasi elektron dan hal ini merupakan sifat penting dari antiradikal. Ikatan rangkap 2,3 dengan sistem konjugasinya juga dapat memberikan stabilitas bagi radikal fenoksil flavonoid dengan melakukan resonansi, sehingga meningkatkan aktivitas flavonoid sebagai *scavenging* radikal. Karakteristik kimia senyawa flavonoid sebagai antioksidan adalah karena adanya: (a). gugus hidroksil 3',4' (*orto*-dihidroksi) pada cincin B flavonoid, (b). ikatan rangkap 2,3 yang terkonjugasi dengan gugus 4-okso (gugus 1,4-piron) pada cincin C dan (c). gugus hidroksil pada posisi 3 dan 5 [22] (Gambar 2.2).



Gambar 2.2 Karakteristik kimia senyawa flavonoid jenis kuersetin sebagai antioksidan [23]

2.3 Diabetes Melitus (DM)

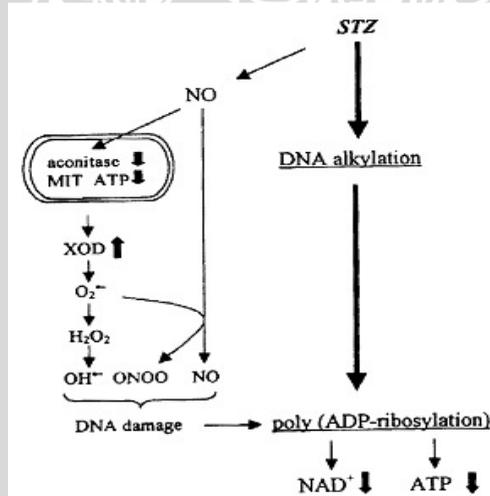
Diabetes melitus adalah suatu penyakit yang timbul akibat gangguan metabolisme karbohidrat, dimana gangguan ini akan menyebabkan keadaan hiperglikemia, yaitu keadaan dimana glukosa darah tinggi [20]. Diabetes melitus juga dapat disebabkan oleh rusaknya sel-sel β dari pulau-pulau Langerhans pada pankreas yang berfungsi sebagai penghasil insulin [2]. DM dapat dibedakan atas DM tipe 1 (insulin-dependent diabetes melitus) dan DM tipe 2 (noninsulin-dependent diabetes melitus). Pada DM tipe 1 terjadi kerusakan sel-sel β -pankreas, produksi insulin minimal, sehingga memerlukan tambahan insulin dari luar tubuh. DM tipe 1 dapat timbul pada umur muda. Pada DM tipe 2 terjadi kekurangan insulin tetapi tidak seberat pada DM tipe 1, disertai resistensi insulin yang tidak bisa mengatur kadar gula darah secara optimal. DM tipe 2 biasanya muncul setelah umur 30-40 tahun [24].

Normalnya kadar glukosa dalam darah berkisar antara 70 – 150 mg/dL atau 4 – 8 mmol/L (dimana 1 mmol/L = 18 mg/dL). Kadar gula akan mengalami peningkatan setelah makan dan mengalami penurunan di waktu pagi hari. Seseorang dikatakan mengalami hiperglikemia apabila kadar glukosa dalam darah jauh di atas normal, sedangkan hipoglikemia adalah suatu kondisi dimana seseorang mengalami penurunan nilai glukosa dalam darah di bawah normal. Diagnosa diabetes dapat ditegakkan jika hasil pemeriksaan gula darah puasa mencapai level 126 mg/dL atau bahkan lebih, dan pemeriksaan gula darah 2 jam setelah puasa (minimal 8 jam) mencapai level 180 mg/dL [25].

DM tipe 1 adalah penyakit autoimun kronis yang berhubungan dengan kehancuran selektif sel beta pankreas yang memproduksi

insulin. Timbulnya penyakit klinis merupakan tahap akhir dari kerusakan sel beta yang mengarah ke tipe 1 DM [26]. Hormon insulin yang dihasilkan oleh sel β pankreas mempunyai empat peranan penting dalam metabolisme glukosa [24]. (1) Insulin mempermudah masuknya glukosa ke dalam sebagian besar sel. (2) Insulin merangsang glikogenesis, pembentukan glikogen dari glukosa, baik di otot maupun di hati. (3) Insulin menghambat glikogenolisis, penguraian glikogen menjadi glukosa, dan (4) Insulin menghambat glukoneogenesis, perubahan asam amino menjadi glukosa di hati. Dengan demikian insulin sangat berperan menurunkan kadar glukosa dalam darah. Oleh sebab itu, berkurangnya sekresi insulin menyebabkan glukosa terakumulasi dalam darah, dan akibatnya kadar glukosa darah meningkat melebihi kadar glukosa darah normal, yang disebut dengan keadaan hiperglikemia [27].

Kerusakan sel β pankreas dapat diinduksi oleh beberapa agen seperti virus, bahan kimia, dan nutrisi. Salah satu bahan kimia yang dapat menyebabkan kerusakan sel β pankreas adalah streptozotocin (STZ) [28].



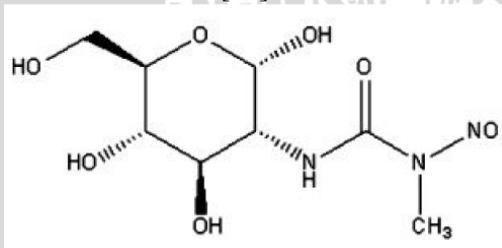
Gambar 2.3 Mekanisme reaksi alkilasi DNA oleh paparan STZ terhadap kerusakan sel β pankreas [29]

2.4 Streptozotocin (STZ)

Streptozotocin (STZ) dengan nama trivial 2-deoksi-2-(3-(metil-3-nitroureido)-D-glukopiranos) merupakan N-nitroso derivate D-

glucosamine digunakan untuk menginduksi model hewan coba diabetes melitus tipe 1 maupun tipe 2, disintesis dari *Streptomyces achromogenes*. Paparan STZ akan menyebabkan perkembangan hiperglikemia. Perubahan sel β pankreas mulai terjadi setelah 6 jam injeksi STZ, dimana pada tahap ini menunjukkan kadar glukosa darah (80-150 mg/dl). Selanjutnya akan terjadi kenaikan glukosa darah setelah 12-24 jam berkisar (> 300 mg/dl). Pada proses metabolisme STZ akan diproduksi berbagai senyawa toksik, termasuk diantaranya super oksida (O^*), spesies oksigen reaktif (ROS), radikal metal (CH_3^*) dan oksida nitrat (NO^*) [30].

Streptozotocin menembus sel beta melalui transportes glukosa (GLUT 2), intra seluler gugus nitrosourea akan menyebabkan alkilasi DNA melalui aktivasi *poly ADP-ribosylation* yang mengakibatkan penekanan NAD^+ dan ATP seluler [23]. Selanjutnya terjadi peningkatan defosforilasi ATP yang menghambat sekresi dan sintesis insulin serta akan memacu peningkatan substrat untuk reaksi katalisis xantin oksidase yang akan menghasilkan radikal superoksida, menyebabkan kerusakan sel β pankreas. Metabolismee STZ intraseluler juga menghasilkan NO (*nitric oxide*) melalui peningkatan aktivitas guamil siklase dan pembentukan cGMP serta membangkitkan oksigen reaktif terhadap kerusakan sel β pankreas. Pembentukan anion superoksida dan peningkatan aktivitas xantin oksidase akan menghambat siklus krebs dan menurunkan konsumsi oksigen mitokondria, mengakibatkan produksi ATP mitokondria terbatas serta menyebabkan pengurangan nukleotida sel β pankreas yang akan merusak sel tersebut [28].



Gambar 2.4 Struktur Streptozotocin [28]

Dosis STZ yang biasa 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 dose Streptozotocin*) [24]. 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 [31]. 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 [32].

2.5 Hewan Coba

Hewan coba adalah hewan yang sengaja dipelihara untuk digunakan sebagai hewan model untuk mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratorium. Penggunaan hewan coba untuk penelitian banyak digunakan dalam bidang fisiologi, farmakologi, biokimia, patologi, dan komparatif zoologi. Berbagai jenis hewan yang umum digunakan sebagai hewan coba antara lain, mencit, tikus, marmot, kelinci, hamster, unggas, kambing, domba, sapi, kerbau, kuda, dan simpanse [33].

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ilmiah adalah tikus (*Rattus norvegicus*) karena mudah dipelihara dan merupakan hewan yang relatif sehat dan cocok untuk berbagai penelitian. Ciri-ciri morfologi *Rattus norvegicus* antara lain memiliki berat 150-600 gram, hidung tumpul dan berbadan besar dengan panjang 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, serta telinga relatif kecil dan tidak lebih dari 20-23 mm [34].

Taksonomi tikus adalah sebagai berikut [35]:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordota
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Mamalia
Subkelas	: Theria
Ordo	: Rodensia
Subordo	: Sciurognathi
Famili	: Muridae
Subfamili	: Murinae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Pertumbuhan dan perkembangan tubuh tikus tergantung pada efisiensi makanan yang diberikan dan juga dipengaruhi oleh metabolisme basal tubuh tikus antara lain, suhu lingkungan, jenis kelamin, umur, keadaan psikologis hewan, dan suhu badan [36].

2.6 Luka

Kulit merupakan organ yang berfungsi sangat penting bagi tubuh untuk mempertahankan tubuh dalam berbagai kondisi lingkungan, mengontrol suhu tubuh, ekskresi, metabolisme, mengatur keseimbangan air dan elektrolit, termoregulasi, dan berfungsi sebagai barier terhadap lingkungan luar termasuk mikroorganisme. Barier pada kulit ini dapat mengalami kerusakan karena berbagai sebab seperti ulkus, luka bakar, trauma atau neoplasma, maka kulit tidak dapat melaksanakan fungsinya secara maksimal [37].

Luka adalah terputusnya kontinuitas atau hubungan anatomis jaringan yang disebabkan banyak hal atau berbagai faktor dan hilangnya integritas epitel dari kulit [38].

Penyembuhan luka yang normal dapat melalui berbagai proses antara lain, fase hemostatis dan inflamasi, proliferasi, serta maturasi dan *remodeling*. Fase-fase ini akan terjadi saling tumpang tindih dan berlangsung saat terjadi luka hingga tercapai pengembalian integritas jaringan yang sempurna dan organ kulit kembali normal dan dapat melakukan fungsinya secara maksimal kembali [38].

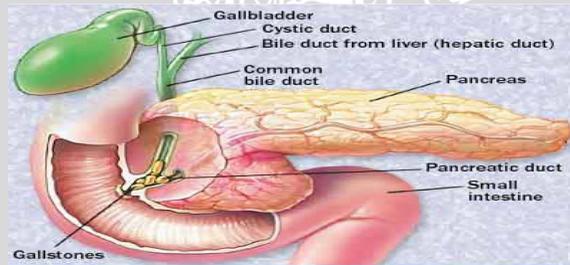
Penderita DM mengalami kesulitan dalam penyembuhan luka dikarenakan sirkulasi darah yang buruk melalui pembuluh darah kecil sehingga akan mempengaruhi saraf penderita. Kerusakan pada saraf menyebabkan kulit sering mengalami cedera karena penderita tidak dapat merasakan perubahan tekanan maupun suhu. Berkurangnya aliran darah yang menuju kulit akan menyebabkan ulkus atau borok sehingga proses penyembuhannya akan berjalan secara lambat hingga menyebabkan amputasi [39].

2.7 Pankreas

Pankreas merupakan bagian organ tubuh yang memiliki fungsi ganda sebagai kelenjar eksokrin dan endokrin. Kelenjar eksokrin berfungsi untuk mensekresikan elektrolit dan enzim-enzim pankreas seperti amilase, lipase dan tripsin. Kelenjar endokrin berfungsi untuk menghasilkan hormon-hormon seperti glukagon, insulin, somatostatin dan polipeptida pankreas (PP). Fungsi endokrin pankreas dilakukan oleh pulau-pulau Langerhans yang tersebar dibagian eksokrin pankreas [40].

Organogenesis kelenjar pankreas diawali sebagai tunas pankreas dorsal dan ventral. Tunas pankreas dorsal berkembang dari

duodenum dekat dengan tunas hati, sedangkan tunas ventral berkembang dari pangkal tunas hati. Dalam perkembangannya tunas pankreas ventral akan bermigrasi menyalang duodenum dan bersatu dengan tunas pankreas dorsal. Tunas ventral akan membentuk bagian kanan, sedangkan tunas dorsal akan membentuk bagian kiri. Saluran pankreas ventral akan menjadi duktus pankreatikus dan saluran pankreas dorsal akan menjadi duktus pankreas aksesoris. Epitel endoderm tunas pankreas berproliferasi dan bercabang-cabang, dimana ujung cabangnya membentuk sel-sel asinar yang berfungsi sebagai kelenjar eksokrin yang akan menghasilkan enzim pencernaan. Diantara sel-sel asinar terdapat kumpulan sel-sel yang tidak memiliki saluran yaitu sel-sel pulau Langerhans. Pulau Langerhans berfungsi sebagai kelenjar endokrin yang akan menghasilkan hormon insulin dan glukagon [41].



Gambar 2.5 Pankreas [40]

2.8 Enzim Protease

Enzim adalah protein yang tersusun dari asam-asam amino sederhana dengan berat molekul berkisar 12.000 sampai satu juta lebih. Enzim berfungsi sebagai biokatalisator dalam sistem biologis pada tubuh [42]. Enzim memiliki daya katalitik yang tinggi sehingga bekerja sangat spesifik terhadap substrat dan reaksi yang dikatalisis. Enzim bereaksi secara katalitik dengan substrat dengan membentuk kompleks terlebih dahulu kemudian terbentuk produk. Setelah produk terbentuk enzim dilepaskan kembali untuk menangkap substrat baru dan kembali terjadi reaksi katalitik [43]. Berikut adalah reaksi katalitik enzimatis [44]:



Aktivitas enzim dipengaruhi oleh konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, suhu, pH serta adanya aktivator dan inhibitor. Untuk enzim pada hewan, suhu optimalnya antara 35-40°C yaitu

pada suhu tubuh. Pada suhu diatas dan dibawah suhu optimalnya maka aktivitas enzim berkurang. Diatas 50°C, enzim bertahap menjadi inaktif karena protein terdenaturasi. Pada suhu 100°C, semua enzim aktivitasnya berkurang [43].

Protease merupakan enzim yang mempunyai sifat fisiko-kimia dan sifat-sifat katalitik bervariasi dan berperan sebagai katalis dalam pemecahan protein [44]. Protease dapat mengkatalisis pemecahan peptida menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino dengan menggunakan reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat. Enzim ini termasuk dalam golongan enzim hidrolase [45]. Protease berperan dalam penyembuhan luka untuk membunuh bakteri pada sel yang mengalami inflamasi. Namun peningkatan jumlah protease pada sel dapat menyebabkan kerusakan jaringan karena memecah protein yang ada secara berlebihan. Jenis protease yang dapat menyebabkan kerusakan sel adalah protease serin (elastase neutrofil). Neutrofil merupakan salah satu sel yang berperan pada proses inflamasi. Protease yang tersimpan dalam neutrofil berfungsi sebagai pertahanan anti-mikroba dengan mekanisme penelanan mikroorganisme dalam fagolisosom tetapi juga dapat merusak sel maupun jaringan inang [6]. Mekanisme pelepasan protease pada sel adalah dari rangsangan berupa bakteri, cedera fisik, toksin maupun obat-obatan yang mampu memicu aktivitas makrofag yang dilakukan sebagian besar oleh ROS. Fagositosis menstimulasi pembakaran oksidatif yang ditandai dengan peningkatan oksidasi glukosa dan produksi metabolit oksigen reaktif. Aktivasi makrofag mampu merangsang terbentuknya sitokin yang dihasilkan selama terjadi respon inflamasi dan imun. Adanya sekresi sitokin mampu mengaktivasi neutrofil elastase sebagai respon inflamasi dan imun, serta melepaskan enzim protease berlebihan sehingga berperan dalam kerusakan jaringan [46].

2.9 Pengukuran Aktivitas Enzim Protease

Prinsip penentuan aktivitas enzim protease berdasarkan pada hidrolisis enzimatik substrat kasein. Asam-asam amino yang terbentuk harus dipisahkan terlebih dahulu dari substrat yang tidak terhidrolisis, tirosin yang terukur per menit menentukan besarnya aktivitas enzim protease [47]. Satu unit aktivitas enzim protease didefinisikan sebagai satu mikromol produk per menit pada kondisi

optimal enzim tersebut [48]. Pemisahan asam-asam amino dengan substrat yang tidak terhidrolisis dilakukan dengan penambahan TCA yang akan menyebabkan produk yang mengandung peptida dan asam amino akan larut dalam TCA, sedangkan protein yang tidak terhidrolisis akan mengendap. Penambahan TCA juga digunakan untuk menginkaktifkan enzim protease [48]. Penentuan aktivitas enzim dilakukan pada pH optimum 25-38⁰C dengan konsentrasi substrat berlebih sehingga reaksi yang terjadi merupakan reaksi orde nol dan faktor pembatas laju reaksi adalah konsentrasi substrat, dimana kasein yang berfungsi sebagai substrat enzim protease [48].

Aktivitas protease dapat ditentukan dari berdasarkan jumlah tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis kasein yang dapat ditentukan secara spektrofotometri, dimana tirosin yang merupakan asam amino aromatik dapat diukur dengan spektrofotometer UV pada absorpsi maksimum pada λ 278 nm. Untuk memperoleh hasil akurat digunakan larutan standar tirosin yang memiliki kandungan asam amino aromatik yang mirip dengan larutan sampel [46].

2. 10 Ekspresi iNOS (*inducible Nitric Oxygen Synthase*)

Nitro oksida (NO) adalah radikal bebas yang dihasilkan melalui reaksi yang dikatalisis oleh enzim NOS (NO synthase). Radikal NO tidak bermuatan, molekulnya berukuran kecil dan bersifat lipofilik sehingga mudah menerobos membran plasma untuk menuju sel target tanpa menggunakan reseptor. NO merupakan suatu molekul biologi yang diproduksi oleh berbagai macam tipe sel akibat implikasi dari suatu penyakit yang dapat bersifat merugikan atau menguntungkan. Enzim NO sintase terdiri dari beberapa famili antara lain *calcium dependent* (cNOS) dan *calcium independent* (iNOS). iNOS pada kondisi normal biasanya tidak aktif, meskipun kadang dapat ditemukan pada beberapa sel. iNOS diekspresikan pada sel imun, eritrosit, otot polos pembuluh darah, ginjal, pankreas, dan paru-paru. iNOS dapat dihasilkan dari pemberian MLD-STZ yang dapat menimbulkan radikal nitrogen oksida, dengan katalis enzim NOS dapat menyebabkan kerusakan jaringan. Ekspresi iNOS menunjukkan banyaknya sel yang mengalami inflamasi. Pada preparat yang positif akan mengekspresikan iNOS apabila terdapat warna coklat pada preparat [49].

2. 11 Imunohistokimia

Imunohistokimia merupakan teknik pewarnaan untuk mendeteksi keberadaan molekul tertentu dalam jaringan dengan menggunakan prinsip reaksi antigen dengan antibodi. Teknik ini menggabungkan tiga jenis disiplin ilmu yaitu imunologi, histologi, dan kimia. Imunologi berhubungan dengan reaksi antigen dan antibodi, histologi berhubungan dengan penggunaan jaringan yang digunakan dalam pewarnaan, sedangkan kimia berhubungan dengan reaksi-reaksi kimia dalam proses pewarnaan [50].

Tujuan dari teknik imunohistokimia adalah identifikasi dan karakterisasi komponen bioaktif sel atau jaringan. Antigen yang dideteksi bias berupa virus atau bakteri ataupun suatu protein tertentu. Terdapat dua macam jenis imunohistokimia antara lain, *direct immunohistochemistry* dan *indirect immunohistochemistry*. *Direct immunohistochemistry* berbeda dengan *indirect immunohistochemistry* karena adanya antibodi sekunder yang berikatan dengan antibodi primer dan dilabel dengan enzim. Kemudian kompleks ini berikatan dengan kromogen dalam proses pewarnaan [50].



BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September sampai dengan Desember 2013 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia dan Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas (cawan petri, gelas objek, labu takar (10 mL, 100 mL, 500 mL, dan 1000 mL), pipet tetes, gelas ukur 10 mL dan 100 mL, gelas kimia (50 mL, 250 mL, 100 mL), pengaduk kaca, corong gelas), mortar, pipet tetes, pipet mikro (10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, dan 1000 μ L), penangas air, *waterbath*, pengaduk magnet, botol semprot, *ependorf*, tabung polipropilen, lemari pendingin, pH meter digital (Inolab-WTW), penjepit, pisau *scalpel*, neraca analitik, seperangkat alat sentrifugasi (tabung sentrifugasi, alat sentrifugasi) Denley tipe BR 401, inkubator, vortex (Guo-Huq), Spektrofotometer UV, autoclaf, seperangkat kandang tikus, gunting, pinset, spuit, glukometer, glukotest strip, plastik, penggaris, spidol, seperangkat alat kromatografi cair-spektrometri massa, mikroskop cahaya (Olympus CX-31), sonikator (Branson 200), tisu, toples, sarung tangan.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spirulina, Streptozotocin (STZ), asam sitrat, natrium sitrat, KCl, NaCl, alkohol 70%, akuades, pereaksi Wagner, NaOH 1N, HCl 1N, CHCl₃, H₂SO₄ pekat (98% dengan BJ= 1,84 g/mL), NH₃ 0,05 M, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaN₃, formaldehid 37%, parafin cair, xilol 1, 2, 3, Fosfat Buffer Saline (PBS) pH 7,4, H₂O₂ 3%, Fetal Bovine Serum (FBS), antibodi primer *anti rat iNOS 2*, antibodi sekunder *anti rabbit biotin*, Strept Avidin-Horseradish Peroxidase (SA-HRP), 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), entellan, tirosin, kasein, Fosfat Buffer Saline Tween-Poli metil

sulfonil florida (PBS Tween-PMSF), pasir kuarsa, etanol absolut 99%, buffer Tris-HCl, Asam trikloro asetat (TCA) 4%, akuades steril.

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai minggu ke-4 September sampai dengan minggu ke-4 Desember 2013. Dalam penelitian ini digunakan tiga kelompok tikus:

1. Kelompok tikus sehat yang diinsisi sebagai kontrol negatif.
2. Kelompok tikus dengan diabetes melitus (DM) tipe 1 yang diinsisi tetapi tidak memperoleh perlakuan terapi herbal *spray* berbasis bioaktif Spirulina.
3. Kelompok tikus dengan diabetes melitus (DM) tipe 1 yang diinsisi dan memperoleh perlakuan terapi herbal *spray* berbasis bioaktif Spirulina setiap hari selama 2 minggu berturut-turut sebagai kontrol positif.

Tahapan kerja yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi:

1. Pembuatan herbal *spray* berbasis bioaktif Spirulina (*Spirulina* sp.)
2. Uji fitokimia ekstrak Spirulina (*Spirulina* sp.)
3. Analisis Ekstrak Spirulina menggunakan Metode Kromatografi Cair-Spektrometri Massa
4. Preparasi hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar
5. Pembuatan larutan STZ dan induksi MLD-STZ pada hewan coba
6. Pengukuran glukosa darah dan pengukuran luka pada hewan coba
7. Terapi hewan coba DM dengan herbal *spray* berbasis bioaktif Spirulina
8. Pengambilan organ pankreas dan organ kulit
9. Isolasi protease dari organ kulit
10. Penentuan aktivitas enzim protease
11. Embedding pankreas
12. Pembuatan preparat pankreas
13. Ekspresi iNOS dengan metode Imunohistokimia
14. Analisa data

3.4 Metode Kerja

3.4.1 Pembuatan Herbal *Spray* Berbasis Bioaktif Spirulina (*Spirulina* sp.)

Spirulina (*Spirulina* sp.) dicuci dengan akuades sampai bersih dan dipotong kecil-kecil dengan ukuran ± 2 cm. Kemudian dikering-anginkan selama 2-3 hari lalu dikeringkan di dalam oven pada suhu $\leq 45^{\circ}\text{C}$ selama 1 hari. Sebanyak 5 gram Spirulina yang telah kering ditambahkan akuades sebanyak 100 mL, kemudian dipanaskan pada suhu $\leq 70^{\circ}\text{C}$ hingga diperoleh volume ekstrak sebanyak 5 mL. Kemudian dilakukan penyaringan untuk memperoleh ekstrak Spirulina. Ekstrak Spirulina yang telah disaring ditampung dalam *ependorf* 1,5 mL, selanjutnya disimpan pada suhu 4°C . Konsentrasi ekstrak yang diperoleh sebesar 853,9 g/L. Pembuatan herbal *spray* dibuat dengan komposisi 60% ekstrak Spirulina dan 40% *ringer solution* jenis NaCl-Fisiologi 0,9%. Sehingga untuk 1 botol *spray* 60 mL dibutuhkan 36 mL ekstrak Spirulina dan 24 mL NaCl-Fisiologi 0,9% dengan konsentrasi *spray* sebesar 34 μL dalam satu kali semprotan. Pemberian herbal *spray* diberikan sebanyak 6 kali semprotan yaitu sebesar 204 μL .

3.4.2 Uji Fitokimia Ekstrak Spirulina (*Spirulina* sp.)

Uji fitokimia meliputi uji flavonoid, alkaloid, dan terpenoid. Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa bahan alam yang terkandung dalam ekstrak Spirulina (*Spirulina* sp.). Uji flavonoid dilakukan dengan cara mereaksikan 2 mL ekstrak Spirulina dengan 1 mL larutan NaOH, selanjutnya ditambahkan 2 mL larutan HCl encer. Ekstrak positif mengandung flavonoid ditandai dengan larutan berwarna kuning.

Uji terpenoid dilakukan dengan cara 0,5 mL ekstrak Spirulina ditambah dengan 2 mL kloroform kemudian ditambahkan 2 mL H_2SO_4 pekat. Ekstrak positif mengandung terpenoid ditandai dengan terbentuknya 2 lapisan berwarna merah kecoklatan.

Uji alkaloid dilakukan dengan cara 0,5 mL ekstrak Spirulina ditambah dengan 10 mL kloroform dan 1 mL NH_3 0,05 M. Kemudian larutan ditambahkan dengan H_2SO_4 2M sebanyak 1 mL, dikocok hingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan H_2SO_4 diambil dan ditambahkan dengan pereaksi Wagner. Ekstrak positif mengandung alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat.

3.4.3 Analisis Ekstrak Spirulina menggunakan Metode Kromatografi Cair-Spektrometri Massa

Pada penelitian ini dilakukan analisa untuk mengetahui senyawa flavonoid yang terkandung di dalam ekstrak Spirulina dengan metode kromatografi cair-spektrometri massa. Ekstrak Spirulina diinjeksikan sebanyak 2 μL pada suhu 10⁰C dan dialirkan dalam kolom yang terbagi dalam dua fase gerak. Fase gerak A yang digunakan terdiri dari 0,1% asam format dalam akuabides dan fase gerak B yang digunakan terdiri dari 0,1% asam format dalam asetonitril. Kedua fase ini dipompa dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), ekstrak disemprotkan menjadi bentuk tetes-tetes yang kemudian masuk ke dalam *counterelectrode* yang pada sisi kiri dan kanannya mengalir gas N₂. Tetesan tersebut melewati kapiler transfer kemudian menuju ke spektroskopi massa. Kemudian dilanjutkan serangkaian analisis menggunakan *Selected Reaction Monitoring* (SRM) dengan cara proton ditembakkan pada fragmen kuersetin. Selanjutnya, spektra kromatografi di cari dengan menggunakan metode *step gradien elusion* dengan laju alir 250 $\mu\text{L}/\text{menit}$. Adapun senyawa yang dianalisa adalah senyawa flavonoid jenis kuersetin yang terkandung dalam ekstrak Spirulina yang bertindak sebagai antioksidan.

3.4.4 Preparasi Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar

Pada penelitian ini digunakan 15 ekor tikus strain wistar jantan usia 3 bulan dengan berat badan rata-rata 130-230 gram yang diadaptasikan di laboratorium rumah hewan. Tikus dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu: (1) Kelompok tikus sehat (kontrol negatif) yang diinsisi, (2) Kelompok tikus sakit Diabetes Melitus yang diinjeksi dengan MLD-STZ kemudian diinsisi pada bagian punggung tikus tanpa diberi terapi herbal *spray*, (3) Kelompok tikus terapi yang diinjeksi dengan MLD-STZ, setelah DM dilakukan insisi pada bagian punggung tikus kemudian dilakukan terapi herbal *spray* dengan cara disemprotkan pada bagian punggung tikus yang telah diinsisi.

3.4.5 Pembuatan Larutan Streptozotocin dan Induksi MLD-STZ pada Hewan Coba

Larutan STZ dibuat dengan cara 100 miligram STZ dilarutkan dengan 3 mL buffer sitrat pH 4,5 kemudian dihomogenkan dengan vortex. Larutan STZ disimpan dalam suhu 4⁰C kemudian digunakan untuk injeksi tikus sesuai dengan dosis berat badan masing-masing tikus, yaitu 20 mg/kg BB sebanyak lima kali berturut-turut selama 5 hari. Injeksi pada tikus dilakukan dengan cara memposisikan tikus pada posisi terlentang hingga terlihat bagian abdomennya. Kemudian bagian abdomen tikus disemprot dengan alkohol 70% untuk menghindari terjadinya infeksi, selanjutnya larutan STZ diinjeksikan pada bagian abdomennya. Setelah diinjeksi dengan larutan STZ, tikus diinkubasi selama 2 minggu hingga tikus dinyatakan dalam keadaan DM ketika glukosa darah tikus mencapai lebih dari 200 mg/dl.

3.4.6 Pengukuran Glukosa Darah dan Pengukuran Luka pada Hewan Coba

Pengukuran glukosa darah menggunakan glukometer dilakukan dengan cara mengambil darah tikus dari bagian ekor yang ditetaskan pada glukotest strip sesuai dengan petunjuk penggunaan hingga diperoleh hasil yang tertera pada layar glukometer digital (*one touch lifescan*). Pengecekan kadar glukosa darah dilakukan sebelum injeksi MLD-STZ dan setelah dilakukan injeksi hingga tikus dinyatakan DM T1, serta setelah dilakukan terapi herbal *spray* Spirulina (*Spirulina* sp.).

Pengukuran luka dilakukan pada saat tikus telah diinsisi dengan pisau *scalpel* pada bagian punggung dengan cara mem-*block* bagian punggung dengan plastik bening kemudian bentuk luka digambar, setelah itu dilakukan pengukuran panjang luka dari tikus. Luka pada tikus diukur setiap 2 hari sekali selama dilakukan terapi 14 hari berturut-turut.

3.4.7 Terapi Hewan Coba DM dengan Herbal *spray* Berbasis Bioaktif Spirulina

Terapi herbal *spray* Spirulina diberikan pada kelompok tikus terapi dengan cara menyemprotkan herbal *spray* pada bagian punggung tikus yang telah diinsisi. Pemberian terapi herbal *spray* dilakukan 3x sehari sebanyak 6-7 kali semprotan dengan konsentrasi

34 μ L dalam satu kali semprotan selama 14 hari berturut-turut dan diukur panjang lukanya setiap 2 hari sekali. Pada hari ke-14 kelompok tikus terapi dibedah untuk diamati perubahan yang terjadi pada tubuh tikus DM T1 setelah pemberian terapi herbal *spray* Spirulina.

3.4.8 Pengambilan Organ Pankreas dan Organ Kulit

Pengambilan organ pada tikus dilakukan dengan cara pembedahan dengan mendislokasi leher tikus, *scalpel* dan alat bedah tikus disiapkan untuk membantu pengambilan organ pankreas dan organ kulit pada tikus. Tikus yang telah mati diletakkan pada nampan bedah dengan posisi ventral di atas. Kemudian organ pankreas dan organ kulit dari luka tikus diambil dan dicuci dengan NaCl-Fisiologi 0,9%. Sebagian pankreas dan kulit yang telah dicuci direndam dalam PBS dan sebagian disimpan dalam PFA 4%.

3.4.9 Isolasi Protease dari Organ Kulit

Organ kulit yang telah diperoleh dipotong kecil-kecil dengan menggunakan gunting bedah dan ditimbang 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 absolut dingin dengan perbandingan 1:1 pada pendingin -20⁰C kemudian didiamkan selama semalam 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.

3.4.10 Penentuan Aktivitas Enzim Protease

3.4.10.1 Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Disiapkan 10 labu ukur masing-masing diisi dengan larutan baku tirosin 20 ppm sebanyak 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, dan 10 mL dengan konsentrasi berurutan sebesar 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, 14 ppm, 16 ppm, 18 ppm, dan 20 ppm. Kemudian ditambahkan dengan akuades hingga tanda batas dan ditutup dengan aluminium foil lalu dikocok hingga homogen. Selanjutnya diukur serapannya dengan spektrofotometer UV pada masing-masing konsentrasi larutan baku dengan panjang gelombang maksimum 275 nm. Blanko yang digunakan dalam pengukuran ini adalah akuades.

3.4.10.2 Pengukuran Aktivitas Protease Hasil Isolasi dari Kulit

Pada tahap ini yang dilakukan adalah mencampurkan kasein 500 ppm sebanyak 200 μ L, 300 μ L larutan buffer fosfat pH, dan 100 μ L enzim protease lalu didiamkan selama 60 menit pada suhu 37°C di atas penangas air. Kemudian ditambahkan 400 μ L larutan TCA 4% secepatnya, lalu didiamkan selama 30 menit pada suhu 27°C. Setelah itu, disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Supernatan yang diperoleh diambil 100 μ L dan diencerkan sebanyak 5 kali volume sampel dengan buffer fosfat lalu diukur nilai absorbansinya pada λ maks tirosin sebesar 275 nm. Pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan dengan rumus:

$$\text{aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times f_p$$

Keterangan:

v = volume total sampel (mL)

q = waktu inkubasi (mL)

f_p = factor pengenceran

p = jumlah enzim (mL)

3.4.11 Embedding Pankreas

Langkah awal proses embedding adalah dengan cara merendam organ pankreas dalam larutan PFA 4% selama 1-7 hari. Kemudian direndam kembali dengan alkohol 70% selama 24 jam, dilanjutkan dengan alkohol 80% selama 2 jam, lalu dengan alkohol 90% selama 20 menit, kemudian dilakukan perendaman kembali

dengan etanol absolut sebanyak tiga kali selama 20 menit. Setelah itu, organ pankreas dipindahkan pada xilol 1 dan 2 masing-masing 20 menit, serta pada xilol 3 dilakukan pada suhu 60-63°C selama 20 menit. Selanjutnya organ pankreas dicelupkan ke dalam parafin cair hingga parafin memadat dan organ pankreas berada dalam blok parafin.

3.4.12 Pembuatan Preparat Pankreas

Pembuatan preparat pankreas dilakukan dengan cara memasukkan organ pankreas dalam parafin blok pada penjepit mitokrom yang diatur sejajar dengan mata pisau mitokrom. Selanjutnya organ pankreas dipotong dengan ukuran 5 µm. Irisan tersebut didinginkan dalam suhu ruang untuk membuka lipatan yang mungkin terjadi pada preparat. Kemudian irisan dimasukkan ke dalam air hangat pada suhu 38-40°C. irisan yang sempurna diambil dengan gelas obyektif dan dikeringkan, selanjutnya diletakkan di atas *hot plate* dengan suhu 38-40°C. Kemudian diinkubasi pada suhu 38-40°C selama 24 jam.

3.4.13 Ekspresi iNOS dengan metode Imunohistokimia

Imunohistokimia diawali dengan tahapan merendam preparat pada xilol 1, xilol 2, etanol bertingkat (99%, 90%, 80%, 70%), dan akuades masing-masing selama 5 menit. Slide preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit. preparat ditetesi dengan 3% H₂O₂ selama 20 menit, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak tiga kali. Kemudian diblok dengan 5% FBS (*Fetal Bovine Serum*) yang mengandung 0.25% teilon x-100 selama 45 menit. Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak tiga kali. Preparat kemudian diinkubasi dengan antibodi primer *anti rat iNOS 2* selama 4 jam pada suhu ruang, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak tiga kali. Diinkubasi menggunakan antibodi sekunder *anti rabbit biotin* (Santa Cruz) selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak tiga kali. Ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin-horse radin peroxidase*) diinkubasi selama 45 menit. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak tiga kali. Ditetesi dengan DAB (*Diamino Benzidine*) dan diinkubasi selama 7 menit kemudian dicuci dengan akuades selama 5 menit sebanyak tiga kali. *Counterstaining* menggunakan *Mayer Hemotoxylen* selama 10 menit. Preparat dicuci

dengan akuades selama 5 menit sebanyak tiga kali dan dikeringanginkan. preparat *dimounting* dengan *entellan* dan ditutup dengan *cover glass*. Preparat positif mengekspresikan iNOS apabila terdapat warna coklat pada preparat.

3.5 Analisa Data

Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah kadar glukosa dalam darah dan pengukuran aktivitas protease. Data yang diperoleh dianalisa dengan uji F, kemudian dilakukan analisa lebih lanjut dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 1%. Ekspresi iNOS dihitung menggunakan program Axio Vision sehingga diperoleh data jumlah sel masing-masing yang mengekspresikan iNOS dalam bentuk persen area.



BAB IV

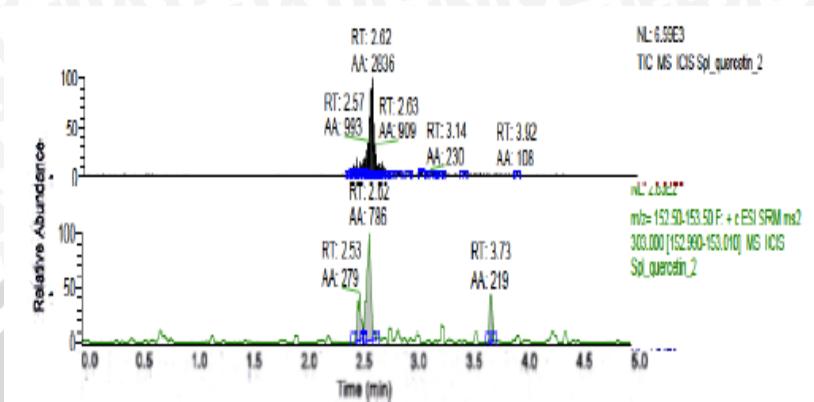
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Spirulina (*Spirulina* sp.)

Pembuatan herbal *spray* Spirulina dilakukan dengan mengekstrak Spirulina melalui proses pemanasan dan penyaringan menggunakan pelarut akuades. Kemudian dilarutkan dengan pelarut NaCl-Fisiologi 0,9% dengan perbandingan komposisi 3:2. Ekstrak Spirulina yang diperoleh dilakukan uji fitokimia meliputi uji flavonoid, terpenoid, dan alkaloid untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder secara kualitatif. Hasil uji fitokimia ekstrak Spirulina menunjukkan hasil positif untuk uji flavonoid, terpenoid, dan alkaloid ditandai dengan terjadinya perubahan warna pada masing-masing perlakuan. Pada uji flavonoid terjadi perubahan warna larutan menjadi kuning, pada uji terpenoid terbentuk 2 lapisan berwarna merah kecoklatan, pada uji alkaloid terdapat endapan berwarna coklat.

4.2 Analisis Ekstrak Spirulina menggunakan Metode Kromatografi Cair-Spektrometri Massa

Pada penelitian ini ekstrak Spirulina yang diperoleh dilakukan analisa untuk mengetahui senyawa flavonoid yang terkandung di dalam ekstrak Spirulina dengan metode kromatografi cair-spektrometri massa. Kondisi operasional pada analisis ini menggunakan *solven gradien* dengan komposisi pelarut (A) 0,1% asam format dalam akuabides dan (B) 0,1% asam format dalam asetonitril selama 5 menit. Hasil analisa menunjukkan bahwa di dalam ekstrak Spirulina terkandung senyawa flavonoid jenis kuersetin, dapat ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil analisa Kromatografi Cair-Spektrometri Massa pada kuersetin

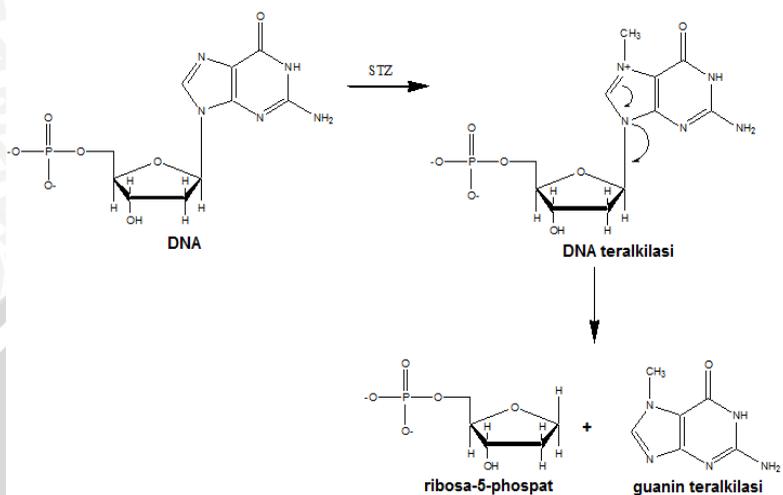
Berdasarkan hasil analisa tersebut di dalam ekstrak *Spirulina* terdapat senyawa flavonoid jenis kuersetin yang memiliki m/z 152 dan berperan sebagai antioksidan yang dapat menangkap radikal bebas. Hasil analisa dengan Kromatografi Cair-Spektrometri Massa menunjukkan bahwa pada ekstrak *Spirulina* terdapat *peak* yang muncul pada waktu retensi menit ke-2,62 saat ditembak tepat pada fragmen spesifik kuersetin dengan m/z 152,50-153,50 dengan luas area 786/2836 dari total area yang terionisasi. Dalam ekstrak *Spirulina* juga terkandung senyawa flavonoid jenis lain yang muncul *peak*-nya pada analisa ini, antara lain ketekin, EGC, GC yang juga dapat berperan sebagai antioksidan.

4.3 Induksi MLD-STZ terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus

Preparasi tikus diabetes dilakukan dengan injeksi streptozotocin dosis rendah berulang (MLD-STZ) secara intraperitoneal (i.p) [51]. 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 tipe 1, ditandai dengan kerusakan sel β pankreas dan peningkatan kadar glukosa darah. Streptozotocin (STZ) merupakan nitrosourea yang bersifat sitotoksik spesifik bagi sel beta pankreas.

Mekanisme menginduksi rusaknya sel beta pankreas dilakukan melalui dua cara. Pertama, STZ menyebabkan terjadinya alkilasi pada basa guanin DNA. 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 NAD (nikotinamida adenin dinukleotida) 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. Kedua, STZ sebagai donor NO eksogen mampu meningkatkan beberapa spesies oksigen reaktif (ROS) yakni radikal superoksida (O_2^*), radikal hidroksil ($^*\text{OH}$), dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Radikal NO dalam bentuk bebas ataupun dalam bentuk senyawa peroksinirit (ONOO^-), hasil reaksi NO dengan O_2^- , 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 ATP (Adenosin tripospat). 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 anion superoksida (O_2^-) aktif [31]. Peningkatan radikal superoksida menyebabkan peningkatan hidrogen peroksida dan radikal hidroksil yang memiliki peran tinggi dalam kerusakan pankreas dan menginduksi hiperglikemia.

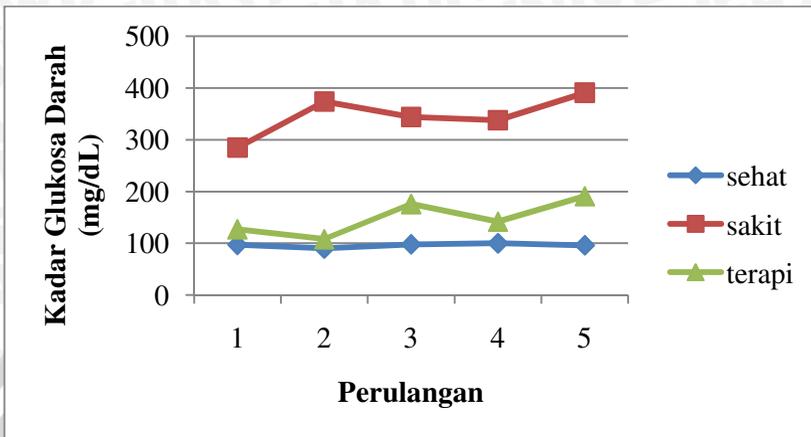


Gambar 4.2 Mekanisme pengalkilasian STZ yang memicu kerusakan DNA

Kadaan hiperglikemia terjadi ketika glukosa tidak dapat diedarkan ke sel-sel karena kurangnya insulin sehingga akan menyebabkan peningkatan jumlah glukosa di dalam darah. Dalam penelitian ini digunakan herbal *spray* Spirulina yang berperan sebagai antioksidan dalam menurunkan kadar glukosa darah. Tabel 4.1 menunjukkan terjadinya peningkatan kadar glukosa darah setelah injeksi MLD-STZ dan penurunan kadar glukosa darah setelah terapi herbal *spray* Spirulina.

Tabel 4.1 Kadar Glukosa Darah Tikus Sehat, Tikus Sakit, dan Tikus Terapi

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Kadar Glukosa Darah (mg/dL)
Tikus Sehat	96,2 ± 3,76
Tikus Sakit DM T1	346,4 ± 40,61
Tikus Terapi	148,8 ± 34,30



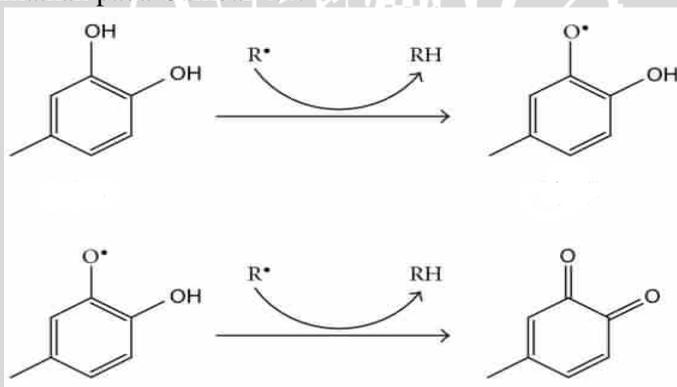
Gambar 4.3 Perbandingan kadar glukosa darah tikus sehat, tikus sakit, dan tikus terapi

Berdasarkan hasil penelitian (Tabel 4.1 dan Gambar 4.3), menunjukkan bahwa kadar glukosa darah kelompok tikus sehat yaitu $(96,2 \pm 3,76)$ mg/dL termasuk dalam rentang kadar glukosa darah tikus normal. Sedangkan kadar glukosa darah tikus sakit yang terinduksi MLD-STZ dosis 20 mg/kg BB mengalami kenaikan kadar glukosa darah yaitu $(346,4 \pm 40,61)$ mg/dL termasuk dalam rentang kadar glukosa darah tikus DM yaitu > 200 mg/dL. Kadar glukosa darah tikus terapi Herbal *Spray* Spirulina yaitu $(148,8 \pm 34,30)$ 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 tipe 1.

Pemberian terapi herbal *spray* Spirulina 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 herbal *spray* Spirulina 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 herbal *spray* Spirulina yaitu flavonoid, alkaloid, terpenoid terbukti memiliki aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan pada herbal *spray* Spirulina ini mampu menangkap radikal bebas yang menyebabkan kerusakan sel beta pankreas penyebab DM tipe 1 dengan cara masuk ke dalam tubuh melalui luka kemudian dibawa oleh aliran darah hingga menuju ke sel β pankreas, kandungan antioksidan dalam herbal *spray* Spirulina akan menambah asupan antioksidan dalam tubuh sehingga terjadi keseimbangan antara jumlah antioksidan dan radikal bebas dalam tubuh, maka akan terjadi penurunan kadar glukosa darah, dengan adanya perbaikan pada sel beta penghasil insulin, maka terjadi peningkatan jumlah insulin di dalam tubuh yang mampu memfasilitasi masuknya glukosa darah ke dalam sel sehingga terjadi penurunan kadar glukosa darah dalam tubuh.

Aktivitas antioksidan pada herbal *spray* Spirulina yang mengandung senyawa flavonoid jenis kuersetin berfungsi sebagai *scavenger* (penangkap) yang dapat membantu menurunkan kadar radikal bebas yang tinggi di dalam pankreas akibat paparan Streptozotocin (STZ). Reaksi *scavenging* (penangkapan) radikal bebas oleh senyawa polifenol (flavonoid, alkaloid, terpenoid) diperlihatkan pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Reaksi *scavenging* radikal bebas (R*) oleh senyawa polifenol [52].

Kemampuan senyawa polifenol dalam menangkap radikal bebas disebabkan oleh strukturnya. Pada senyawa flavonoid jenis kuersetin, adanya gugus hidroksil pada cincin aromatis, akan mendonasikan atom H pada radikal bebas. Radikal fenoksil flavonoid

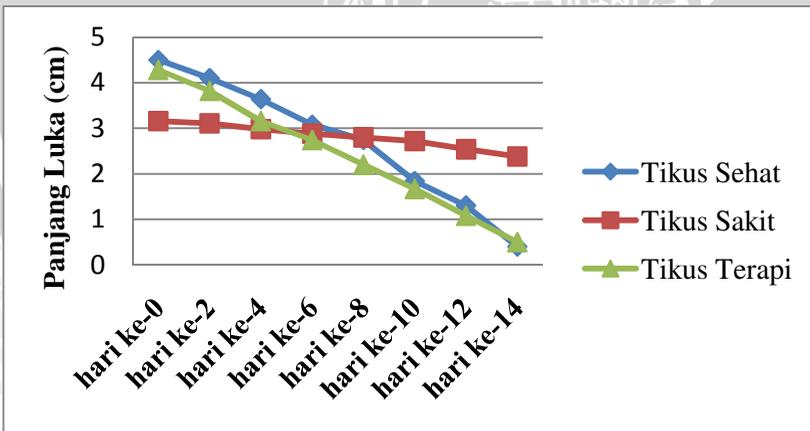
yang terbentuk kemudian mengalami stabilisasi resonansi oleh sistem ikatan rangkap terkonjugasi sehingga radikal tersebut bersifat kurang reaktif.

4.4 Terapi Hewan Coba terhadap Panjang Luka Tikus

Pada penelitian ini kelompok tikus sehat, tikus sakit terinduksi MLD-STZ, dan tikus terapi herbal *spray* Spirulina diinsisi pada bagian punggung tikus dengan panjang luka $\pm 3-4$ cm. Pengukuran panjang luka dilakukan 2 hari sekali selama 14 hari berturut-turut. Tabel 4.2 menunjukkan terdapat pengaruh panjang luka setelah pemberian setelah terapi herbal *spray* Spirulina.

Tabel 4.2 Panjang Luka Rata-rata Tikus Sehat, Tikus Sakit, dan Tikus Terapi

Panjang Luka Rata-rata (cm)	Tikus Sehat	Tikus Sakit	Tikus Terapi
Hari ke-0	4,5	3,16	4,28
Hari ke-2	4,1	3,11	3,82
Hari ke-4	3,64	2,98	3,16
Hari ke-6	3,08	2,88	2,74
Hari ke-8	2,74	2,8	2,2
Hari ke-10	1,84	2,72	1,67
Hari ke-12	1,3	2,54	1,08
Hari ke-14	0,4	2,38	0,5



Gambar 4.5 Perbandingan panjang luka rata-rata tikus sehat, tikus sakit, dan tikus terapi

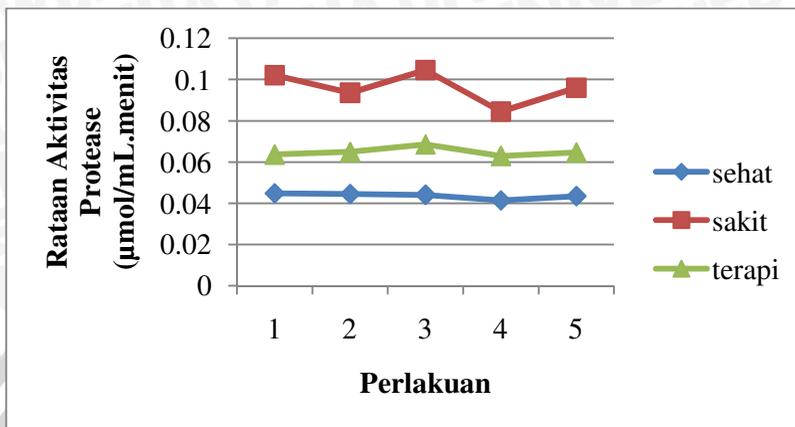
Berdasarkan hasil penelitian (Tabel 4.2 dan Gambar 4.5) menunjukkan bahwa rata-rata panjang luka kelompok tikus sehat hingga hari ke-14 mencapai 0,4 cm, sedangkan rata-rata panjang luka kelompok tikus sakit hasil induksi MLD-STZ hingga hari ke-14 mencapai 2,38 cm dan rata-rata panjang luka kelompok tikus terapi herbal *spray* Spirulina mencapai 0,5 cm. Perbedaan rata-rata panjang luka pada tikus terjadi karena tikus sakit yang diinduksi MLD-STZ mengalami penurunan kemampuan dalam proses penyembuhan luka karena terjadi ketidaksetimbangan fungsi organ tubuhnya akibat penumpukan kadar glukosa darah yang tidak teredarkan ke seluruh tubuh sehingga akan mempengaruhi kemampuan makrofag dalam melakukan fagositosis bakteri dan jaringan yang rusak. Kondisi ini menyebabkan terjadinya perbedaan panjang luka yang sangat signifikan antara tikus sakit dengan tikus terapi herbal *spray* Spirulina sedangkan pada tikus sehat dengan tikus terapi herbal *spray* Spirulina tidak terdapat perbedaan yang signifikan dikarenakan tercukupinya asupan antioksidan pada tikus terapi sehingga terjadi penurunan kadar radikal bebas dan memperlancar aliran darah serta asupan oksigen menuju luka yang mengalami inflamasi maka kecepatan proses penyembuhan lukanya hampir sama.

4.5 Pengaruh Pemberian Herbal *Spray* Spirulina (*Spirulina* sp.) Terhadap Aktivitas Protease pada Luka Tikus DM T1

Aktivitas enzim protease pada luka tikus (*Rattus norvegicus*) akibat paparan MLD-STZ dan terapi herbal *spray* Spirulina diamati melalui uji aktivitas protease hasil isolasi organ kulit luka tikus (*Rattus norvegicus*) diukur pada kondisi optimum yaitu pH 6,5, suhu 37°C dan waktu inkubasi 60 menit [45].

Tabel 4.3 Rataan Aktivitas Protease Hasil Isolasi dari Kulit Luka Tikus (*Rattus norvegicus*)

Perlakuan	Rataan Aktivitas Protease ($\mu\text{mol/mL.menit}$)
Tikus Sehat	0,0437 \pm 0,0013
Tikus Sakit	0,0962 \pm 0,0078
Tikus Terapi	0,0649 \pm 0,0021



Gambar 4.6 Perbandingan aktivitas protease rata-rata tikus sehat, tikus sakit, dan tikus terapi

Berdasarkan hasil penelitian (Tabel 4.3 dan Gambar 4.6), menunjukkan bahwa aktivitas protease kelompok tikus sehat yaitu $(0,0437 \pm 0,0013)$ $\mu\text{mol/mL.minit}$. Sedangkan aktivitas protease kelompok tikus sakit yaitu $(0,0962 \pm 0,0078)$ $\mu\text{mol/mL.minit}$, dan aktivitas protease kelompok tikus terapi yaitu $(0,0649 \pm 0,0021)$ $\mu\text{mol/mL.minit}$. Induksi MLD-STZ dosis 20 mg/kg BB dapat meningkatkan aktivitas protease sebesar 54,61% pada tikus yang diinduksi dengan MLD-STZ dibandingkan dengan tikus sehat. Pemberian terapi herbal *spray* Spirulina mampu menurunkan aktivitas protease sebanyak 48,23%. Dari hasil analisis statistika menunjukkan bahwa aktivitas protease tikus sehat dengan tikus sakit yang diinduksi dengan MLD-STZ terdapat perbedaan yang sangat nyata, sedangkan pemberian terapi herbal *spray* Spirulina mampu menurunkan aktivitas protease juga menunjukkan berbeda nyata.

Aktivitas proteolitik dinyatakan sebagai kemampuan protease dalam menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Metode yang digunakan untuk analisis aktivitas enzim adalah metode spektrofotometri atau CDU (*Casein Digestion Unit*). Metode ini didasarkan atas hidrolisis protease yang diuji dari larutan substrat kasein dan diikuti dengan pengendapan substrat yang tidak terhidrolisis TCA (*trichloroasetat*) 4% untuk menghentikan reaksi. Hasil hidrolisis dari larutan substrat kasein adalah tirosin. Oleh karena itu, pada pengukuran aktivitas enzim protease digunakan kurva baku tirosin dengan λ 275 nm yang diukur menggunakan

spektrofotometri UV yang merupakan absorbansi maksimum dari larutan standar tirosin. Unit aktivitas protease dari organ kulit luka tikus didefinisikan sebagai banyaknya mikro mol tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis ikatan peptida pada protein oleh protease pada kondisi optimum.

Penurunan aktivitas rata-rata protease hasil isolasi dari organ kulit luka tikus DM T1 yang diterapi dengan herbal *spray* Spirulina dikarenakan adanya senyawa antioksidan yang terkandung dalam ekstrak Spirulina yang mampu menurunkan banyaknya protease serin yang dihasilkan oleh sel neutrofil sehingga kinerja neutrofil dan enzim protease kembali normal dalam fagositosis bakteri, memperbaiki, mencegah dan menjaga kondisi sel sehingga kerusakan pada organ kulit luka tikus DM T1 akibat induksi MLD-STZ tidak terjadi terus menerus. Organ kulit pada keadaan normal terlindungi dari aktivitas protease, namun pada kondisi DM memicu banyaknya jumlah protease pada jaringan luka yang mengalami inflamasi sehingga dapat menyebabkan aktivitas tak terkontrol dari protease yang pada akhirnya menyebabkan kerusakan jaringan.

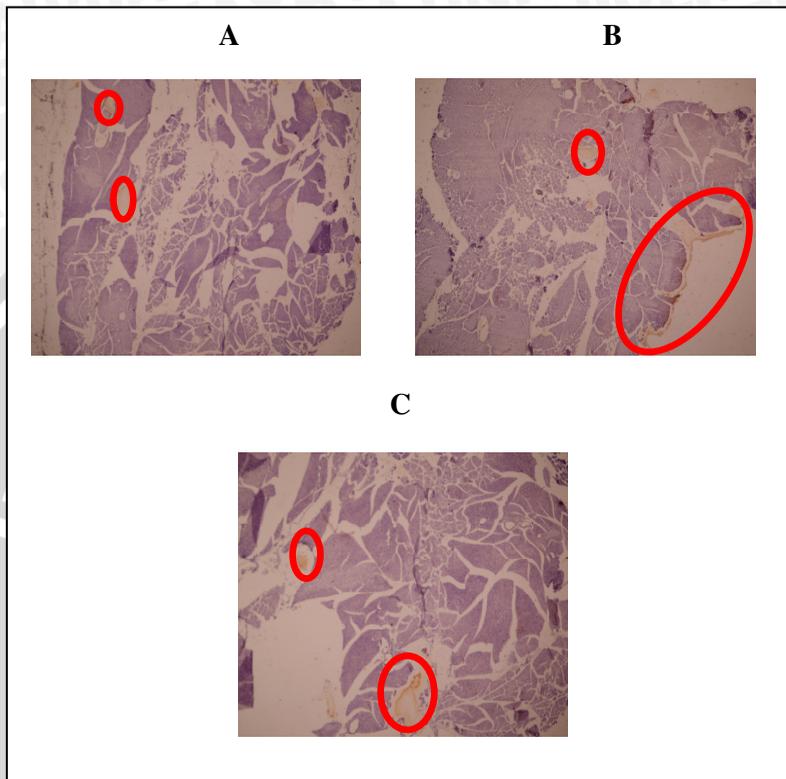
Mekanisme pelepasan protease pada jaringan dimulai dari rangsangan berupa produk bakteri, cedera fisik, toksin maupun obat-obatan yang dapat memicu aktivasi makrofag (proses fagositosis) yang dilakukan sebagian besar oleh ROS. Fagositosis menstimulasi pembakaran oksidatif yang ditandai dengan peningkatan oksidasi glukosa dan produksi metabolit oksigen reaktif. Aktivasi makrofag mampu merangsang terbentuknya sitokin yang dihasilkan selama terjadi respon inflamasi dan imun. Adanya sekresi sitokin mampu mengaktivasi neutrofil serta pelepasan enzim proteolitik sehingga berperan dalam kerusakan jaringan.

Pelepasan protease ke dalam sel dan jaringan yang dipicu oleh ROS mengakibatkan stress oksidatif, tetapi hal tersebut dapat ditekan dengan pemberian antioksidan sehingga aktivitas protease tidak bersifat patologis, yang pada akhirnya mampu memperbaiki kerusakan organ kulit sehingga proses penyembuhan luka lebih cepat.

4.6 Pengaruh Pemberian Herbal *Spray Spirulina (Spirulina sp.)* Terhadap Ekspresi iNOS pada Sel β -pankreas Tikus DM T1

Ekspresi dari *inducible NO Synthase* (iNOS) merupakan respon terhadap tekanan yang menyebabkan radang pada banyak tipe sel. iNOS menunjukkan produksi NO dalam jumlah besar untuk pertahanan imun. Keberadaan iNOS dalam suatu jaringan dapat digambarkan melalui metode imunohistokimia. Imunohistokimia merupakan suatu metode pewarnaan substansi yang melibatkan gabungan metode imunologi dan histologi. Metode pewarnaan substansi/bahan aktif di dalam jaringan dalam imunohistokimia menggunakan prinsip-prinsip dasar imunologi yaitu pengikatan bahan aktif (antigen) pada sisi aktif yang spesifik oleh suatu antibahan aktif yang disebut antibodi. Hasil reaksi antigen dan antibodi ini dapat diidentifikasi pada spesimen karena antibodi diikat oleh suatu penanda yang dapat divisualisasikan, sehingga dapat menandai keberadaan bahan aktif tersebut di dalam jaringan.

Imunohistokimia yang melibatkan metode imunologi menggunakan kespesifikan antara molekul avidin dan biotin. Pada awalnya antigen berikatan dengan antibodi primer, selanjutnya pengikatan antibodi sekunder berlabel biotin. Antibodi sekunder yang berlabel biotin akan langsung berikatan dengan avidin pada SA-HRP (*Streptavidin-Horse Radish Peroxidase*) membentuk kompleks avidin-biotin-HRP. Kromogen yang digunakan adalah DAB (*3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*). Kompleks yang terbentuk dari kromogen DAB akan menghasilkan warna coklat. Distribusi iNOS pada jaringan pankreas diperlihatkan berdasarkan warna coklat yang terbentuk. Hasil imunohistokimia yang menunjukkan ekspresi iNOS ditunjukkan pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Ekspresi iNOS pada pulau langerhans pankreas.
Perbesaran 400x

Keterangan :

A. Tikus Sehat

B. Tikus Sakit

C. Tikus Terapi

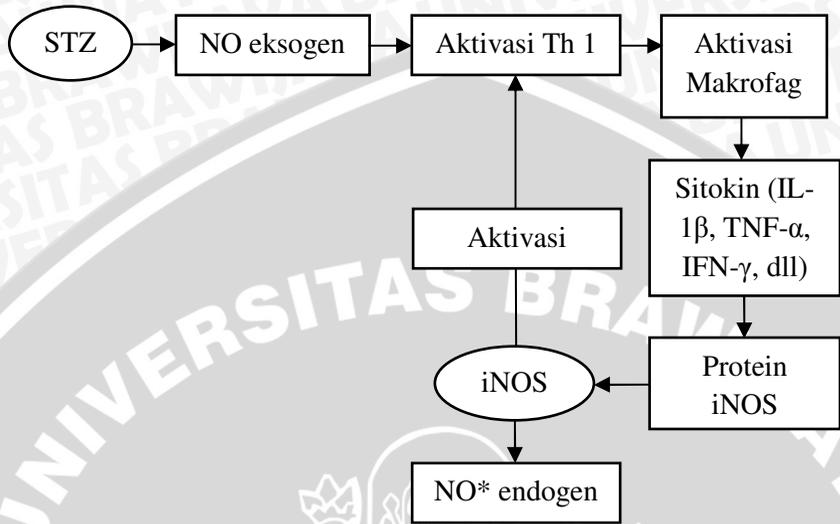
○ = sel β pankreas yang mengekspresikan iNOS

Gambar 4.7 menunjukkan bahwa pada pulau Langerhans pankreas tikus sehat (A), terdapat ekspresi iNOS namun dalam jumlah yang sedikit ditunjukkan dari sedikitnya warna coklat pada jaringan, berdasarkan perhitungan jumlah sel menggunakan axio vision menunjukkan bahwa pada tikus sehat (A) jumlah sel yang mengalami inflamasi memiliki persen area sebesar 0,287%. Hal ini disebabkan di dalam sel terjadi proses regenerasi sel iNOS untuk memproduksi NO endogen dalam mempertahankan homeostasis

(keseimbangan) dalam tubuh. Pada tikus sakit (B) terdapat banyak warna coklat pada jaringan yang menunjukkan tingginya ekspresi iNOS pada sel β dengan persen area jumlah sel yang mengalami inflamasi sebesar 1,952%. Tingginya ekspresi iNOS pada tikus sakit menunjukkan kondisi patologi yang menyebabkan kematian sel karena keberadaan iNOS akan menghasilkan radikal bebas NO^* yang merupakan sinyal kematian sel. Sedangkan pada tikus terapi (C) terdapat sedikit warna coklat pada jaringan dengan persen area sel yang mengalami inflamasi sebesar 0,497%.

Semakin besarnya persen area menunjukkan bahwa di dalam sel mengekspresikan iNOS pada pulau Langerhans sebagai penunjuk keberadaan radikal bebas NO^* endogen dan indikasi kondisi patologi jaringan, karena NO dihasilkan melalui reaksi yang dikatalis oleh NOS (*NO synthase*). NO diproduksi oleh iNOS mempunyai efek menguntungkan sebagai mekanisme pertahanan tubuh dengan kontribusinya membunuh bakteri. Namun NO yang dihasilkan iNOS dengan cepat akan bereaksi dengan superoksida membentuk peroksinitrit (ONOO^-), yaitu antioksidan bersifat poten yang mempunyai efek sitotoksik seperti kerusakan DNA, oksidasi LDL, nitrasi tirosin, inhibisi aconitase dan respirasi mitokondria. Induksi pembentukan NO berperan dalam penghancuran sel β selama pengembangan tipe DM Tipe 1.

Proses peradangan di dalam sel akan menyebabkan migrasi makrofag dimana makrofag ini akan memproduksi sitokin. Pada awalnya, STZ sebagai donor NO eksogen menyebabkan Th1 teraktivasi. Aktivasi Th1 menyebabkan aktivasi makrofag yang akan memproduksi sitokin dan pada akhirnya memicu ekspresi iNOS yang mengkatalisis reaksi pembentukan radikal bebas yaitu NO^* endogen (Gambar 4.8).



Gambar 4.8 Mekanisme terbentuknya NO* endogen yang dikatalisis oleh iNOS akibat adanya peradangan

Pemberian terapi herbal *spray* Spirulina pada tikus DM T1 menyebabkan ekspresi iNOS berkurang. Hal ini dapat diasumsikan bahwa ekstrak Spirulina mampu menghambat iNOS untuk membentuk radikal bebas NO endogen. Hal ini disebabkan ekstrak Spirulina mengandung senyawa-senyawa metabolit sekunder antara lain terpenoid, alkaloid dan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan penangkap radikal bebas. Penangkapan radikal bebas misalnya radikal NO* oleh senyawa yang terkandung pada *Spirulina* menyebabkan kerusakan sel beta berkurang, sehingga kemungkinan infiltrasi sel mononuklear ke dalam jaringan pankreas untuk proses fagositosis sel beta yang rusak juga berkurang. Keadaan tersebut menyebabkan pemicu ekspresi iNOS yang diproduksi makrofag dalam jaringan pankreas berkurang, sehingga ekspresi iNOS dalam jaringan tersebut menurun dan terjadi perbaikan sel beta pankreas penghasil insulin.

BAB V

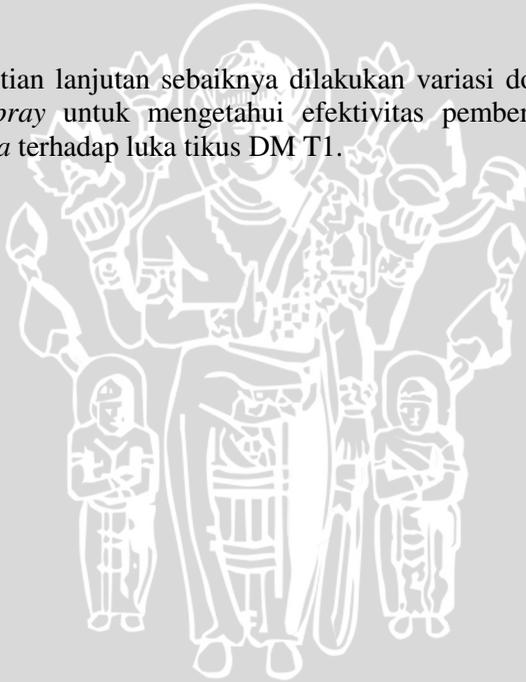
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Pemberian terapi herbal *spray* berbasis bioaktif *Spirulina* mampu mengurangi panjang luka sayatan pada tikus DM T1 dari 4,28 cm menjadi 0,5 cm, mampu menurunkan ekspresi iNOS pada sel β -pankreas tikus DM T1 ditunjukkan menurunnya jumlah sel yang mengalami kerusakan dari tikus sakit dengan persen area sebesar 1,952% menjadi 0,497% pada tikus terapi. Serta mampu menurunkan aktivitas protease pada luka tikus DM T1 sebesar 48,23%.

5.2 Saran

Untuk penelitian lanjutan sebaiknya dilakukan variasi dosis pemberian herbal *spray* untuk mengetahui efektivitas pemberian herbal *spray Spirulina* terhadap luka tikus DM T1.



DAFTAR PUSTAKA

- [1] WHO Departement of Noncommunicable Disease Surveillance Geneva Definition, 1999, **Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications**, Report of a WHO Consultation Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.
- [2] Tjokprawiro, A., B.P Setiawan., D. Santoso., dan G. Soegiarto., 2007, **Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam**, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Rumah Sakit Pendidikan Dr. Soetomo, Airlangga University Press, Surabaya, hal. 33.
- [3] Tandra, H., 2008, **Segala Sesuatu yang Harus Anda Ketahui tentang DIABETES**, PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, hal. 66-67.
- [4] Pho, K., 2005, **Diabetes Mellitus**, <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000305>, diakses tanggal 30 Agustus 2013.
- [5] Setiawan, B. dan E. Suhartono., 2005., **Stres Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Melitus**, Majalah Kedokteran Indonesia Vol. 55 No.2 Pebruari 2005, hal.86-90.
- [6] Bobadilla Norma A, and G. Gamba., 2007, **New Insights into the Pathophysiology of Cyclosporine Nephrotoxicity A Role of Aldosterone**. Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biome'dicas, Universal Nacional Auto nomade and Instituto Nacional de Ciencias Me'dicas y Nutricio'n, Salvador, Mexico.
- [7] Mitsumoto A., Kwi-Ryeon Kim, G. Oshima, M. Kunomoto, K. Okawa, A. Iwamatsu, and Y. Nakagawa, 2000, **Nitric Oxide Inactives Glyxolase I in Cooperation Wiyh Glutathione**, J. Biochem 128 :647-654.
- [8] Belay, 2002, **The Potential Application of *Spirulina* (Arthrospira) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management**, The Journal of The American Nutraceutical Association, California, Vol. 5, No. 2.
- [9] Kozlenko, R. dan H. Henson, 1998, **Latest Scientific Research on *Spirulina*: Effects on the AIDS Virus**,

Cancer and the Immune System,
<http://www.Spirulinasource.com/earthfoodch2b.html>,
diakses tanggal 12 September 2013.

- [10] Santosa, A., 2010, **Produksi *Spirulina sp.* yang Dikultur dengan Perlakuan Manipulasi Fotoperiod**, *Skripsi*, Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- [11] Suko, dan R.D Purnawati, 2011, **Pengaruh Pemberian Ekstrak *Spirulina* Terhadap Indeks Apoptosis Sel T47D**, *Skripsi*, Program Pendidikan Sarjana Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang.
- [12] Tietze, H.W, 2004, ***Spirulina* : micro food Macro Blessing fourth Edition**, Harald W. T Publishing.
- [13] Romay C, J. Armesto, D. Ramirez, R. González, N. Ledón, and I. García, 1998, **Antioxidant and anti-inflammatory properties of c-Fikosianin from blue-green algae**, *Inflammation Research*, 47:36-41.
- [14] Yudiati, Sedkati, dan R. Agustian, 2011, **Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Metanol dan Pigmen Kasar *Spirulina sp.***, *Jurnal Ilmu Kelautan*, Vol.16 (4), 187-192, Jurusan Ilmu Kelautan, FPIK, Universitas Diponegoro, Semarang.
- [15] Poeloengan, M., Chairul, I. Komala, S. Salmah, & M. N. Susan., 2010, **Aktivitas Antibakteri dan Fitokimia dari Beberapa Jenis Tanaman Obat**. *Dalam*: Sani, Y., L. Natalia, B. Brahmantyo, W. Puastuti, T. Sar tika, Nurhayati, A. Anggraini, R.H. Matondang, E. Martindah, S.E. Estuningsih. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Bogor, 13-14 Agustus 2009. Hal 300-305.
- [16] Hall D.O. and K.K Rao, 1999, **Photosynthesis**, Six edition, Cambridge university press, Cambridge.
- [17] Bold HC and MJ Wyne, 1978, **Introduction to algae, structure and reproduction of photobioreactors**, Di dalam: Stadler at al., editor. *Algal Biotechnology*, Elsevier Applied Science, London
- [18] Carra P, Heocha C, 1976, **Algal Biliproteins and Phycobilins**, Goodwin TW, editor. 1976. *Chemistry and*

- Biochemistry of Plant Pigments*. London: Academic press inc. Hal 328-371.
- [19] Swantara, I Made Dira dan Parwata, I Made Oka Adi., 2011, **Kajian Senyawa Antioksidan pada Rumput Laut dari Pantai Sekitar Bali**, *Jurnal Skripsi*, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Udayana, Bali.
- [20] Widowati, Wahyu., 2008, **Potensi Antioksidan sebagai Antidiabetes**, *Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Ilmu Kedokteran Dasar (LP2IKD)*, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha, Bandung.
- [21] Gusdinar, Tutus., Herowati, Rina., Kartasmita, R.E., dan Adnyana, I Ketut., 2009, **Sintesis Kuercetin Terklonasi dan Aktivitas Perlindungan terhadap Tukak Lambung**, *Jurnal Skripsi*, Sekolah Farmasi ITB, Bandung.
- [22] Amic, D., D.Davidovic-Amic, D.Beslo and N.Trinajstic. 2002. **Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids**. *Croatia Chemical Acta*, 76(1) 55-61.
- [23] Zhang, H-Y. 2005. **Structure-Activity Relationships and Rational Design Strategies for Radical-Scavenging Antioxidants**. *Current Computer-Aided Drug Design*, 1, 257-273.
- [24] Guyton, C.A., dan E. J. Hall., 1997, **Buku Ajar Fisiologi Kedokteran**, Alih Bahasa: dr. Irawati setiawan, dkk, Penerbit Buku kedokteran, EGC, Jakarta, hal. 1236.
- [25] Szkudelski, 2001, **The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of Rat Pankreas**, *physiol, Res* 50: 536-546.
- [26] Homenta, H., 2012, **Diabetes Mellitus Tipe 1**, Program Pasca Sarjana Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.
- [27] Palmer, J.P., 1997, **What is The Best Way to Predict IDDM**, *Lancet*, Vol 343:1377-1378.
- [28] Dorlan, 1988, **Medicinal Dictionary : Streptozotocin**, 27th Edition, W.B.Saunders Company, Philadelphia.
- [29] Nurdiana, N.P., Setyawati, dan Mulyohadi, A., 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.
- [30] Qiu, Z., A.H. Kwon, Y. Kamiyama, 2007, **Effects Of Plasma Fibronectin On The Healing Of Full- Thickness Skin Wounds In Streptozotocin-Induced Diabetic Rat**, 138 (1): 64-70, J Surg Res
- [31] Nugroho, E. A., 2006, **Hewan Percobaan Diabetes Mellitus : Patologi dan Mekanisme Aksi Diabetogenik**, Biodiversitas, Vol.7 No.4, hal. 378-382.
- [32] 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.
- [33] Setiorini, Y., 2012, **Deteksi Secara Imunohistokimia Immunoglobulin A (IgA) pada Usus Halus Tikus yang Diberi Bakteri Asam Laktat (BAL) dan Enteropathogenic Escherichia Coli (EPEC)**, Skripsi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- [34] Sirois M., 2005, **Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures**, United States of America: Mosby, Inc.
- [35] Myres P & Armitage D, 2004, **Rattus novergicus Animal Diversiy**, <http://animaldiversity.umuz.umich.edu/site/accounts/information/Rattusnovergicus.html>, diakses tanggal 30 Agustus 2013.
- [36] Robinson R, 1979, **Taxonomy and Genetics**, In Baker HJ, Lindsey JR, dan Weisbroth, **The Laboratory Rat**, Academic Press, London.
- [37] Nurwendah, Fetri., dan S. Hazar, 2011, **Uji Aktivitas Hemostatik Ekstrak Protein Fibroin Kepompong Ulat Sutera (*Bombyx mori*) pada Mencit Jantan Galur Swiss-Webster**, Prosiding SNAPP2011, Sains, Teknologi, dan Kesehatan, ISSN: 2089-3582, Jurusan Farmasi, Universitas Islam Bandung, Bandung.

- [38] Kurniati, A., 2004, **Gula Providine-Iodine 1%, Alternatif Pengobatan Luka Tekan**, Jurnal Keperawatan Indonesia, Fakultas Ilmu Keperawatan UI, Jakarta.
- [39] Situmorang, L.L., 2009, **j**, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara, Medan.
- [40] Gofur, A., 2007, **Pola Distribusi Sel-Sel Penghasil Hormon pada Pankreas Trenggiling (*Manis javanica*)**, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran Hewan, Insitut Pertanian Bogor, Bogor.
- [41] Djuwita I, A Budiono, K Mohammad. 2000, **Embriologi Organogenesis**, Laboratorium Embriologi Bagian Anatomi FKH IPB. hlm. VIII-1, Bogor.
- [42] Winarno, F.G., 1968, **Enzim Pangan**, PT. Gramedia, Jakarta.
- [43] Sawhney, S.K., and Sing, 2008, **Introductory Practical Biochemistry 2nd ed**, Narosa Publishing House, Pvt. Ltd, New Delhi.
- [44] Lehninger, A.L., 1982, **Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1**, Alih Bahasa: Maggy Thenawidjaja, Erlangga, Jakarta.
- [45] Ranuh, R., M.S Subijanto, S Ingrid S, and Aulanni'am, 2008, **The Role of Probiotik Lactobacillus Plantarum IS 20506 on Occludin and ZO-1 of Intestinal Tight Junctions Rehabilitation**, Makalah Seminar Nasional Basic Science, Universitas Brawijaya, Malang.
- [46] Bruch, C.G. and D.P.Janet., 2002, **Oxidative Stress in Critically Ill Patients**, *American Journal of Critical Care*. 11(6):543-551.
- [47] Kalluri, R. and EG. Neilson, 2003, **Epithelial-meseochymal Transition and Its Implication for Fibrosis**, *J Clo Invest*. 122 (12): 1776-84.
- [48] Muller, W.E, Eckret, GP., and Schillig, SS., 2006, **EU Project, Local Food Nutraceutical**, Dept. Pharmacologi, University of Frankfurt.
- [49] Shofia, V., 2013, **Studi Pemberian Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum primasticum*) Terhadap Profil MDA, Ekspresi iNOS dan Gambaran Histologi Ginjal Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Diabetes Mellitus Tipe 1**, *Skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan, Universitas Brawijaya, Malang.

- [50] Handoyo, I., 2003, **Pengantar Imunoasai Dasar**, Airlangga University Press, Surabaya.
- [51] Aulanni'am, 2005, **Protein dan Analisisnya**, Citra Mentari Group Malang.
- [52] Manimaran, A and Chellappan 2009, **Activities of Antioxidant Enzyme and Lipid Peroxidation in Ovarian Cancer Patients**, Academic Journal of Cancer Research 2 (2): 68-72, 2009, ISSN 1995-8943, IDOSI Publications.



LAMPIRAN

Lampiran A. Skema Kerja

A.1 Skema Kerja Penelitian



A.2 Pembuatan Herbal *spray Spirulina* (*Spirulina sp.*)

Spirulina sp.

- Dicuci bersih dan dipotong kecil-kecil ± 2 cm
- Dikering-anginkan dalam nampan
- Dioven pada suhu 45°C
- Ditimbang 5 gram dan diekstraksi dengan 100 mL akuades
- Dipekatkan hingga volume mencapai 5 mL
- Disaring
- Ditampung dalam tabung *ependorf* 1,5 mL
- Disimpan dalam suhu 4°C

Ekstrak *Spirulina*

- Dimasukkan sebanyak 36 mL dalam botol *spray*
- Ditambahkan pelarut *ringer solution* jenis NaCl-fisiologis 0,9% sebanyak 24 mL
- Dikocok hingga homogen

Herbal spray Spirulina 60 mL

A.3 Uji Fitokimia

A.3.1 Flavonoid

2 mL ekstrak

- Ditambah NaOH 10% sebanyak 1 mL
- Ditambah HCl 1N sebanyak 2 mL
- Larutan berwarna kuning menunjukkan hasil positif

Hasil

A.3.2 Terpenoid

0,5 mL ekstrak

- Ditambah 2 mL CHCl_3

- Ditambah 2 mL H_2SO_4 pekat

- Larutan berwarna merah kecoklatan menunjukkan hasil positif

Hasil

A.3.3 Alkaloid

0,5 mL ekstrak

- Ditambah 10 mL CHCl_3

- Ditambah 1 mL NH_3 0,05 M

- Ditambah 1 mL H_2SO_4 2 M

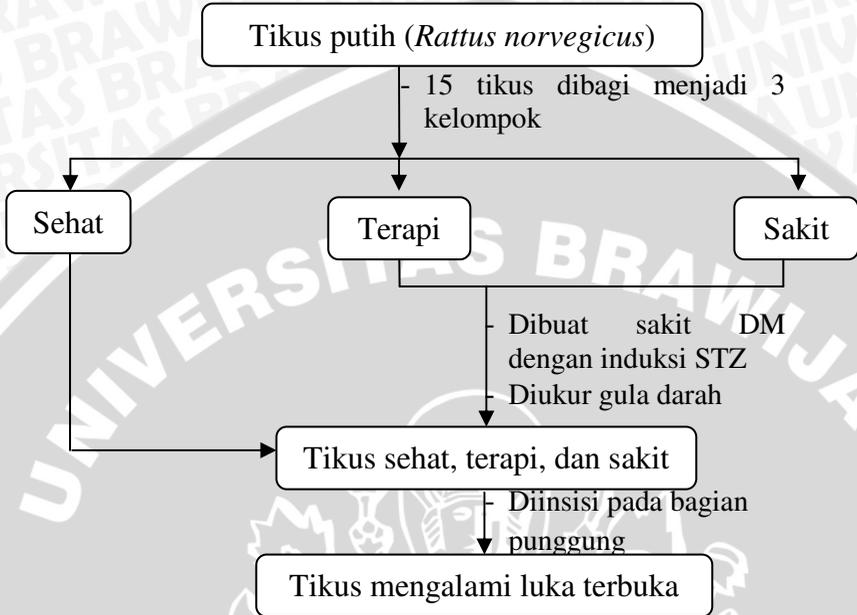
- Dikocok hingga terbentuk 2 lapisan

- Lapisan asam sulfat H_2SO_4 diambil dan ditambah pereaksi Wagner

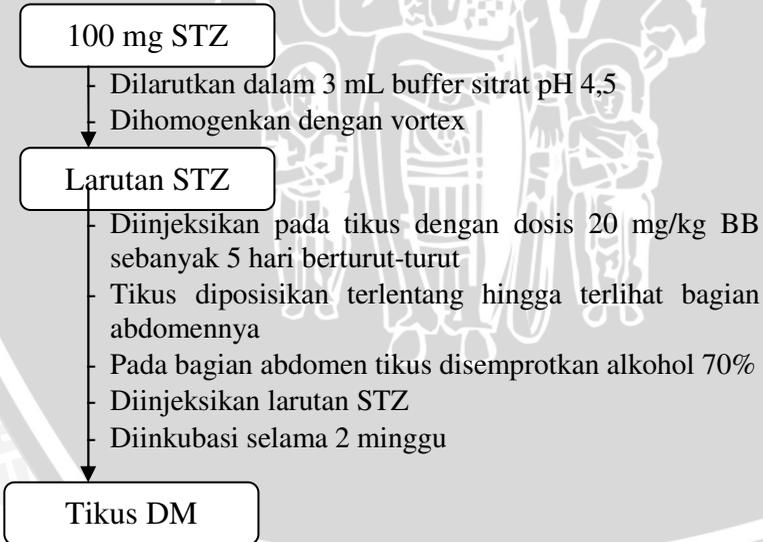
- Larutan terbentuk endapan coklat menunjukkan hasil positif

Hasil

A.4 Preparasi Hewan Coba



A.5 Pembuatan larutan STZ dan injeksi STZ



A.6 Prosedur Kerja Perlakuan Hewan Coba

Kelompok Tikus Terapi DM

- Disemprot bagian luka sayatan dengan menggunakan Herbal *spray Spirulina*
- Dilakukan pengukuran panjang luka dengan memplot luka pada plastik transparan setiap 2 hari sekali selama 14 hari

Hasil

A.7 Pengambilan organ pankreas dan kulit

Tikus sakit, sehat, dan terapi

- Diukur gula darah masing-masing tikus
- Dibunuh dengan cara dislokasi leher
- Disiapkan alat bedah

Tikus mati

- Diletakkan pada nampan bedah dengan posisi abdomen di atas
- Diambil serum darah
- Diambil organ pankreas dan kulit

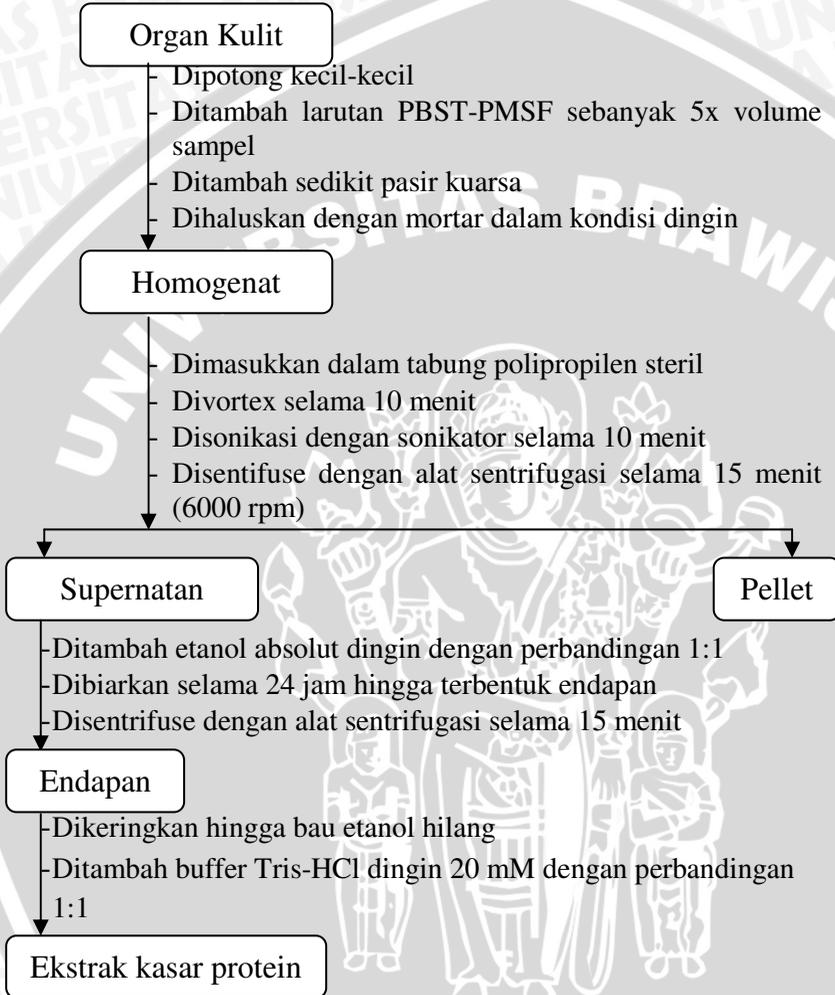
Organ Pankreas dan Kulit

- Dicuci dengan NaCl-Fis
- Dipotong sedikit bagian direndam dalam PFA
- Disimpan pada suhu ruang dan sisanya direndam dalam PBS pada suhu 4°C

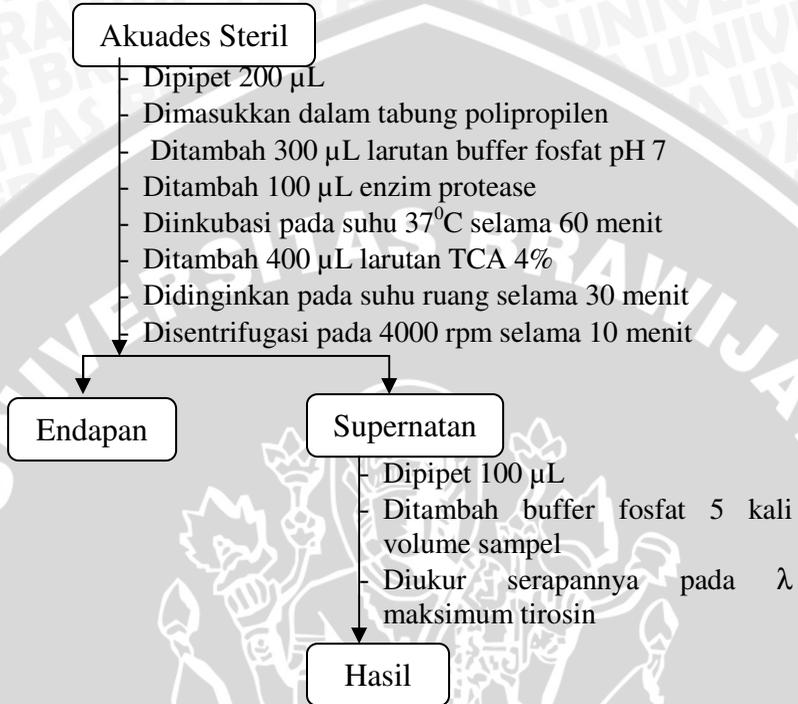
Hasil

A.8 Isolasi Protease dari Organ Kulit

A.8.1 Isolasi Enzim

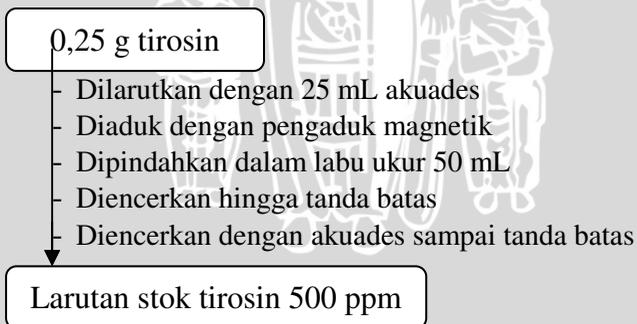


A.8.2 Pembuatan Larutan Blanko



A.9 Penentuan Aktivitas Enzim Protease

A.9.1 Pembuatan Larutan Stok Tirosin



A.9.2 Pembuatan Larutan Tirosin Standar

4 mL Larutan stok tirosin 500 ppm

- Dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL
- ↓ Diencerkan dengan akuades sampai tanda batas

Larutan baku tirosin 20 ppm

- Dipipet berturut-turut 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mL
- Dimasukkan masing-masing larutan ke dalam labu ukur 10 mL
- ↓

Larutan baku tirosin 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ppm

A.9.3 Penentuan λ maksimum Tirosin

Larutan baku tirosin 20 ppm

- ↓ Diukur absorbansinya pada λ maksimum tirosin

Panjang gelombang maksimum

A.9.4 Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Larutan baku tirosin 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ppm

- Dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam ependorf
- ↓ Diukur absorbansinya pada λ maksimum tirosin

Kurva standar

A.9.5 Pembuatan Larutan Kasein

0,25 g kasein

- Dilarutkan dengan 25 mL akuades dan ditambah beberapa tetes larutan NaOH 1N
- Diaduk dengan pengaduk magnetik
- Dipindahkan dalam labu ukur 50 mL
- Diencerkan hingga tanda batas
- Diencerkan dengan akuades sampai tanda batas

Larutan stok kasein 500 ppm

A.9.6 Pengukuran Aktivitas Protease

Larutan kasein 500 ppm

- Dipipet 200 μ L
- Dimasukkan dalam tabung polipropilen
- Ditambah 300 μ L larutan buffer fosfat PH 7
- Ditambah 100 μ L enzim protease
- Diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 60 menit
- Ditambah 400 μ L larutan TCA 4%
- Didinginkan pada suhu ruang selama 30 menit
- Disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit

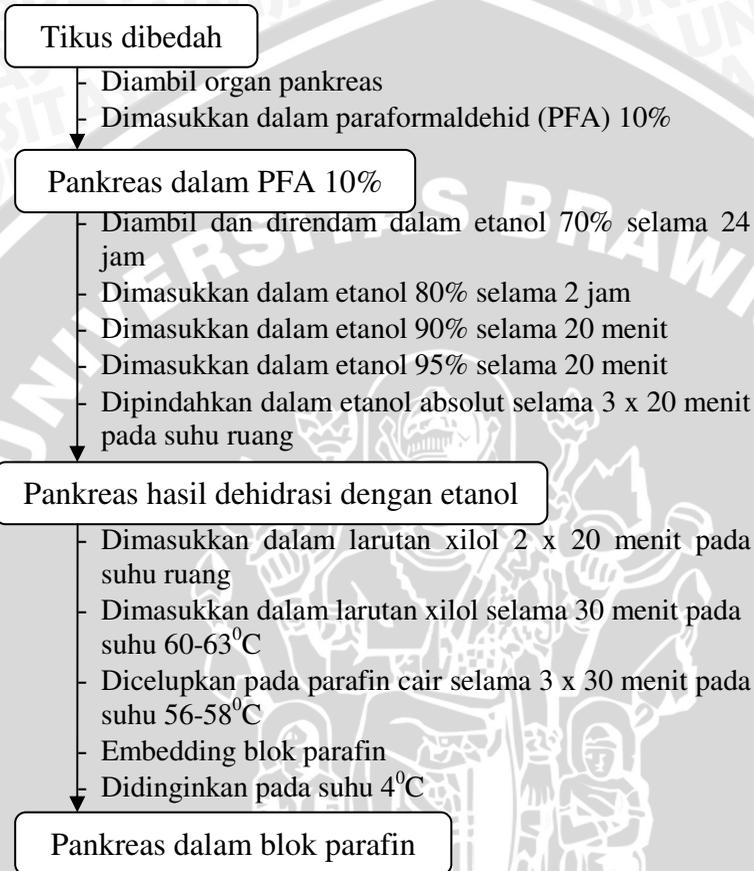
Endapan

Supernatan

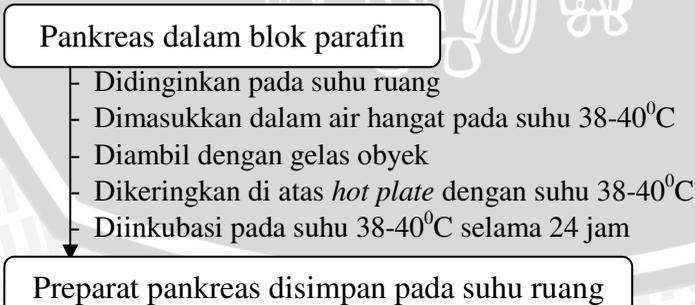
- Dipipet 100 μ L
- Ditambah buffer fosfat 5 kali volume sampel
- Diukur serapannya pada λ maksimum tirosin

Hasil

A.10 Embedding Pankreas



A.11 Pembuatan Preparat Pankreas



A.12 Ekspresi iNOS dengan Metode Imunohistokimia

Preparat pankreas

- Direndam dalam xilol 1, xilol 2, etanol 99%, 90%, 80%, 70%, dan akuades masing-masing selama 5 menit
- Dicuci PBS pH 7,4 selama 1x 5 menit
- Ditetesi dengan 3% H₂O₂ selama 20 menit
- Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali
- Diblok dengan 5% FBS (*Fetal Bovine Serum*) yang mengandung 0,25% teilon x-100 selama 45 menit
- Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali
- Preparat diinkubasi dengan antibodi primer *anti rat iNOS* 2 selama 4 jam pada suhu ruang
- Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali
- Preparat diinkubasi dengan antibodi sekunder *anti rabbit biotin* (Santa Cruz) selama 1 jam pada suhu ruang
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3kali
- Ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin-horse radin peroxidase*) diinkubasi selama 45 menit
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali
- Ditetesi dengan DAB (*Diamino Benzidine*)
- Diinkubasi selama 7 menit
- Dicuci dengan akuades selama 5 menit sebanyak 3 kali
- Counterstaining* menggunakan *Mayer Hemotoxylen* selama 10 menit
- Preparat dicuci dengan akuades selama 5 menit sebanyak 3 kali
- Dikeringkan-anginkan
- Dimaunting* dengan *entellan* dan ditutup dengan *cover glass*

Preparat pankreas

Lampiran B. Preparasi Larutan

B.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 akuades steril, kemudian distirer dan diatur pHnya pada 4,5. Kemudian dipindah pada labu ukur 50 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas dan dihomogenkan. Selanjutnya dipindah pada botol gelap dan disterilisasi dengan autoclaf.

B.2 Pembuatan Larutan Streptozotocin

Streptozotocin 100 mg dilarutkan dalam 3 mL 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 $100 \text{ mg} / 3 \text{ mL} = 100 \text{ mg} / 3000 \text{ }\mu\text{L}$. Larutan STZ yang diinjeksikan adalah $0,033 \text{ mg} \sim 1 \text{ }\mu\text{L}$. STZ yang harus diambil adalah:

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

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

KCl sebanyak 0,2 gram, KH_2PO_4 sebanyak 0,2 gram, NaCl sebanyak 8 gram, dan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebanyak 2,16 gram dicampur dan dilarutkan dalam 250 mL akuades steril dan dihomogenkan menggunakan pengaduk magnet dalam gelas kimia 500 mL. pH larutan diatur 7,4 dengan larutan NaOH 1M menggunakan pH meter. Kemudian dipindahkan larutan ke dalam labu ukur 1000 mL dan ditambahkan akuades steril hingga tanda batas.

B.4 Pembuatan Larutan Azida (NaN_3) 1%

Ditimbang NaN_3 yang diperlukan dengan perhitungan:

$$\begin{aligned} \text{NaN}_3 1\% &= 1 \text{ gram} / 100 \text{ mL} \times 10 \text{ mL} \\ &= 0,1 \text{ gram} \end{aligned}$$

Setelah itu dilarutkan dengan akuades steril dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

B.5 Pembuatan Larutan PBS-Azida

Menggunakan larutan PBS yang telah dibuat sebelumnya, 1000 mL larutan PBS pH 7,4 ditambahkan 32 tetes larutan azida 1% (NaN_3) dengan menggunakan pipet tetes. Lalu larutan dihomogenkan dengan pengaduk magnet.

B.6 Pembuatan Larutan NaCl-Fis 0,9%

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 ditambahkan akuades hingga tanda batas.

B.7 Pembuatan Larutan PFA (Paraformaldehid) 4%

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

Langkah pertama yaitu membuat larutan NaCl-Fisiologis 0,9% sebagai pelarut. Larutan PFA 4% dibuat dengan mengambil 10,8 mL formaldehid 37% dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dan ditambahkan dengan NaCl Fisiologis sampai tanda batas.

B.8 Pembuatan Larutan Etanol Bertingkat

Larutan etanol bertingkat dibuat dari larutan etanol absolut 99% yang kemudian diencerkan menjadi 95%, 90%, 80%, 70% dalam labu takar 100 mL dengan menggunakan akuades steril.

Perhitungan pembuatan larutan etanol 95 %, dibuat dari etanol absolut, etanol absolut yang diperlukan adalah:

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

Perhitungan pembuatan larutan etanol 90 %, dibuat dari etanol absolut,, etanol absolut yang diperlukan adalah:

$$\begin{aligned}V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\V_1 \cdot 99\% &= 100 \text{ mL} \times 90\% \\V_1 &= 90,90 \text{ mL}\end{aligned}$$

Perhitungan pembuatan larutan etanol 80%, dibuat dari etanol absolut, etanol absolut yang diperlukan adalah:

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 99\% = 100 \text{ mL} \times 80\%$$

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

Perhitungan pembuatan larutan etanol 70 %, dibuat dari etanol absolut, etanol absolut yang diperlukan adalah:

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 99\% = 100 \text{ mL} \times 70\%$$

$$V_1 = 70,70 \text{ mL}$$

B.9 Pembuatan TCA 4%

Ditimbang TCA sebanyak 4 gram kemudian dilarutkan dengan buffer fosfat pH 7 dalam gelas kimia 100 mL dan dituangkan dalam labu ukur 100 mL diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

B.10 Pembuatan Larutan Tirosin Standar

Larutan stok tirosin 500 ppm dipipet sebanyak 4 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL diencerkan hingga tanda batas diperoleh larutan baku tirosin 20 ppm. Kemudian larutan baku tirosin 20 ppm dipipet berturut-turut 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 kemudian dimasukkan masing-masing dalam labu ukur 10 mL.

B.11 Pembuatan Larutan NaH_2PO_4 0,2 M ($M_r = 137,99 \text{ g/mol}$) (asam)

Larutan NaH_2PO_4 0,2 M dibuat sebanyak 500 mL, maka massa NaH_2PO_4 yang diperlukan yaitu:

$$\begin{aligned} \text{Massa NaH}_2\text{PO}_4 &= M_r \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \times [\text{NaH}_2\text{PO}_4] \times V \text{ larutan} \\ &= 137,99 \text{ g/mol} \times 0,2 \text{ mol/L} \times 0,5 \text{ L} \\ &= 13,799 \text{ g} \end{aligned}$$

Ditimbang 13,799 gram NaH_2PO_4 kemudian dilarutkan dengan akuades steril dalam gelas kimia 100 mL dan dituangkan dalam labu ukur 500 mL setelah itu diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

B.12 Pembuatan Larutan Na_2HPO_4 0,2 M ($M_r = 141,96 \text{ g/mol}$) (basa)

Larutan Na_2HPO_4 0,2 M dibuat sebanyak 500 mL, maka massa Na_2HPO_4 yang diperlukan yaitu:

$$\begin{aligned} \text{Massa Na}_2\text{HPO}_4 &= M_r \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \times [\text{Na}_2\text{HPO}_4] \times V \text{ larutan} \\ &= 141,96 \text{ g/mol} \times 0,2 \text{ mol/L} \times 0,5 \text{ L} \end{aligned}$$

= 14,196 g

Ditimbang 14,196 gram Na_2HPO_4 kemudian dilarutkan dengan akuades steril dalam gelas kimia 100 mL dan dituangkan dalam labu ukur 500 mL setelah itu diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

B.13 Pembuatan Larutan Buffer Fosfat 0,2 M pH 7

Larutan basa Na_2HPO_4 dengan pH sekitar 9 diturunkan menjadi 7 dengan menambahkan larutan asam NaH_2PO_4 tetes demi tetes hingga pH 7, setelah itu dihentikan sehingga didapat larutan buffer fosfat pH 7.

B.14 Pembuatan Larutan Kasein 500 ppm

Ditimbang 0,25 gram kasein, kemudian dilarutkan dengan akuades dan ditambah beberapa tetes NaOH 1 N. Kemudian diencerkan dengan akuades di dalam labu ukur 50 mL sampai tanda batas.

B.15 Pembuatan Larutan Stok Tirosin 500 ppm

Ditimbang 0,25 gram tirosin, kemudian dilarutkan dengan 25 mL akuades dalam gelas kimia. Kemudian diencerkan dengan akuades di dalam labu ukur 50 mL sampai tanda batas.

Lampiran C. Data dan Uji Statistika Kadar Glukosa Darah

Tabel C.1 Rataan Kadar Glukosa Darah (mg/dL)

Pengulangan	Rataan Kadar Glukosa Darah (mg/dL)		
	Tikus Sehat	Tikus Sakit	Tikus Terapi
1	97	285	127
2	90	374	108
3	98	344	176
4	100	338	142
5	96	391	191
Jumlah	481	1732	744
Rata-rata	96,2	346,4	148,8

C.1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$\begin{aligned} \text{FK} &= \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{np} \\ &= \frac{[744 + 481 + 1732]^2}{5 \times 3} \\ &= \frac{8743849}{15} \\ &= 582923,27 \end{aligned}$$

C.2. Menghitung jumlah kuadrat (JK)

$$\begin{aligned} \text{JK total} &= \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - \text{FK} \\ &= (97^2 + 90^2 + \dots + 191^2) - 582923,27 \\ &= 768305 - 582923,27 \\ &= 185381,73 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK perlakuan (JKp)} &= \frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_1} - \text{FK} \\ &= \frac{[744^2 + 481^2 + 1732^2]}{5} - 582923,27 \\ &= 756944,2 - 582923,27 \\ &= 174020,93 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK galat percobaan (JKG)} &= \text{JKtotal} - \text{JKperlakuan} \\ &= 185381,73 - 174020,93 \\ &= 11360,8 \end{aligned}$$

C.3. Menghitung kuadrat tengah (KT) setiap sumber karagaman

$$\begin{aligned} \text{Kuadrat Tengahperlakuan (KTp)} &= \frac{JKp}{db_{\text{perlakuan}}} \\ &= \frac{174020,93}{2} \end{aligned}$$

$$= 87010,46$$

$$\begin{aligned} \text{Kuadrat Tengah galat percobaan (KTG)} &= \frac{JK_{GP}}{db_{\text{percobaan}}} \\ &= \frac{11360,8}{12} \\ &= 946,73 \end{aligned}$$

C.4. Menghitung nilai F

$$\begin{aligned} F_{\text{hitung}} &= \frac{KT_p}{KT_G} \\ &= \frac{87010,46}{946,73} \\ &= 91,91 \end{aligned}$$

F_{tabel} (0,01; 2; 12) pada taraf nyata 1% = 6,93

C.5. Analisa Ragam Satu Arah Pengaruh Pemberian Herbal *Spirulina* Terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus DM Tipe 1

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel}
Perlakuan	2	174020,93	87010,46		
Galat Percobaan	12	11360,8	946,73	91,91	6,93
Total	14	185381,73	87957,19		

Berdasarkan perhitungan di atas terlihat bahwa nilai F_{hitung} > F_{tabel}. Pemberian herbal *spray* Spirulina mempunyai pengaruh yang sangat nyata terhadap kadar glukosa darah tikus DM T1.

C.6. Menghitung nilai BNT 1%

$$\begin{aligned} \text{BNT } (\alpha) &= t_{d_{bg}}^{\alpha/2} \sqrt{\frac{2KT_{\text{galat}}}{n}} \\ &= t_{\text{tabel}}^{(0,01/2, 12)} \sqrt{\frac{2(946,73)}{5}} \\ &= 3,43 \times 8,7 \\ &= 29,84 \end{aligned}$$

Uji BNT Kadar Glukosa Darah

Kadar Glukosa Darah Rata-rata (mg/dL)		Tikus Sehat	Tikus Sakit	Tikus Terapi
Tikus Sehat	96,2	0	250,2*	52,6*
Tikus Sakit	346,4		0	
Tikus Terapi	148,8		197,6*	0

*) = sangat berbeda nyata

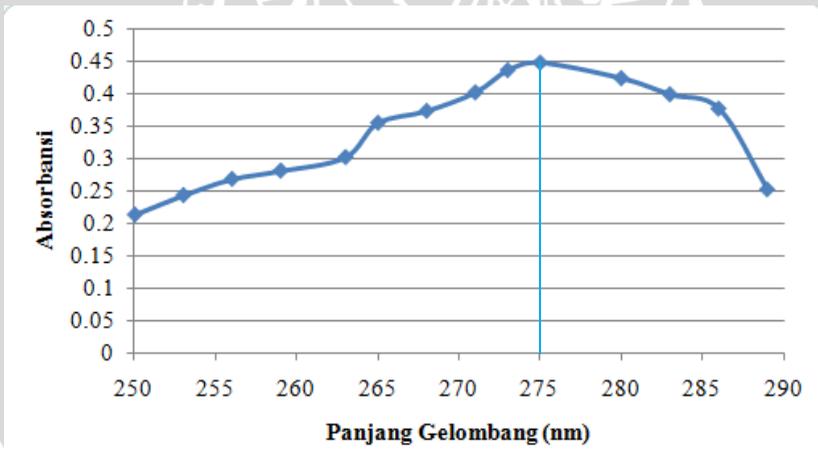
Berdasarkan perhitungan uji BNT 1% perlakuan tersebut memberikan beda yang sangat nyata, ditunjukkan dengan nilai uji memiliki nilai lebih besar dari uji BNT 1% (29,84).



Lampiran D. Data dan Uji Statistika Aktivitas Protease
D.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Tirosin

Tabel D.1 Absorbansi Larutan Baku Tirosin 20 ppm

λ (nm)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{rata-rata}
250	0,2081	0,2120	0,2160	0,2120
253	0,2403	0,2391	0,2470	0,2421
256	0,2702	0,2673	0,2642	0,2672
259	0,2802	0,2780	0,2820	0,2800
263	0,3030	0,3011	0,2991	0,3010
265	0,3530	0,3550	0,3541	0,3540
268	0,3411	0,3891	0,3873	0,3725
271	0,3990	0,4032	0,4011	0,4011
273	0,4422	0,4340	0,430	0,4354
275	0,4470	0,4481	0,4462	0,4471
280	0,4251	0,4212	0,4231	0,4231
283	0,3991	0,3970	0,3983	0,3981
286	0,3750	0,3761	0,3770	0,3760
289	0,2493	0,2503	0,2531	0,2510

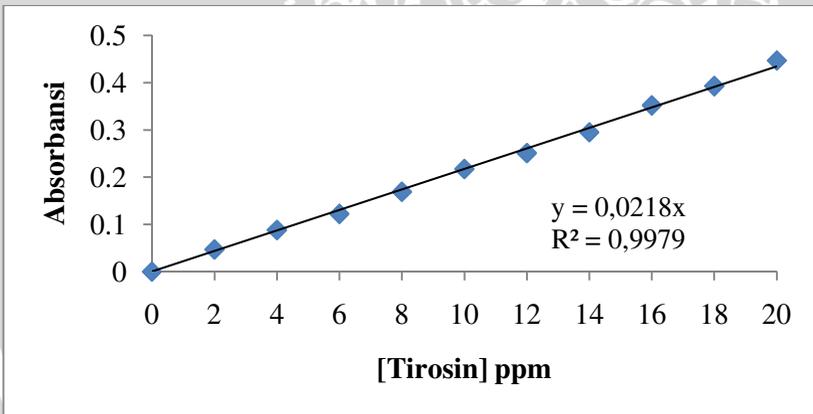


Gambar D.1 Kurva serapan tirosin

D.2 Pembuatan Kurva Baku

Tabel D.2.1 Absorbansi Larutan Baku Tirosin 275 nm

[Tirosin]ppm	A _{rata-rata}
0	0
2	0,047
4	0,0882
6	0,1222
8	0,1691
10	0,2173
12	0,2511
14	0,2951
16	0,3521
18	0,393
20	0,447



Gambar D.2 Kurva baku tirosin

Tabel D.2.2 Data Absorbansi Tirosin

Perlakuan	Tikus	A1	A2	A3	A _{rata-rata}	Aktivitas Protease (μmol/mL.menit)
Sehat	1	0,212	0,217	0,207	0,212	0,0448
	2	0,222	0,202	0,208	0,210	0,0445

	3	0,211	0,208	0,208	0,209	0,0441
	4	0,189	0,198	0,201	0,196	0,0414
	5	0,199	0,21	0,209	0,206	0,0435
Sakit	1	0,486	0,476	0,488	0,483	0,1021
	2	0,475	0,39	0,465	0,443	0,0936
	3	0,497	0,493	0,496	0,495	0,1046
	4	0,398	0,399	0,404	0,400	0,0845
	5	0,446	0,434	0,485	0,455	0,0960
Terapi	1	0,308	0,3	0,297	0,301	0,0637
	2	0,321	0,3	0,302	0,307	0,0649
	3	0,323	0,331	0,32	0,324	0,0686
	4	0,299	0,298	0,298	0,298	0,0630
	5	0,298	0,309	0,312	0,306	0,0647

D.3 Perhitungan Aktivitas Protease

Misal: Pengukuran aktivitas protease komontrol dengan waktu inkubasi 60 menit dan temperatur 37°C

Persamaan kurva baku tirosin: $y = 0,0218x$

Dimana $x = \frac{0,212}{0,0218} = 9,725 \mu\text{g/mL}$

Untuk menentukan aktivitas enzim protease digunakan persamaan:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times \text{fp}$$

Dimana :

v = volume total sampel (mL)

q = waktu inkubasi (mL)

f_p = factor pengenceran

p = jumlah enzim (mL)

Mr Tirosin = 181 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times \text{fp} \\ &= \frac{[9,725 \mu\text{g/mL}]}{181 \mu\text{g}/\mu\text{mol}} \times \frac{1}{0,1 \text{ mL} \times 60 \text{ menit}} \times 5 \\ &= 0,0537 \times 0,167 \times 5 \mu\text{mol/mL.menit} \\ &= 0,0448 \mu\text{mol/mL.menit} \\ &= 0,0448 \text{ Unit} \end{aligned}$$

Satu unit aktivitas protease dinyatakan dengan banyaknya jumlah mikro gram tirosin yang terbentuk oleh 1 mL protease per

menit pada kondisi optimum sehingga diperoleh aktivitas protease sebesar 0,0448 Unit.

Prosentase peningkatan aktivitas enzim protease:

$$\begin{aligned} \% \text{ aktivitas sakit} &= \frac{\text{rataaan sakit} - \text{rataaan sehat}}{\text{rataaan sakit}} \times 100\% \\ &= \frac{0,0962 - 0,0437}{0,0962} \times 100\% \\ &= 54,57\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ aktivitas terapi} &= \frac{\text{rataaan sakit} - \text{rataaan terapi}}{\text{rataaan terapi}} \times 100\% \\ &= \frac{0,0962 - 0,0649}{0,0649} \times 100\% \\ &= 48,23\% \end{aligned}$$

D.4. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$\begin{aligned} \text{FK} &= \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{np} \\ &= \frac{[0,3249 + 0,2183 + 0,4809]^2}{5 \times 3} \\ &= 0,0699 \end{aligned}$$

D.5. Menghitung jumlah kuadrat (JK)

$$\begin{aligned} \text{JK total} &= \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - \text{FK} \\ &= (0,0637^2 + 0,0649^2 + \dots + 0,0960^2) - 0,0699 \\ &= 0,0072 \end{aligned}$$

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

$$= \frac{[0,3249^2 + 0,2183^2 + 0,4809^2]}{5} - 0,0699$$

$$= 0,0069$$

JK galat percobaan (JKG) = JKtotal - JKperlakuan
 = 0,0072 - 0,0069
 = 0,0003

D.6. Menghitung kuadrat tengah (KT) setiap sumber keragaman

Kuadrat Tengahperlakuan (KT_p) = $\frac{JK_p}{db_{perlakuan}}$
 = $\frac{0,0069}{2}$
 = 0,0035

Kuadrat Tengah galat percobaan (KTG) = $\frac{JK_{GP}}{db_{percobaan}}$
 = $\frac{0,0003}{12}$
 = $2,5 \times 10^{-5}$

D.7. Menghitung nilai F

Fhitung = $\frac{KT_p}{KT_G}$
 = $\frac{0,0035}{2,5 \times 10^{-5}}$
 = 140

Ftabel (0,01; 2; 12) pada taraf nyata 1% = 6,93

D.8. Analisa Ragam Satu Arah Aktivitas Enzim Protease

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel}
Perlakuan	2	0,0069	0,0035	140	6,93
Galat Percobaan	12	0,0003	$2,5 \times 10^{-5}$		
Total	14	0,0072	$3,525 \times 10^{-3}$		

Berdasarkan perhitungan di atas terlihat bahwa nilai F_{hitung} > F_{tabel}. Pemberian herbal *spray* Spirulina mempunyai pengaruh yang

sangat nyata terhadap aktivitas enzim protease pada luka tikus DM T1.

D.9. Menghitung nilai BNT 1%

$$\begin{aligned}
 \text{BNT } (\alpha) &= t_{\alpha/2, \text{dbg}} \sqrt{\frac{2KT_{\text{galat}}}{n}} \\
 &= t_{\text{tabel}(0,01/2, 12)} \sqrt{\frac{2(2,5 \times 10^{-5})}{5}} \\
 &= 3,43 \times 0,0014 \\
 &= 4,8 \times 10^{-3} = 0,0048
 \end{aligned}$$

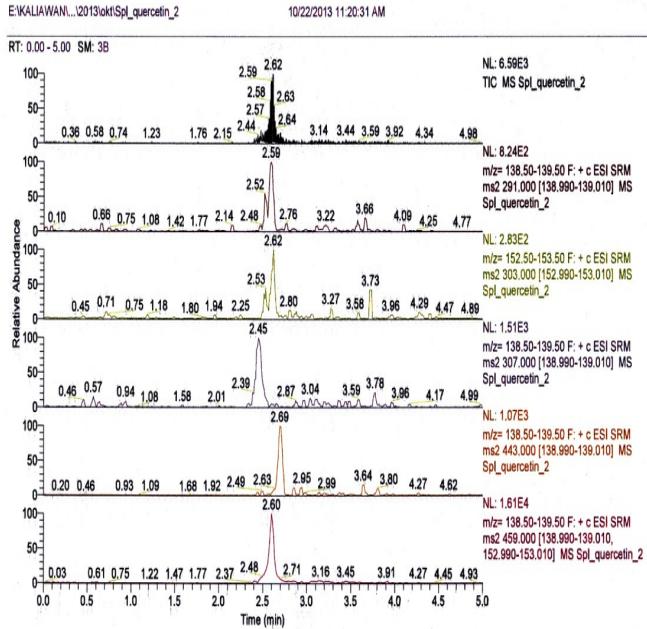
Uji BNT Aktivitas Enzim Protease

Aktivitas Enzim Protease rata-rata (µmol/mL.meenit)		Tikus Sehat	Tikus Sakit	Tikus Terapi
		0,0437	0,0962	0,0649
Tikus Sehat	0,0437	0	0,0525*	0,0212*
Tikus Sakit	0,0962		0	
Tikus Terapi	0,0649		0,0313*	0

*) = sangat berbeda nyata

Berdasarkan perhitungan uji BNT 1% perlakuan tersebut memberikan beda yang sangat nyata, ditunjukkan dengan nilai uji memiliki nilai lebih besar dari uji BNT 1% (0,0048).

Lampiran E. Hasil Analisa dengan Kromatografi Cair-Spektroskopi Massa



Gambar E.1 Jenis-jenis senyawa flavonoid yang teramati pada Kromatografi Cair-Spektrometri Massa

Lampiran F. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

KETERANGAN KELAIKAN ETIK "ETHICAL CLEARENCE"

No:175-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 : PENGARUH HERBAL SPRAY BERBASIS BIOAKTIF SPIRULINA (*Spirulina Sp.*) TERHADAP EKSPRESI INOS PADA SEL β -PANKREAS DAN AKTIVITAS PROTEASE PADA LUKA TIKUS DM T1

PENELITI : RACHMAWATI DWI AGUSTIN

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 22 November 2013

Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof.Dr.drh. Aulanni'am, DES.

NIP. 19600903 198802 2 001