

EFEK PEMBERIAN EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP KADAR SOD SERUM DAN EKSPRESI *TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA* (TNF- α) GINJAL PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL DIABETES MELLITUS

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
AULIA AZKA SURADI KARTANEGARA
155130101111067



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019

LEMBAR PENGESAHANSKRIPSI**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP KADAR SOD SERUM DAN EKSPRESI *TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA* (TNF- α) GINJAL PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL DIABETES MELLITUS****Oleh:****AULIA AZKA SURADI KARTANEGARA
155130101111067**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 13 Februari 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

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

drh. Ahmad Fauzi, M.Sc
NIK. 2011068406071001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

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

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Aulia Azka Suradi Kartanegara

NIM : 155130101111067

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulisan Skripsi berjudul:

Efek Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Kadar SOD Serum dan Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) Ginjal pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Melitus.

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 13Februari 2019

Yang menyatakan,

(Aulia Azka Suradi Kartanegara)

NIM. 155130101111067

Efek Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Kadar SOD Serum dan Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) Ginjal pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Mellitus

ABSTRAK

Diabetes Mellitus (DM) adalah gangguan metabolisme yang disebabkan karena sel beta dalam pulau langerhans pankreas tidak dapat menghasilkan insulin atau mengalami defisiensi insulin sehingga gula darah meningkat (hiperglikemia). Kondisi DM yang berlangsung lama dapat menyebabkan komplikasi ke berbagai organ akibat hiperglikemia yang muncul dan peningkatan radikal bebas. Pemberian ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) diharapkan dapat mengurangi radikal bebas dan meningkatkan sensitivitas insulin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap kadar *Superoxide Dismutase* (SOD) serum dan ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) ginjal. Tikus (*Rattus norvegicus*) model DM dihasilkan dengan 40 gram/ekor/hari pakan tinggi lemak selama 4 minggu dan pemberian *multiple low-dose* Streptozotocin 30 mg/kg BB sebanyak dua kali dengan jarak 2 minggu secara intraperitoneal. Dua puluh ekor tikus dibagi menjadi lima kelompok tikus, yaitu Kontrol Negatif (kelompok sehat), Kontrol Positif (tikus DM), dan kelompok terapi P1, P2, P3 yang mendapat terapi dengan dosis 75, 150, dan 300 mg/kg BB ekstrak daun pegagan selama 1 minggu. Parameter yang digunakan adalah kadar SOD serum dengan uji spektrofotometer dan ekspresi TNF- α ginjal dengan pewarnaan Imunohistokimia (IHK). Analisis data SOD serum dan ekspresi TNF- α ginjal dengan uji *One Way ANOVA* dan uji lanjutan Tukey dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) dapat meningkatkan kadar SOD serum dan menurunkan ekspresi TNF- α ginjal secara signifikan ($p<0,05$) dengan dosis optimum 150 mg/kg BB. Kesimpulan dari penelitian ini yaitu ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) dapat meningkatkan kadar SOD serum dan menurunkan ekspresi TNF- α ginjal pada tikus model DM.

Kata kunci : Diabetes Mellitus, *C. asiatica*, TNF- α , SOD serum

Effect of *Centella asiatica* Leaf Extract on Serum Superoxide dismutase (SOD) and Expression of Kidney Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) on Diabetic Rats (*Rattus norvegicus*)

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disorder caused by beta cells in the island of langerhans failed to produce insulin, which lead to insulin deficiency and increasing of blood sugar level (hyperglycemia). Prolonged condition of DM can lead to various organs complications due to hyperglycemia and increased production of Reactive Oxygen Species (ROS). *Centella asiatica* leaf extract reduce ROS and improve insulin sensitivity. The object of this study were determine the effect of *C. asiatica* leaf extract on serum Superoxide dismutase (SOD) level and expression of kidney Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α). Diabetic rats (*Rattus norvegicus*) prepared by inducing multiple low-dose streptozotocin of 30 mg/kg BW 2 times once a week and supplementation of high fat diet dose 40 g/rat/day. Twenty rats were divided into five groups consist of Negative Control group (healthy rat), Positive Control group (Rat model of DM), P1, P2, and P3 with *C. asiatica* leaf extract dose therapeutic of 75, 150, and 300 mg/kg BW, respectively. Level of serum SOD analyzed by spectrophotometer and the expression of TNF- α of kidney observed by immunohistochemistry. Statistic analysis on serum SOD level and the expression of kidney TNF- α were using One Way ANOVA test continued with Tukey test at confidence level of 95% ($\alpha = 0,05$). The results showed that treatment of *C. asiatica* leaf extract significantly increased serum SOD levels and reduced kidney TNF- α expression ($p < 0,05$) with 150 mg/kg BW as optimum dose. It can be concluded that the treatment with *C. asiatica* leaf extract could increase Serum SOD levels and decrease kidney TNF- α expression on diabetic rats.

Keywords: Diabetes Mellitus, *C. asiatica*, TNF- α , Serum SOD

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya sehingga penulis dapat menyusun laporan tugas akhir yang berjudul **“Efek Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Kadar SOD Serum dan Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) Ginjal pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Melitus”** sebagai syarat kelulusan menjadi Sarjana Kedokteran Hewan.

Laporan skripsi ini disusun berdasarkan diskusi dengan berbagai pihak serta literatur yang penulis baca dari beberapa referensi. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES dan drh. Ahmad Fauzi, M.Sc selaku dosen pembimbing yang telah menyisihkan waktunya untuk membimbing penulis pada saat penulisan proposal ini.
2. drh. Ani Setianingrum, M.Sc dan drh. Aldila Noviatry, M.Biomed selaku dosen penguji atas segala ilmu, dukungan, serta saran dan masukan dalam penyempurnaan penulisan tugas akhir ini.
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.
4. Ayah, Ibu, Kaka, Mas, dan keluarga besar tercinta yang selalu memberi kasih sayang, dorongan, dukungan dan doa untuk menyelesaikan studi penulis serta perhatiannya akan kebutuhan penulis baik secara moril maupun materi.
5. Hasan Ashari selaku teman spesial yang selalu menyemangati dan meluangkan waktunya untuk penulis.

6. Arsilia, Arinda, Olla, Mae, dan Baby yang selalu mendengarkan keluh kesah dan menyemangati penulis.
7. Keluarga Besar Utomo yang telah menjadi keluarga di Malang.
8. Rekan seperjuangan skripsi Ahlia, Fidia, Utie, dan Ika untuk waktu dan inspirasi yang diberikan untuk penulis.
9. Seluruh dosen dan civitas akademika yang telah membimbing, memberikan ilmu, dan mewadahi penulis selama menjalankan studi di Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

Penulis sadar bahwa proposal ini masih jauh dari sempurna. Penulis berharap proposal ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca untuk itu saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Batasan Masalah	4
1.4. Tujuan Penelitian	5
1.5. Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Hewan Coba Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Diabetes Mellitus	6
2.2 Pakan Tinggi Lemak	8
2.3 Streptozotocin (STZ)	9
2.4 Diabetes Mellitus	11
2.5 Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	12
2.5.1 Kandungan Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	13
2.6 Kadar Enzim SOD (<i>Superoxide Dismutase</i>)	15
2.7 TNF- α pada Diabetes Mellitus	16
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	19
3.1. Kerangka Konsep	19
3.2. Hipotesis Penelitian	22
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	23
4.1. Waktu dan Tempat Penelitian	23
4.2. Alat dan Bahan	23
4.3. Rancangan Penelitian	24
4.4. Sampel Penelitian	24
4.5. Variabel Penelitian	25



4.6.	Tahapan Penelitian.....	25
4.6.1	Persiapan Hewan Coba	25
4.6.2	Prosedur Pembuatan Hewan Model DM.....	26
4.6.3	Pembuatan Ekstrak Ethanol Daun Pegagan	27
4.6.4	Terapi Pemberian Ekstrak Daun Pegagan.....	28
4.6.5	Pengukuran Kadar SOD Serum	29
4.6.6	Pembuatan Preparat IHK TNF- α	29
4.6.7	Pengamatan Ekspresi TNF- α	30
4.7.	Analisis Data.....	31
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....		32
5.1	Pengaruh Ekstrak Terhadap Kadar SOD Serum Tikus Model DM	32
5.2	Pengaruh Ekstrak Terhadap Ekspresi TNF- α Ginjal Tikus Model DM.....	37
BAB 6 PENUTUP		43
6.1	Kesimpulan	43
6.2	Saran	43
DAFTAR PUSTAKA.....		44
LAMPIRAN.....		51

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	<i>Rattus norvegicus</i>	7
2.2	Mekanisme resistensi insulin oleh FFA	9
2.3	Mekanisme STZ pada kerusakan sel β pankreas	11
2.4	<i>Centella asiatica</i>	15
3.1	Kerangka konseptual penelitian	21
5.1	Ekspresi TNF- α	40



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Laik etik	51
2	Uji Determinasi Tanaman Pegagan.....	52
3	Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Pegagan.....	53
4	Uji Kuantitatif Flavonoid Ekstrak Pegagan.....	54
5	Rancangan Perlakuan.....	56
6	Kerangka Operasional.....	58
7	Pembuatan Larutan STZ.....	59
8	Perhitungan Dosis STZ.....	60
9	Perhitungan Dosis Ekstrak.....	61
10	Hasil Pengukuran Kadar Glukosa Darah	63
11	Analisis Ekspresi TNF- α	64
12	Uji Statistika SOD.....	65
13	Uji Statistika TNF- α	69
14	Perhitungan Presentase TNF- α dan SOD.....	73

DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Keterangan
AGEs	<i>Advanced Glycation End-products</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
CAT	<i>Catalase</i>
DAG	<i>Diacylglycerol</i>
DM	Diabetes Mellitus
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FFA	<i>Free Fatty Acid</i>
GLUT	<i>Glucose Transporter</i>
GPX	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione
H ₂ O ₂	Hidrogen Peroksida
HFD	<i>High Fat-Diet</i>
IRS	<i>Insulin Receptor Substrate</i>
JNK	<i>c-JUN NH2-Terminal Kinase</i>
ml	milliliter
NF-κβ	<i>Nuclear Factor Kappa Beta</i>
nm	nanometer
NO	<i>Nitrit Oxide</i>
O ₂	Oksigen
PI-3K	<i>Phosphatidylinositol-3 Kinase</i>
PKC	Protein Kinase C
PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
RAGEs	<i>Receptor for Advanced Glycation End-products</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Rotations per minute
SOD	<i>Superoxide Dismutase</i>
STZ	<i>Streptozotocin</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TTGO	Tes Toleransi Glukosa Oral

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang

Diabetes mellitus (DM) merupakan salah satu penyakit degeneratif yang prevalensinya terus meningkat setiap tahunnya. Jumlah penderita diabetes menurut data *World Health Organization* (WHO) diprediksikan meningkat dari 2.8% pada tahun 2000 menjadi 4,4% pada tahun 2030 dan diperkirakan masih akan terus meningkat (Wild *et al.*, 2004). Diabetes disebabkan karena sel beta dalam pulau langerhans tidak dapat menghasilkan insulin atau mengalami defisiensi insulin sehingga gula darah meningkat (hiperglikemia) (El-Soud *et al.*, 2007).

Diabetes mellitus adalah penyakit metabolik yang kini sering terjadi pada hewan seperti anjing dan kucing. Terjadi kenaikan laporan kasus DM pada tahun 2011 di Amerika Serikat, pada anjing sebanyak 32% dan kucing sebanyak 16% jika dibandingkan dengan tahun 2006 (Banfield Pet Hospital, 2016). Studi mengenai diabetes pada hewan yang telah dilaksanakan di Inggris menyebutkan bahwa 1 diantara 308 ekor anjing dan 1 diantara 230 ekor kucing telah mengalami diabetes (Catchpole *et al.*, 2005; McCann *et al.*, 2007).

Hewan model diabetes melitus (DM) dapat dibuat dengan induksi pakan tinggi lemak dan streptozotocin. Pakan tinggi lemak dapat membantu pembuatan hewan model DM dengan membuat hewan model menjadi obesitas. Streptozotocin sebagai diabetagonik sebagai donor NO (*Nitric*

oxide) melalui peningkatan aktivitas guanil siklase dan pembentukan cGMP serta membangkitkan oksigen reaktif (ROS) yang memiliki kontribusi terhadap kerusakan ginjal. Peningkatan ROS pada ginjal akan meningkatkan ekspresi berbagai sitokin meliputi *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α dan TNF- β), interleukins (IL) 1, 6, 8 dan 18 dan interferon- γ yang diakibatkan adanya *hiperglikemia* pada kasus diabetes mellitus (Wright, 2006). Adanya sitokin *proinflammatory* (TNF- α) pada ginjal dapat menyebabkan nekrosis sel epitel tubulus ginjal (Indranila, 2013).

Secara alami di dalam tubuh terdapat sistem pertahanan antioksidan enzim seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase. Superoksida dismutase (SOD) merupakan garis pertahanan terdepan terhadap senyawa radikal bebas (Alvarez, 1987). Antioksidan ini berperan dalam mengubah anion superoksida (O_2^-) yang merupakan inisiator kuat berbagai reaksi berantai menjadi oksigen (O_2) dan hidrogen peroksida (H_2O_2) yang bersifat lebih stabil dibandingkan superoksida. Pengobatan diabetes yang sudah dilakukan yaitu menggunakan glibenklamid, namun penggunaan obat dalam jangka panjang dapat menimbulkan efek yang membahayakan tubuh. Oleh karena itu, diperlukan adanya upaya untuk meningkatkan kadar SOD dengan cara mengkonsumsi bahan makanan yang mengandung antioksidan.

Salah satu tanaman yang mengandung antioksidan yang berpotensi sebagai obat diabetes adalah *Centella asiatica* (Pegagan). Tanaman pegagan di Indonesia sudah lama dikenal, tetapi belum banyak mendapat

perhatian. Berdasarkan hasil penelitian Hakim (2010), didapatkan ekstrak daun pegagan dengan dosis 300 mg/kg BB berpengaruh terhadap perbaikan histologis pankreas yang diinduksi aloksan dan dapat meningkatkan kadar antioksidan SOD, serta menurunkan kadar MDA hasil dari radikal bebas pada tikus yang diinduksi aloksan, karena di dalam tanaman pegagan mengandung bahan aktif flavonoid yang mampu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas.

Berdasarkan latar belakang tersebut, tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui adanya pengaruh ekstrak etanol daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) ginjal dan kadar SOD serum pada tikus model diabetes mellitus.

1.2. Rumusan Masalah

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

- 1) Apakah pemberian ekstrak etanol daun pegagan (*C. asiatica*) berpengaruh terhadap ekspresi *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) ginjal pada tikus (*R. norvegicus*) model DM?
- 2) Apakah pemberian ekstrak etanol daun pegagan (*C. asiatica*) berpengaruh terhadap kadar SOD serum pada tikus (*R. norvegicus*) model DM?

1.3. Batasan Masalah

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

- 1) Hewan model yang digunakan adalah tikus (*R. norvegicus*) jantan strain Wistar dengan umur 2-3 bulan dan berat badan 150-200 gram. Penggunaan hewan coba telah lolos sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (KEP-UB) dengan no. 927-KEP-UB **(Lampiran 1)**.
- 2) Pembuatan keadaan DM pada hewan model tikus dilakukan dengan cara pemberian pakan tinggi lemak sebanyak 40 gram setiap hari selama 4 minggu (Holmes *et al.*, 2015) dan Streptozotocin *multiple low-dose* yang diberikan sebanyak dua kali dalam 2 minggu setelah pemberian pakan tinggi lemak selama 2 minggu pertama secara intraperitoneal dengan dosis 30 mg/kg BB dengan selang waktu pemberian adalah satu minggu (Skovso, 2014).
- 3) Pemberian terapi ekstrak ethanol daun pegagan selama 1 minggu dengan dosis yang bervariasi yaitu dimulai dari 75, 150, dan 300 mg/kg BB. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar SOD serum dan ekspresi *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) ginjal menggunakan pewarnaan imunohistokimia (IHK).
- 4) Kandungan pakan tinggi lemak terdiri atas pakan standar 50%, tepung terigu 25%, kuning telur bebek 5%, lemak kambing 18,01%, minyak kelapa 1,89%, dan asam colat 0,1%.

1.4. Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang penelitian, maka tujuan penelitian ini adalah:

- 1) Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap ekspresi *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) ginjal pada tikus (*R. norvegicus*) model DM.
- 2) Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap kadar SOD serum pada tikus (*R. norvegicus*) model DM.

1.5. Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk menambah ilmu pengetahuan dan membuktikan pengaruh ekstrak etanol daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap ekspresi *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) ginjal dan kadar SOD serum pada tikus (*R. norvegicus*) model DM.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Mellitus

Percobaan yang dilakukan saat ini banyak menggunakan hewan coba, dimana hewan coba merupakan hewan yang dikembangbiakan dengan tujuan untuk dapat digunakan sebagai hewan uji coba. Hewan laboratorium atau hewan percobaan dapat digunakan sebagai media dalam penelitian atau pengamatan laboratorik untuk mempelajari dan mengembangkan ilmu pengetahuan. Hewan coba yang banyak digunakan dalam penelitian adalah tikus. Tikus putih sering digunakan pada berbagai macam penelitian medis selama bertahun-tahun. Tikus putih digunakan sebagai hewan coba karena memiliki karakteristik genetik yang unik, mudah berkembang biak, murah serta mudah untuk mendapatkannya. Selain itu alasan mengapa tikus putih dijadikan hewan coba yakni karena mempunyai respon yang cepat serta dapat memberikan gambaran secara ilmiah yang mungkin terjadi pada manusia maupun hewan lain. Tikus putih *Rattus norvegicus* (**Gambar 2.1**) disebut juga hewan nocturnal atau hewan yang melakukan aktivitasnya pada malam hari (Adiyati,2011).

Adapun klasifikasi ilmiah tikus putih menurut Akbar (2010) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mamalia

Ordo : Rodentia
Subordo : Odontoceti
Familia : Muridae
Genus : Rattus
Species : *Rattus norvegicus*



Gambar 2.1 *Rattus norvegicus* (Adiyati, 2011)

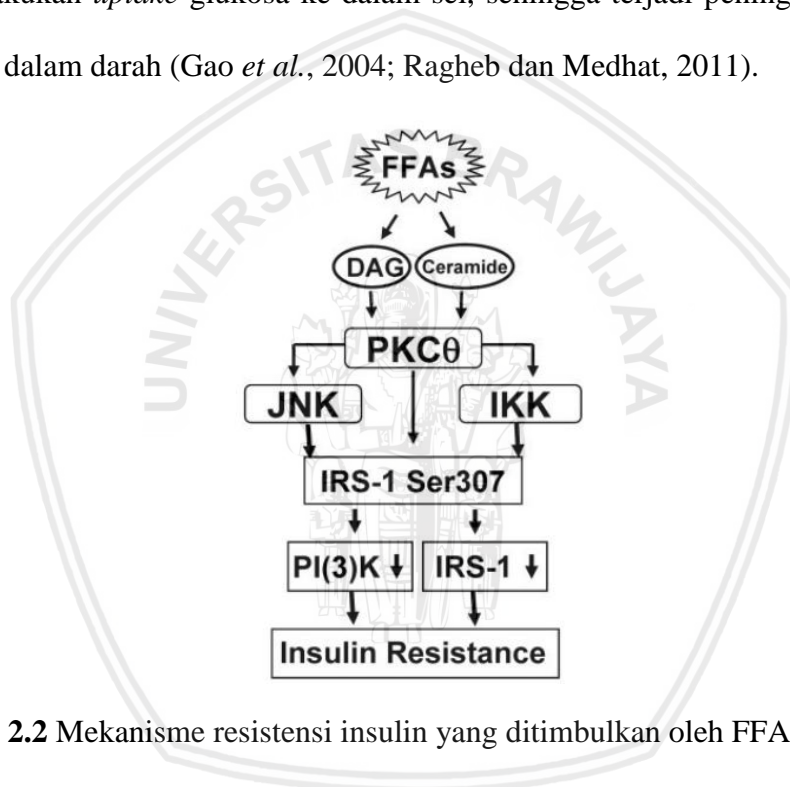
Tikus putih (*Rattus norvegicus*) model Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2) dihasilkan dengan kombinasi gabungan antara pakan tinggi lemak (*High Fat-Diet* = HFD) dan Streptozotocin (STZ) (Holmes, 2015). Pemberian pakan tinggi lemak akan menimbulkan keadaan resistensi insulin dan intoleransi glukosa sehingga tubuh akan mengalami kondisi hiperinsulinemia. Keadaan tersebut kemudian diperparah dengan induksi STZ yang merupakan senyawa toksin bagi sel β pankreas dan menyebabkan penurunan fungsional signifikan pada sel β . Kombinasi pakan tinggi lemak dan STZ akan memunculkan kejadian patologis yang mirip dengan kondisi DMT2 pada manusia dalam jangka waktu yang lebih pendek (King, 2012; Skovso, 2014).

2.2 Pakan Tinggi Lemak

Komposisi nutrisi pada pakan yang diberikan pada hewan coba sering digunakan sebagai pemicu penyakit metabolik dalam penelitian-penelitian yang berhubungan dengan penyakit gangguan metabolik seperti obesitas dan diabetes (Ble-Castillo *et al.*, 2012). Berbagai macam gangguan metabolik lainnya yang dapat ditimbulkan oleh pakan tinggi lemak antara lain *polyphagia*, berkurangnya aktivitas lipolisis pada jaringan adiposa, penurunan sekresi dan/atau sensitivitas leptin, gangguan metabolisme pada mitokondria, dan resistensi insulin (Coelho *et al.*, 2011). Komposisi umum dari pakan tinggi lemak adalah 25% protein, 17% karbohidrat dan 58% lemak (Srinivasan *et al.*, 2005). Menurut Skovso (2014), pemberian pakan tinggi lemak selama 2 minggu dapat memunculkan resistensi insulin pada tikus yang merupakan gejala patofisiologis awal pada DMT2.

Menurut Regensteiner *et al.* (2009), pakan tinggi lemak dapat menimbulkan keadaan resistensi insulin melalui peningkatan kadar asam lemak bebas atau *Free Fatty Acid* (FFA) yang berakibat pada terjadinya fosforilasi terhadap Serine 307 pada *Insulin Receptor Substrate* (IRS). IRS merupakan molekul protein yang berperan dalam proses sinyal intraselular terhadap respon insulin. FFA mengaktifkan isoenzim dari Protein Kinase C (PKC) seperti PKC θ melalui peningkatan pembentukan *Diacylglycerol* (DAG) dan Ceramide, dan kemudian aktivasi dari PKC θ memicu aktivasi dari *Inhibitor κ B Kinase* (IKK) dan *c-JUN NH₂-Terminal Kinase* (JNK). Selanjutnya, aktivasi dari IKK dan JNK akan menimbulkan fosforilasi Serine

307 (Ser307) pada protein IRS yang menyebabkan terjadinya degradasi protein IRS dan penurunan sensitivitas pada reseptor insulin (**Gambar 2.2**). Penurunan aktivitas IRS berhubungan dengan penurunan aktivitas *Phosphatidylinositol-3 Kinase* (PI-3K) dalam menstimulasi proses translokasi (*Glucose Transporter*) GLUT dari dalam sel menuju permukaan untuk melakukan *uptake* glukosa ke dalam sel, sehingga terjadi peningkatan kadar gula dalam darah (Gao *et al.*, 2004; Ragheb dan Medhat, 2011).



Gambar 2.2 Mekanisme resistensi insulin yang ditimbulkan oleh FFA (Gao *et al.*, 2004).

2.3 Streptozotocin (STZ)

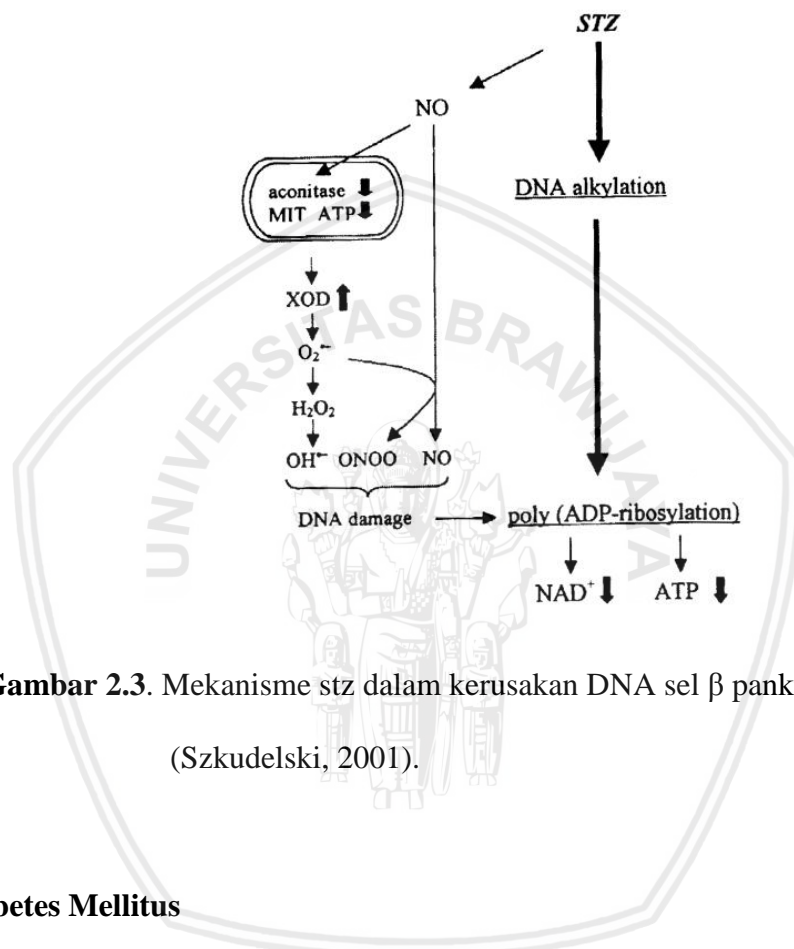
Streptozotocin (STZ) atau *2-Deoxy-2-[(methylnitrosoamino)-carbonyl] amino]-D-glucopyranose* adalah salah satu agen diabetogenik dengan kemampuan toksiknya yang dapat menghancurkan sel β pankreas. Secara struktur, STZ adalah derivat *N-nitrosurea* dari *D-glukosamin* yang diisolasi

dari *Streptomyces achromogenes* (Raza, 2013). STZ ini dapat disebut juga sebagai salah satu agen anti-neoplastik sintetik yang digunakan untuk obat kemoterapi pada kanker, khususnya kanker pulau Langerhans pankreas (Akbarzadeh, 2007).

STZ sering digunakan untuk menginduksi DMT1 maupun DMT2. STZ dapat digunakan dengan maupun tanpa kombinasi senyawa lain dalam menginduksi DMT1 atau DMT2. DMT1 dapat diinduksi sebanyak 1 kali injeksi pada rodentia dengan dosis tinggi (50-100 mg/kg pada tikus dan 130-150 mg/kg pada mencit) atau dengan dosis yang lebih rendah secara berulang (Islas-Andrade *et al.*, 2000; Ventura *et al.*, 2011). Sedangkan DMT2 dapat diinduksi dengan banyak macam cara antara lain injeksi STZ setelah pemberian nicotinamide, pemberian pakan tinggi lemak yang diikuti pemberian injeksi STZ dosis rendah (25-45 mg/kg pada tikus), dan injeksi STZ saat periode neonatus (Wu dan Yan, 2015; Zhang *et al.*, 2008).

Mekanisme STZ dalam kerusakan DNA β pankreas (**Gambar 2.3**), sel STZ masuk ke dalam sel β pankreas melalui GLUT 2 dan STZ masuk ke sitosol menuju mitokondria. Di dalam mitokondria, STZ menghambat siklus krebs. Gangguan pada siklus krebs menyebabkan penurunan produksi ATP (Mythilli, 2004). Penurunan ATP pada sel β pankreas mempengaruhi sintesis insulin. Selain itu, STZ menginduksi pelepasan nitrit oksida (NO) dan *reactive oxygen species* (ROS). NO dan ROS dapat menyebabkan kematian sel dengan merusak struktur DNA sel β Pankreas (Gardner, 2007). STZ juga berperan dalam alkilasi sel β . Alkilasi meningkatkan stres oksidatif di sel β

dan mengganggu sinyal untuk metabolisme mitokondria sel β (Szkudelski, 2001). Apabila proses ini berlangsung terus-menerus, maka dapat menyebabkan nekrosis pada sel β pankreas.



Gambar 2.3. Mekanisme stz dalam kerusakan DNA sel β pankreas (Szkudelski, 2001).

2.4 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) adalah gangguan metabolisme yang dapat muncul secara genetik dan klinis dengan ciri khas berupa intoleransi glukosa, yang jika tidak ditangani secara klinis dan berlangsung dalam jangka waktu yang lama maka diabetes mellitus akan menimbulkan hiperglikemia, aterosklerosis dan penyakit vaskular mikroangiopati (Fatimah, 2015; Sujaya, 2009). Ciri khas hiperglikemia yang terdapat pada DM terjadi karena kelainan sekresi insulin, penurunan kerja insulin atau kedua-duanya (PERKENI,

2015). Diabetes mellitus dapat dibagi menjadi 2 tipe utama yaitu Diabetes Mellitus Tipe 1 (DMT1) dan Diabetes Mellitus Tipe 2 (DMT2). Selain dua tipe utama DM yang telah disebutkan, terdapat tipe diabetes lain seperti yaitu, *Impaired Glucose Tolerance (IGT)*, *Gestasional Diabetes Mellitus (GDM)* serta diabetes tipe lain yang disebabkan beberapa penyebab seperti zat kimia/obat-obatan dan penyakit eksokrin pankreas (Depkes, 2005; WHO, 2016).

Kadar glukosa yang meningkat diatas normal dapat dijadikan acuan dalam mendiagnosa penyakit diabetes mellitus. Pada hewan coba seperti tikus yang memiliki kadar glukosa normal berkisar antara 50-135 mg/dL (Johnson-delaney dan Harrison, 1996), diagnosa diabetes mellitus dapat ditegakkan berdasarkan salah satu kriteria berikut ini:

1. Kadar glukosa darah sewaktu > 200 mg/dL atau kadar glukosa puasa > 140 mg/dL
2. Pada Tes Toleransi Glukosa Oral (TTGO), kadar glukosa darah yang terukur 2 jam setelah pemberian beban glukosa adalah > 200 mg/dL
3. Dijumpainya glukosuria

(Anita, 2015; Etuk, 2010)

2.5 Pegagan (*Centella asiatica*)

Tanaman pegagan (*Centella asiatica*) merupakan tanaman liar yang banyak tumbuh di ladang, perkebunan, tepi jalan maupun di pekarangan (**Gambar 2.5**). Pegagan ini berasal dari Asia tropik, menyukai

tanah yang agak lembab, cukup sinar atau agak terlindung serta dapat ditemukan di daerah dataran rendah sampai dengan dataran dengan ketinggian 2.500 meter dpl (Hyene 1987; Dalimartha 2000).

Klasifikasi tanaman pegagan yaitu (Winarto dan Surbakti, 2003) :

Kingdom : Plante
 Super Divisi : Spermatophyta
 Divisi : Magnoliophyta
 Kelas : Dicotyledone
 Ordo : Umbiliferae
 Genus : Centella
 Spesies : *Centella asiatica*



Gambar 2.4 *Centella asiatica* (Kristanti, 2010)

2.5.1 Kandungan Pegagan (*Centella asiatica*)

Menurut Winarto dan Surbakti (2003), pegagan mengandung berbagai bahan aktif, yaitu: 1) triterpenoid saponin, 2) triterpenoid genin, 3) minyak astiri, 4) flavonoid, 5) fitosterol, dan bahan aktif lainnya. Selain itu, komponen bioaktif yang terdapat dalam tanaman pegagan adalah asiatikosida, tankunisida, isotankunisida, madekasosida, brahmosida, brahminosida, asam

brahmik, asam madasiatik, mesoinositol, sentelosida, karotenoid, hidrokotilin, vellarin, tanin serta garam mineral seperti kalium, natrium, magnesium, kalsium dan besi, fosfor, minyak atsiri (1%), pektin (17.25%), asam amino dan vitamin B (Wijayakusuma *et al.* 1994; Lasmadiwati *et al.* 2004).

Pegagan (*C. asiatica*) merupakan tanaman obat yang sedang dikembangkan sebagai obat tradisional, salah satunya sebagai antidiabetes. Kandungan senyawa aktif yang penting pada tanaman pegagan adalah senyawa triterpenoid. Kandungan triterpenoid pada pegagan dapat merevitalisasi pembuluh darah sehingga peredaran darah ke otak menjadi lancar, memberikan efek menenangkan dan meningkatkan fungsi mental menjadi lebih baik. Kandungan lain yang ada dalam pegagan adalah flavonoid yang berupa quersetin sebagai antioksidan yang mampu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas sehingga dapat menurunkan kadar glukosa darah dan meningkatkan hormon insulin serta memperbaiki sel-sel pulau langerhans pankreas (Hakim, 2010).

Mekanisme kerja dari senyawa flavonoid sebagai antioksidan bisa secara langsung maupun tidak langsung. Mekanisme kerja secara langsung yaitu dengan mendonorkan ion hidrogen sehingga dapat menetralkan efek toksik dari radikal bebas. Mekanisme kerja secara tidak langsung yaitu dengan meningkatkan ekspresi gen antioksidan endogen melalui beberapa mekanisme. Salah satu mekanisme peningkatan ekspresi gen antioksidan adalah melalui aktivasi nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf2)

sehingga terjadi peningkatan ekspresi gen yang berperan dalam sintesis misalnya gen SOD (superoxide dismutase) (Sumardika dan Jawi, 2011).

2.6 Kadar Enzim SOD (*Superoxide Dismutase*)

Tubuh memiliki tiga enzim antioksidan intrasel atau antioksidan endogen, yaitu *superoxyde dismutase* (SOD), *glutation peroxydase* (GPx) dan *catalase* (Cat). SOD merupakan salah satu antioksidan endogen yang berperan paling besar dalam mengkatalisis reaksi dismutase radikal bebas anion superoksida menjadi hidrogen peroksida dan molekul oksigen. Selanjutnya hidrogen peroksida diubah menjadi molekul air oleh enzim katalase dan glutathione peroxidase (Halliwell, 2004). Keberadaan SOD dapat ditemukan di otak, hati, sel darah merah, ginjal, tiroid, testis, otot jantung, mukosa lambung, kelenjar pituitari, pankreas dan paru. Aktivitas SOD dapat dijadikan acuan pengukuran stress oksidatif dalam tubuh (Mohanty, 2012).

Radikal bebas menyebabkan peroksidasi lipid yang salah satunya ditandai dengan peningkatan produksi MDA disertai penurunan kadar antioksidan enzimatis. Enzim SOD berfungsi sebagai katalisator reaksi dismutase dari anion superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen. SOD melindungi sel sel tubuh dan mencegah terjadinya proses peradangan yang disebabkan oleh radikal bebas dan memerlukan bantuan zat-zat mineral gizi seperti mangan (Mn), seng (Zn), dan tembaga (Cu) agar bisa bekerja (Winarsi, 2007).

2.7 TNF- α pada Diabetes Mellitus

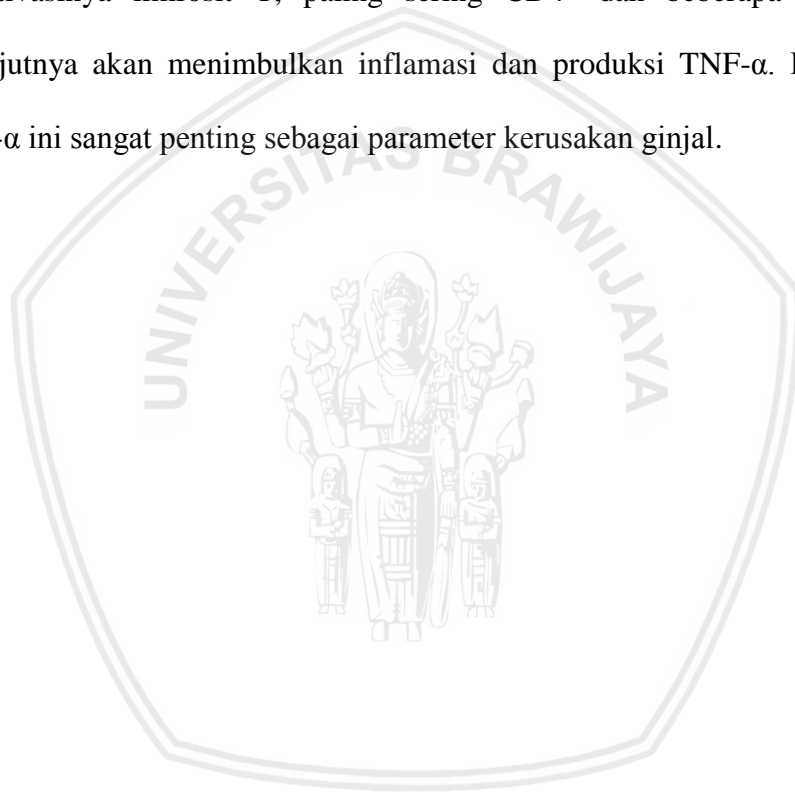
Kondisi hiperglikemia mengakibatkan terbentuknya AGEs yang dapat meningkatkan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) sehingga timbul keadaan stres oksidatif. Radikal bebas menginduksi kerusakan jaringan pada ginjal (Wang *et al*, 2017). Komponen pada ginjal seperti sel endothel glomerulus, sel mesangial, sel podosit dan epitel tubulus juga mengalami kerusakan disebabkan adanya kondisi hiperglikemia. Hiperglikemia juga menginduksi terjadinya hemodinamik intraglomerular, hiperfiltrasi dan kekacauan metabolik (Kanwar *et al*, 2012). Peningkatan ROS pada kondisi hiperglikemia dapat memicu terjadinya ikatan ROS dengan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) pada *fosfolipid bilayer* sehingga terjadi peroksidasi lipid dan merusak struktur membran sel pada ginjal serta terjadinya inflamasi pada ginjal (Kamble *et al*, 2015).

Kadar glukosa dalam darah yang tinggi menyebabkan terjadinya perubahan gambaran histologi dari glomerulus ginjal yaitu piknosis, karioreksis, dan glomerulus keseluruhannya tidak tertutup oleh *kapsula bowman*, terjadi proliferasi sel yang menyebabkan peningkatan tarikan dan tekanan mesangial sehingga mesangium glomerular mengembang dan terjadi hipertrofi yang menstimulasi pelebaran glomerulus. Mekanisme kerusakan ginjal karena diabetes salah satunya dipengaruhi oleh jalur hiperglikemia (Breyer, 2005).

Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) dibentuk atas 212 asam amino diatur pada homotrimers yang stabil dengan berat molekul 51 kDa. TNF- α adalah suatu sitokin yang bersifat pleiotropik, yang sebagian besar dihasilkan oleh monosit, makrofag, dan sel T. Ekspresi dan sintesa dari TNF- α dihasilkan oleh sel-sel hematopoietik dan sel intrinsik ginjal, termasuk sel mesangial, glomerulus, endotel, dendrit, sel tubulus ginjal menghasilkan sitokin ini. Penelitian pada saat ini memperlihatkan bahwa, TNF- α dapat disimpan di dalam sel dalam bentuk proaktif, dan enzim yang dapat merubah TNF- α secara cepat meningkatkan ekspresi TNF- α yang aktif. Meningkatnya ekspresi TNF- α terdapat pada keadaan inflamasi akut dan kronik (Popa *et al.*, 2007).

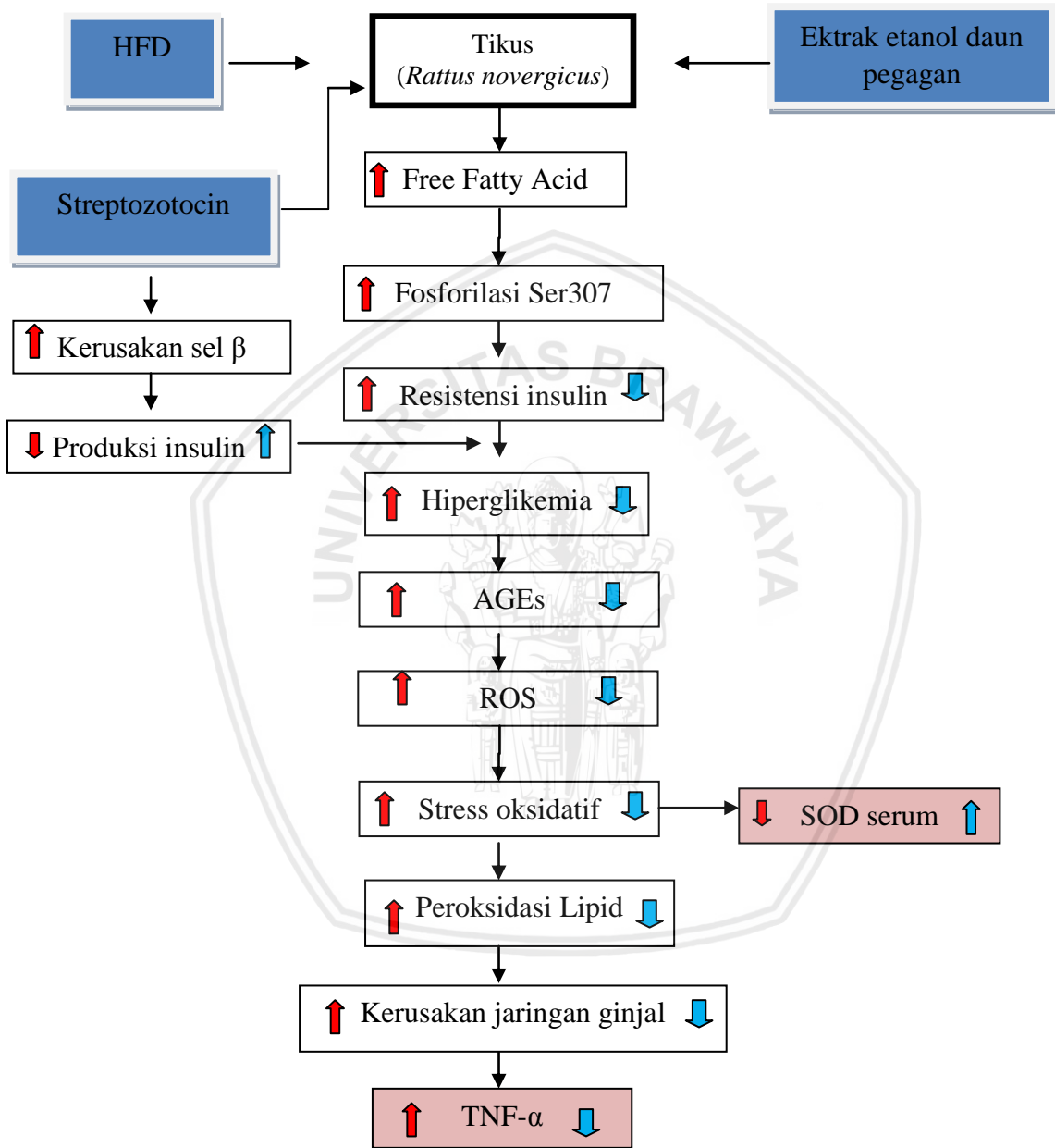
Menurut Green and Flavell (2000) penyebab teraktivasiya TNF- α adalah faktor-faktor eksogen dan endogen. Faktor eksogen merupakan antigen atau benda asing yang berasal dari luar tubuh seperti enterotoksin, protein dinding sel jamur, virus dan komponen dari parasit. TNF- α merupakan sitokin yang memiliki peranan besar dalam aktivasi sistem imun dibandingkan dengan sitokin lainnya. TNF- α memiliki peranan penting dalam mendukung proses kemotoksis sel-sel inflamasi, mengaktivasi sel-sel inflamasi baik TNF- α sendiri maupun sitokin lain, merangsang sel-sel endotel untuk mengekspresikan molekul adhesi, merangsang APCs untuk meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I dan mendukung fungsi sel T-*cytotoxic*. Efek yang ditimbulkan oleh TNF- α diantaranya adalah inisiator neutrofil dan monosit ke tempat-tempat infeksi, menginisiasi ekspresi molekul adhesi sel, menginduksi apoptosis sel-sel inflamasi (Cohen and Bonta, 2004).

Keberadaan TNF- α pada jaringan ginjal dapat menjadi indikasi kondisi patologi jaringan yang dapat digambarkan melalui metode imunohistokimia. Proses inflamasi di dalam sel akan menyebabkan teraktivasinya makrofag yang akan memproduksi sitokin proinflamasi salah satunya TNF- α . Pada awalnya STZ sebagai agen diabetagonik menyebabkan teraktivasinya limfosit T, paling sering CD4⁺ dan beberapa CD8⁺ dan selanjutnya akan menimbulkan inflamasi dan produksi TNF- α . Keberadaan TNF- α ini sangat penting sebagai parameter kerusakan ginjal.



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konsep



Gambar 3.1. Mekanisme kerja induksi dan terapi DM pada tikus

Keterangan :

- : Parameter yang diamati
- : Perlakuan
- ↑ ↓ : efek induksi (HFD dan STZ)
- ↑ ↓ : efek terapi ekstrak pegagan

Tikus diberikan pakan tinggi lemak atau *High-Fat Diet* (HFD) selama 28 hari. Pakan tinggi lemak yang diberikan selama jangka waktu tersebut akan memicu terjadinya resistensi insulin. Meningkatnya kadar asam lemak bebas (*Free Fatty Acid* = FFA) akan menurunkan sensitivitas kerja reseptor insulin yang terdapat dalam jaringan akibat fosforilasi Serine 307 pada IRS. Akibatnya, akan terjadi penurunan aktivitas PI3-K yang seharusnya teraktivasi oleh IRS dalam merangsang translokasi GLUT menuju permukaan sel untuk melakukan *uptake* glukosa. Jika hal tersebut terjadi secara terus menerus maka akan terjadi resistensi insulin sehingga glukosa dalam darah tidak dapat ditransport ke dalam jaringan. Kemudian streptozotocin (STZ) diberikan untuk mempercepat proses terjadinya diabetes mellitus tipe 2 (DMT2). STZ merupakan senyawa yang bersifat toksik terhadap sel β pankreas sehingga akan menurunkan produksi insulin. Selain menurunkan produksi insulin, STZ juga menyebabkan terjadinya resistensi reseptor insulin karena meningkatkan ROS sehingga mengaktivasi kasein kinase 2 menjadi retromer, kemudian retromer akan mentransfer GLUT-4 ke lisosom, sehingga GLUT-4 akan terdegradasi dan menyebabkan resistensi insulin (Hurrell and Hsu, 2017). Terjadinya resistensi insulin dan menurunnya produksi insulin merupakan kondisi awal dari DMT2.

Resistensi insulin adalah kondisi ketidakmampuan insulin untuk menstimulasi *uptake* glukosa ke jaringan sehingga akan menyebabkan terjadinya hiperglikemia. Tingginya kadar gula akibat resistensi insulin dan penurunan produksi insulin akan menimbulkan glukotoksisitas dan

mempengaruhi fungsi sebagian besar organ dan jaringan dalam tubuh. Meningkatnya konsentrasi glukosa dalam jangka panjang juga dapat memicu proses glikasi lipid dan protein yang mengakibatkan peningkatan AGEs (*Advanced Glycation End-products*).

Interaksi antara AGEs dalam sirkulasi dengan RAGEs (*Receptor for Advanced Glycation End-products*) akan meningkatkan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) intraseluler. Peningkatan ROS pada kondisi hiperglikemia dapat memicu terjadinya ikatan ROS dengan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) pada *fosfolipid bilayer* sehingga terjadi peroksidasi lipid dan merusak struktur membran sel pada ginjal serta terjadinya inflamasi pada ginjal (Kamble *et al*, 2015). Interaksi AGEs dengan reseptornya juga dapat meningkatkan faktor transkripsi NF- κ B serta produknya. Peningkatan NF- κ B berhubungan dengan peningkatan ekspresi gen *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) dan infiltrasi makrofag pada jaringan ginjal dengan memproduksi ekspresi gen-gen proinflamasi seperti IL-1, IL-1 β , dan TNF- α , sehingga akan menimbulkan inflamasi kronik yang menjadi kejadian terminal komplikasi vaskuler melalui jalur AGEs (Gross, 2005).

Ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak ethanol daun pegagan (*Centella asiatica*) yang mengandung senyawa triterpenoid terutama asiatikosida, madekosida, asam asiatik, dan flavonoid. Flavonoid merupakan bahan aktif yang memiliki fungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi dan antihiperlipidemi. Senyawa polifenol terutama flavonoid berperan dalam mendonorkan ion hidrogen sehingga dapat menetralkan efek

toksik dari radikal bebas dan meningkatkan ekspresi gen antioksidan endogen melalui beberapa mekanisme. Salah satu mekanisme peningkatan ekspresi gen antioksidan adalah melalui aktivasi nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf2) sehingga terjadi peningkatan ekspresi gen yang berperan dalam sintesis misalnya gen SOD (superoxide dismutase) (Sumardika dan Jawi, 2011). Kemampuan flavonoid sebagai antioksidan disebabkan karena flavonoid bertindak sebagai *scavenger* radikal bebas. Flavonoid memiliki atom hidrogen bebas yang kemudian akan didonorkan ke radikal bebas, sehingga terbentuk radikal fenoksil flavonoid yang memiliki reaktivitas lebih rendah. Radikal fenoksil flavonoid memiliki ikatan rangkap terkonjugasi sehingga dapat menstabilkan strukturnya untuk menghilangkan efek radikal bebas. Senyawa-senyawa flavonoid dapat menghambat produksi TNF- α dengan cara menekan aktivasi NF-KB yang akan melemahkan respon autoimun dan respon inflamasi, sehingga penurunan kadar TNF- α akan memacu regenerasi sel ginjal.

3.2. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan kadar SOD serum pada tikus (*Rattus norvegicus*) model DM.
2. Ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica*) dapat menurunkan ekspresi TNF- α pada tubulus ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) model DM.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 3 bulan, dimulai pada bulan April hingga bulan Juni 2018. Pemeliharaan hewan coba bertempat di Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Islam Negeri, pengujian kadar SOD serum bertempat di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan pembuatan IHK TNF- α ginjal bertempat di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2. Alat dan Bahan

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain kandang individu tikus (*individually ventilated cages*), timbangan digital, baskom, spatula, *refrigerator*, tabung Falcon 15 mL, *microtube*, *pipette tip*, *micropipette*, *multichannel pipette*, *vortex*, *centrifuge*, spuit Tuberculin 1 cc, sonde lambung tikus, *glucose test kit*, *microhematocrit*, mortar, tabung reaksi, mikrotom, mikroskop cahaya, kamera Optilab *Advance Plus*, spektrofotometer dan oven.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), pakan standar, pakan tinggi lemak, Streptozotocin, aquades, asam sitrat 0,2 M, natrium sitrat 0,2 M, Pewarna IHK dan antibodi, EDTA, xanthine, NBT, tabung venoject non-EDTA, daun pegangan, parafin,

object glass dan *cover glass*, xylol, alkohol asam 1% dan alkohol (70%, 80%, 90%, 95% dan alkohol absolut).

4.3. Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), yaitu membagi subyek menjadi lima kelompok secara acak. Setiap kelompok terdiri dari empat tikus. Kelompok K(-) adalah tikus sehat sebagai kontrol negatif, kelompok K(+) adalah tikus yang dibuat sakit DM tanpa terapi (kontrol positif), kelompok P1, P2, P3 (kelompok terapi) adalah kelompok tikus yang dibuat sakit DM dan diterapi dengan ekstrak ethanol daun pegagan dengan dosis masing-masing 75 mg/kg BB, 150 mg/kg BB dan 300mg/kg BB (Lampiran 3).

4.4. Sampel Penelitian

Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 2-3 bulan dengan bobot badan tikus antara 150-200 gram. Hewan coba dilakukan aklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Adapun perkiraan banyak sampel dapat dihitung menggunakan rumus (Kusriningrum, 2008):

$$t(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

Keterangan :

t : Jumlah kelompok perlakuan

n : Jumlah ulangan yang diperlukan

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 5 kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok perlakuan.

4.5. Variabel Penelitian

Adapun variabel dalam penelitian ini yaitu :

- Variabel bebas : Pemberian pakan tinggi lemak, dosis STZ, dosis ekstrak ethanol daun pegagan
- Variabel tergantung : Kadar SOD serum dan ekspresi TNF- α ginjal
- Variabel kontrol : Hewan coba tikus strain Wistar jantan, berat badan, umur, pakan, minum, lingkungan dan suhu kandang

4.6. Tahapan Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus diaklimatisasi terlebih dahulu terhadap lingkungan selama tujuh hari untuk beradaptasi dengan keadaan kandang dan perubahan waktu makan. Selama aklimatisasi, semua tikus akan diberikan pakan berupa pakan standar dengan komposisi 5% lemak, 53% karbohidrat, dan 23% protein. Air minum untuk tikus diberikan secara *ad libitum*. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 4 ekor tikus per kelompok.

4.6.2 Prosedur Pembuatan Hewan Model DM

Tikus model DMT2 dibuat dengan pemberian pakan tinggi lemak (*High Fat-Diet* = HFD) untuk menginduksi obesitas, resistensi insulin serta terganggunya homeostasis glukosa dan injeksi STZ diberikan untuk menurunkan fungsi sel β pankreas sehingga mengganggu produksi insulin dan menimbulkan hiperglikemia. Beberapa kejadian tersebut merepresentasikan kejadian patofisiologis pada DMT2 sehingga kombinasi HFD-STZ sering digunakan untuk membuat tikus model DMT2 (Eleazu *et al.*, 2013; King, 2012).

Pakan tinggi lemak tersusun dari 17% karbohidrat, 25% protein, dan 58% lemak. Pemberian pakan tinggi lemak pada tikus dilakukan selama 4 minggu sebanyak 40 g/hari/ekor untuk menyiasati kekurangan pakan akibat perbedaan asupan per individu dan gejala *polyphagia* akibat hiperglikemia (Holmes *et al.*, 2015; Nugroho *et al.*, 2015). Streptozotocin (dosis 30 mg/kg BB dalam buffer sitrat 0,1 M pH 4,5) diinjeksikan secara intraperitoneal setiap minggu selama 2 minggu dan tetap diberikan pakan tinggi lemak (Skovso, 2014).

Pengukuran kadar glukosa pada tikus dilakukan sebelum dan setelah dilakukan induksi streptozotocin sehingga diketahui kadar glukosa sebelum dan setelah hewan coba terkena diabetes mellitus. Saat sudah dilakukan pemberian ekstrak ethanol daun pegagan selama 7 hari juga dilakukan pemeriksaan kadar glukosa darah yang bertujuan untuk mengetahui kadar glukosa darah tikus apakah sudah mengalami penurunan

setelah diberikan terapi. Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan alat digital yaitu glukometer dengan cara mengambil darah melalui ujung ekor tikus dengan menggunakan *blood lancet* darah yang keluar lalu diteteskan pada ujung *blood strip* dan ditunggu hasil yang muncul pada layar alat glukometer digital. Pada hewan coba seperti tikus yang memiliki kadar glukosa normal berkisar antara 50-135 mg/dL (Johnson-delaney dan Harrison, 1996), diagnosa diabetes mellitus dapat ditegakkan berdasarkan salah satu kriteria berikut ini:

1. Kadar glukosa darah sewaktu > 200 mg/dL atau kadar glukosa puasa > 140 mg/dL
2. Pada Tes Toleransi Glukosa Oral (TTGO), kadar glukosa darah yang terukur 2 jam setelah pemberian beban glukosa adalah > 200 mg/dL (Anita, 2015; Etuk, 2010)

4.6.3 Pembuatan Ekstrak Ethanol Daun Pegagan

Ekstrak etanol pegagan dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Proses pembuatan ekstrak etanol pegagan dapat dilakukan dengan 2 langkah kerja yaitu (Kumar, 2003) :

1. Proses Ekstraksi

Daun pegagan dilakukan penyortiran dan dibersihkan dari debu yang masih melekat. Selanjutnya, daun pegagan dikeringkan dengan cara dimasukkan ke dalam oven dengan suhu $40-60^{\circ}\text{C}$. Setelah itu proses ekstraksi dimulai dengan menggiling daun pegagan yang telah kering

menjadi serbuk halus (simplisia). Daun pegagan yang sudah kering dihaluskan dengan menggunakan blender, kemudian ditimbang dengan timbangan analitik sebanyak 100 gram. Daun pegagan yang sudah kering sebanyak 100 gram tersebut dimasukkan dalam labu Erlenmeyer ukuran 1 L, kemudian ditambahkan dengan ethanol 96% sampai volume 900 mL dan dikocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit). Terakhir campuran didiamkan 1 malam sampai mengendap.

2. Proses Evaporasi

Lapisan atas campuran ethanol diambil dan dimasukkan dalam labu evaporasi pada evaporator. Kemudian *water bath* diisi dengan air sampai penuh dan semua rangkaian alat dipasang termasuk : *rotary evaporator*, pemn *water bath* (diatur sampai 90°C) dan disambungkan dengan aliran listrik. Lalu larutan ethanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu dan ditunggu sampai aliran ethanol berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 sampai 2 jam). Kemudian hasil ekstraksi dimasukkan dalam botol dan disimpan pada *refrigerator*.

4.6.4 Terapi Pemberian Ekstrak Daun Pegagan

Dosis eksperimental ditentukan berdasarkan penelitian Andriani (2014) yang menggunakan ekstrak seledri (*Apium graveolens L.*), berdasarkan kekerabatannya dalam satu family umbelliferae, peneliti berasumsi bahwa daun pegagan memiliki kandungan kimia yang relatif sama dengan daun seledri. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini

adalah sebesar 75 mg/kg BB, 150 mg/kg BB, 300 mg/kg BB dengan dosis masing-masing tikus terdapat pada **Lampiran 7**. Terapi diberikan satu minggu setelah perlakuan induksi STZ kedua. Dosis sebesar 75 mg/kg BB diberikan pada kelompok tikus perlakuan 1, dosis 150 mg/kg BB diberikan pada kelompok tikus perlakuan 2, dan dosis 300 mg/kg BB diberikan pada kelompok tikus perlakuan 3. Terapi diberikan dengan cara oral menggunakan sonde sehari sekali selama satu minggu.

4.6.5 Pengukuran Kadar SOD Serum

Penentuan Pemeriksaan kadar SOD dengan metode spektrofotometri. Darah yang telah disentrifuge, dicampur dengan EDTA 100 mM, NBT 25 U, Xanthine 25 U, dan Xanthin Oksidase 1 U hingga homogen, kemudian diinkubasi, disentrifuge, dan disaring bila terdapat koloid. Pembacaan dilakukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm (Kusumastuty, 2014).

4.6.6 Pembuatan Preparat IHK TNF- α

Langkah yang digunakan untuk membuat uji imunohistokimia yaitu preparat terlebih dahulu direndam kedalam xylol I, xylol II, alkohol bertingkat yaitu 100%, 90%, 80%, 70%, akuades diberikan selama 5 menit kemudian preparat dicuci menggunakan PBS pH 7,4 diulang selama 3 kali selama 5 menit, kemudian ditetaskan H₂O₂ 3% selama 10 menit. Setelah itu dilakuakn pencucian kembali dengan PBS 7,4 dilakukan pengulangan 3 kali

selama 5 menit dengan suhu ruang. setelah itu diinduksikan dengan antibodi primer (anti-rat TNF- α) selama 24 jam dengan suhu 4°C kemudian dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 diulang 3 kali dengan waktu 5 menit. lalu diinkubasi dengan antibodi sekunder selama satu jam dengan suhu ruangan kemudian dicuci kembali menggunakan PBS pH 7,4 diulang 3 kali dengan waktu 5 menit. Selanjutnya preparat ditetesi dengan SA-HRP (Strep Avidin Horse Radish Peroxidase) selama 40 menit dengan suhu ruang. Kemudian dicuci kembali menggunakan PBS pH 7,4 diulang 3 kali selama 5 menit. setelah itu diinkubasi pada kromagen DAB selama 2-4 menit lalu di cuci dengan air mengalir selama 5 menit. Setelah itu dilakukan counterstaining menggunakan hematoksilin selama 5 menit dan dicuci dengan air mengalir, kemudian dilakukan dehidrasi dengan alkohol dan xylol selama 3 menit, kemudian di bilas dengan akuades dan dikeringkan. Hal terakhir yang dilakukan adalah mounting dengan entellan dan kemudian ditutupi cover glass (Ramos-Vara, 2005).

4.6.7 Pengamatan Ekspresi TNF- α

Pewarnaan imunohistokimia bertujuan untuk menghitung presentasi ekspresi TNF- α pada ginjal. Preparat jaringan ginjal yang telah dilakukan pewarnaan selanjutnya diamati menggunakan mikroskop (Olympus BX51®) dengan perbesaran 400x. Pengamatan selanjutnya didokumentasikan pada lima lapang pandang. Alat pemindai yang digunakan umumnya terdiri dari mikroskop cahaya untuk memperoleh

gambar mikroskopis dari jaringan secara berurutan sehingga seluruh preparat dapat di pindai menggunakan software immunoratio. Komplek antigen-antibodi bereaksi dengan kromogen DAB maka akan menghasilkan endapan berwarna (kromogranin) sehingga menghasilkan produk tervisualisasi yang berwarna coklat (Ramadhani dkk., 2012).

4.7. Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan analisis kuantitatif statistik. Analisis kuantitatif statistik dilakukan dengan menggunakan program SPSS 16 dengan uji analisis ragam *One-Way ANOVA* untuk melihat keseragaman antar maupun inter kelompok uji, kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey $\alpha = 5\%$ untuk mengetahui perbedaan rata-rata tiap perlakuan.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Kadar

SOD Serum Tikus Model DM

Uji aktivitas enzim superoksida dismutase dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada serum tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes melitus (hasil induksi pakan tinggi lemak serta streptozotocin) dan setelah pemberian terapi ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica*). Aktivitas enzim superoksida dismutase didefinisikan sebagai banyaknya mikromolekul (μmol) radikal anion superoksida yang diubah menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) oleh tiap (mL) enzim SOD permenit pada kondisi optimum hasil isolasi dan serum tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Ardian, 2013). Hasil pengukuran aktivitas enzim superoksida dismutase serum tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes mellitus yang diterapi ekstrak etanol daun pegagan (*C. asiatica*) (Tabel 5.1).

Tabel 5.1. Rata-rata kadar SOD serum pada tikus yang diberi ekstrak daun pegagan

Kelompok	Rata-rata SOD Dan standar deviasi	% Peningkatan SOD terhadap K+	% Penurunan SOD terhadap K-
Kontrol negatif (K-)	58,67 \pm 1,41 ^c	-	-
Kontrol positif (K+)	36,52 \pm 3,77 ^a	-	37,75 %
75 mg/kgBB (p1)	52,10 \pm 1,07 ^b	42,66 %	-
150 mg/kgBB (p2)	57,87 \pm 2,01 ^c	58,46 %	-
300 mg/kgBB (p3)	48,49 \pm 1,72 ^b	32,78 %	-

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0.05$).

Hasil analisa statistik SPSS 16 menggunakan *One-Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$) terhadap aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) yang ditunjukkan adanya notasi yang berbeda pada uji lanjutan Tukey (**Tabel 5.1**, dan **Lampiran 10**). Kelompok kontrol negatif digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya peningkatan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) pada tikus model DM dan terapi ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica*). Nilai aktivitas SOD pada kelompok kontrol negatif $58,67 \pm 1,41$ unit/mL merupakan hasil dari proses metabolisme secara normal. Menurut Nurhasanah (2005), menjelaskan bahwa superoksida dismutase merupakan enzim yang terdapat pada sitoplasma dan mitokondria. Keberadaan SOD juga dapat ditemukan di otak, hati, sel darah merah, ginjal, tiroid, testis, otot jantung, mukosa lambung, kelenjar pituitari, pankreas dan paru (Mohanty, 2012). Mekanisme kerja SOD dibantu oleh dua enzim lain, yaitu katalase dan glutathione (GSH) peroksidase. Enzim SOD secara spontan merubah radikal ($O_2^{\cdot-}$) menjadi H_2O_2 dan oksigen dengan kecepatan sekitar $10^5 M^{-1} s^{-1}$ pada pH, reaksinya sebagai berikut : $O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$. Reaksi tersebut berlangsung sangat cepat dan hanya dibatasi oleh frekuensi tumbukan SOD dengan superoksida. Hidrogen peroksida yang dihasilkan masih cukup berbahaya sehingga perlu pengubahan lebih lanjut oleh katalase menjadi air dan oksigen (Yoon *et al.*, 2008).

Pada kelompok kontrol positif (tikus model DM) aktivitas SOD $36,52 \pm 3,77$ unit/mL memiliki hasil yang signifikan ($p < 0,05$) dengan

kelompok kontrol negatif ditunjukkan dengan notasi yang berbeda pada **Tabel 5.1**. Menurunnya aktivitas SOD mengindikasikan terjadinya autooksidasi yang menyebabkan pembentukan *Reactive Oxygen Spesies* (ROS), terutama radikal anion superperoksida (O_2^*) pada serum tikus (*Rattus norvegicus*) hasil induksi pakan tinggi lemak dan streptozotocin. Jika ROS berlebihan di dalam tubuh, maka akan memicu terjadinya stress oksidatif, yaitu keadaan jumlah radikal bebas yang diproduksi melebihi kapasitas tubuh untuk menangkalnya (Wiryana, 2008).

Kelompok P1 (terapi 75 mg/kg BB) menunjukkan peningkatan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) sebesar $52,10 \pm 1,07$ unit/mL dan secara statistik berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok tikus kontrol positif, kelompok kontrol negatif, dan kelompok P2 (terapi 150 mg/kg BB) namun tidak berbeda dengan kelompok P3 (terapi 300 mg/kg BB) yang dinyatakan dengan notasi pada hasil uji Tukey (**Tabel 5.1**). Hasil tersebut menunjukkan terapi ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica*) mampu meningkatkan aktivitas antioksidan endogen yaitu aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) dan menurunkan radikal bebas yang ada di dalam tubuh tikus (*Rattus norvegicus*) model DM.

Kelompok P2 (terapi 150 mg/kg BB) menunjukkan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) sebesar $57,87 \pm 2,01$ unit/mL dan secara statistik berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok tikus kontrol positif, dan tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif yang dinyatakan dengan notasi pada hasil uji Tukey (**Tabel 5.1**). Hasil tersebut menunjukkan terapi

ekstrak etanol daun pegagan (*C. asiatica*) dosis 150 mg/kg BB yang terbaik sebagai terapi diabetes melitus dibandingkan dengan terapi dosis 75 mg/kg BB dan 300 mg/kg BB, karena menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata dengan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) tikus (*Rattus norvegicus*) pada kelompok negatif (kontrol).

Kelompok P3 (terapi 300 mg/kg BB) menunjukkan adanya peningkatan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) sebesar $48,49 \pm 1,72$ unit/mL. Hasil ini memiliki nilai yang lebih rendah dibandingkan dengan hasil kelompok P1 dan P2. Menurut Evina (2011), jika kadar flavonoid lebih tinggi dari yang dibutuhkan oleh tubuh flavonoid dapat berubah fungsi menjadi prooksidan dimana akan mengaktifasi makrofag dalam melakukan fagositosis, sehingga ekspresi SOD akan menurun sebagaimana yang terjadi pada kelompok perlakuan P3 dengan dosis 300 mg/kg BB.

Peningkatan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) pada kelompok terapi menunjukkan adanya penurunan dari radikal bebas setelah pemberian terapi ekstrak etanol daun pegagan (*C. asiatica*) mengandung senyawa flavonoid yang bertindak sebagai antioksidan (**Lampiran 2**). Tanaman pegagan juga mengandung senyawa glikosida madecosida yang memiliki efek antiinflamasi, senyawa triterpenoid yang dapat merevitalisasi pembuluh darah sehingga memperlancar pembuluh darah, dan senyawa asiatikosida yang dapat meningkatkan perbaikan sel, menstimulasi sel darah dan sistem imun, dan sebagai antibiotik alami (Sutardi, 2016). Antioksidan

berupa flavonoid pada ekstrak etanol daun pegagan (*C. asiatica*) berfungsi sebagai *scavenger* radikal bebas yang berlebih akibat hiperglikemia. Berdasarkan struktur kimia, flavonoid merupakan senyawa fenol yang aktif sebagai antioksidan. Flavonoid dapat mencegah kerusakan sel β pankreas, karena kemampuannya dalam melindungi sel islet pankreas dari kerusakan oksidatif (Hakim, 2010). Adanya paparan stress oksidatif pada tikus (*Rattus norvegicus*) model DM, enzim superoksida dismutase (SOD) sebagai antioksidan endogen akan meningkatkan aktivitasnya untuk mengontrol stress oksidatif tersebut. Apabila stress oksidatif sudah dapat diatasi, maka aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) kembali normal.

Antioksidan dalam ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica*) bertujuan sebagai antioksidan yang berasal dari luar tubuh untuk menurunkan radikal bebas pada tubuh dengan cara mendonasikan atom hidrogen (H) dari gugus hidroksil (OH) kepada radikal bebas (R^*) sehingga flavonoid berubah menjadi radikal fenoksil flavonoid (FIO^*) yaitu ($FI - OH + R^* \rightarrow FIO^* + RH$). Radikal fenoksil flavonoid yang pertama terbentuk akan diserang kembali oleh radikal bebas (R^*) sehingga membentuk radikal fenoksil flavonoid yang kedua (FIO^*), karena radikal fenoksil flavonoid punya ikatan rangkap yang terkonjugasi maka flavonoid mampu menyeimbangkan dengan cara delokalisasi elektron sehingga menjadi senyawa kuinon yang stabil (Batutihe, 2010). Hal tersebut menunjukkan penghambatan radikal bebas dan peningkatan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) dikarenakan kemampuan flavonoid yang bekerja sebagai *scavenger* radikal bebas dengan

adanya gugus hidroksil dalam susunan gugus fenol serta ikatan rangkap terkonjugasi (Ardian, 2013).

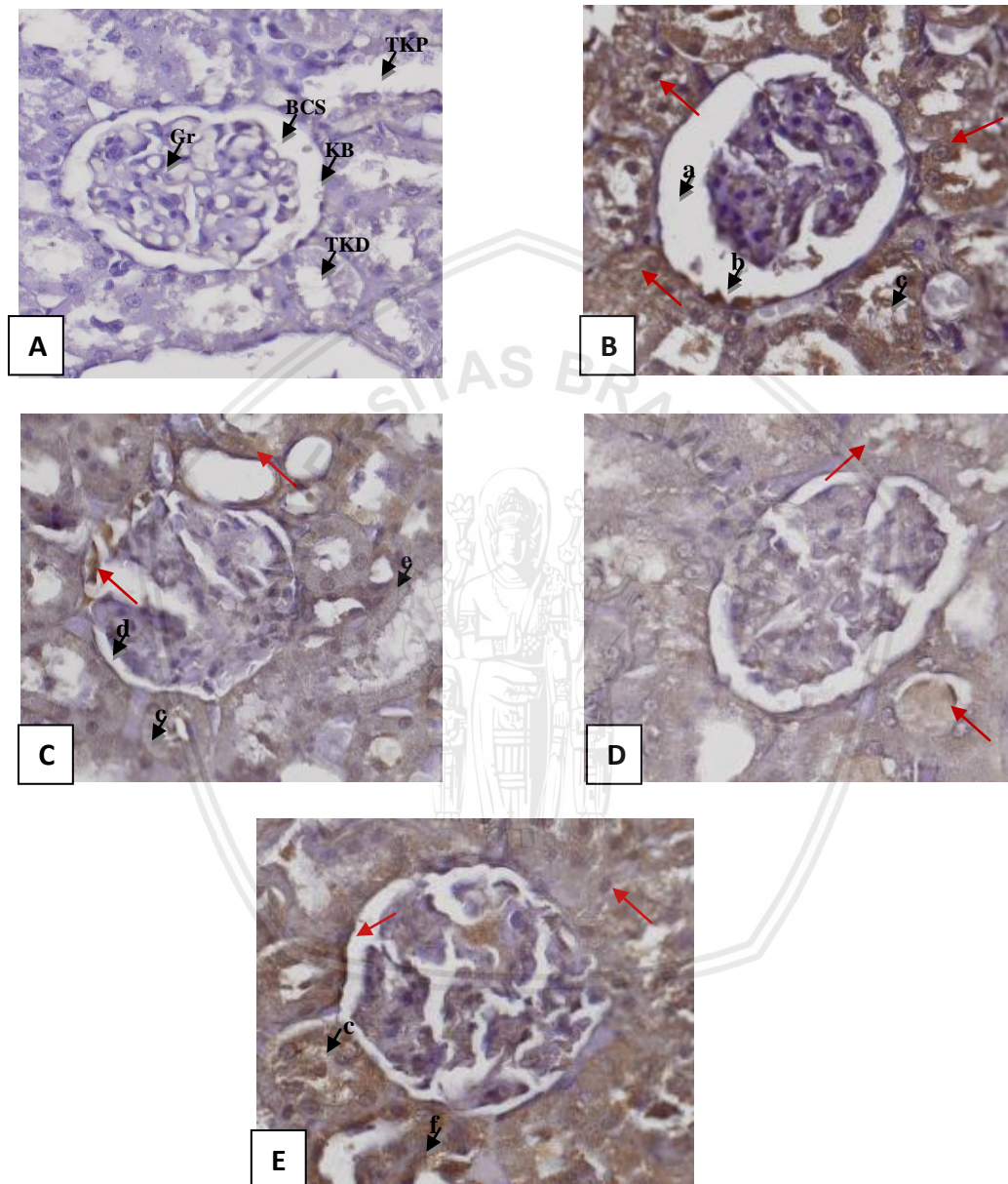
5.2 Pengaruh Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi TNF- α Ginjal Tikus Model DM

Analisis ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) pada penelitian ini dilakukan dengan melakukan rata-rata lima lapang pandang persentase ekspresi TNF- α glomerulus dan tubulus sekitarnya pada perbesaran 40x yang diproses melalui aplikasi *Immunoratio* pada setiap tikus pada semua ulangan tiap perlakuan, kemudian dilakukan analisis statistika menggunakan *One Way ANOVA* dengan aplikasi *SPSS for Windows 16* dan dilanjutkan dengan uji Tukey dengan taraf kepercayaan $\alpha = 5\%$ (**Lampiran 11**).


Hasil ekspresi TNF- α (**Gambar 5.1**) menunjukkan adanya warna coklat pada glomerulus dan tubulus ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes mellitus (DM) penggunaan antibodi TNF- α menggunakan metode imunohistokimia (IHK). Warna coklat yang dihasilkan merupakan reaksi antara enzim *Strept Avidin conjugated Horseradish Peroxidase* (SAHRP) yang berikatan dengan antibodi sekunder dengan kromagen *Diaminobenzidine* (DAB) (Immunostar, 2010).

Penelitian ini dilakukan pada 5 kelompok tikus untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi TNF- α pada organ ginjal tikus model DM. Penurunan ekspresi TNF- α

pada ginjal ditunjukkan dengan makin sedikitnya warna kecoklatan pada tubulus (**Gambar 5.1**).



Gambar 5.1 Ekspresi TNF- α pada tubulus ginjal tikus perbesaran 100x

Keterangan : A = Tikus kontrol negatif; B =Tikus kontrol positif; C =Tikus terapi 1; D =Tikus terapi 2; E =Tikus terapi 3; () menunjukkan ekspresi TNF- α . KB = Kapsula Bowman; TKP = tubulus kontortus proksimal; BCS = Bowman capsule space; TKD = tubulus kontortus distal; Gr = glomerulus. (a) jarak antara Kapsula Bowman dan glomerulus semakin menjauh (b) kapsula Bowman nekrosis (c) nekrosis sel TKD (d) jarak antara Kapsula Bowman dan glomerulus menyempit (e) sel TKP nekrosis (f) TKP hipertropi

Hasil rata-rata ekspresi TNF- α menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) dari seluruh perlakuan. Hal ini membuktikan adanya pemberian ekstrak etanol daun pegagan setiap kelompok perlakuan dapat mempengaruhi penurunan dari Ekspresi TNF- α pada ginjal tikus yang diinduksikan oleh streptozotocin. Rata-rata dari ekspresi TNF- α pada ginjal tikus pada masing-masing kelompok perlakuan ditampilkan pada **Tabel 5.2**

Tabel 5.2 Rata-rata ekspresi TNF- α pada tikus yang diberi ekstrak daun pegagan

Kelompok	Rata-rata \pm standar deviasi TNF- α	% Peningkatan TNF- α terhadap K-	% Penurunan TNF- α terhadap K+
Kontrol negatif (K-)	14,77 \pm 3,77 ^a	-	-
Kontrol positif (K+)	71,99 \pm 7,79 ^d	387,41 %	-
75 mg/kgBB (p1)	54,05 \pm 4,43 ^c	-	24,92 %
150 mg/kgBB (p2)	27,72 \pm 1,97 ^b	-	61,51 %
300 mg/kgBB (p3)	44,70 \pm 3,76 ^c	-	37,91 %

Keterangan : notasi a,b,c,d dan e menunjukkan adanya perbedaan masing-masing yang signifikan anatara perlakuan ($p < 0,05$)

Pada **Tabel 5.2** dapat dilihat bahwa kelompok tikus kontrol negatif (sehat) memiliki nilai ekspresi TNF- α paling rendah (14,77 \pm 3,77^a), TNF- α muncul secara normal dalam jumlah yang sedikit sebagai respon imun yang diproduksi oleh makrofag dalam proses fagositosis sel yang mati dan antigen yang masuk ke dalam tubuh (Garlanda *et al.*, 2014).

Ekspresi TNF- α pada kontrol negatif berbeda nyata dengan kontrol positif yang memiliki ekspresi (71,99 \pm 7,79^d) hal ini dikarenakan oleh induksi streptozotocin dan pakan tinggi lemak pada kelompok positif menyebabkan adanya kerusakan pada sel β pankreas sehingga terjadi hiperglikemia.

Tingginya kadar glukosa darah akan meningkatkan proses glikasi dan menghasilkan *Advanced Glycation End Product* (AGEs) yang bersifat glikotoksin sehingga memicu adanya stres oksidatif dan inflamasi pada ginjal. Peningkatan pada produksi AGEs akan mengakibatkan ROS meningkat, meningkatnya ROS akan mengaktifasi makrofag untuk mengurai NF-KB yang berfungsi untuk mengontrol gen penting salah satunya produksi TNF- α . Peningkatan pada kadar ekspresi TNF- α merupakan respon terhadap adanya inflamasi jaringan yang berfungsi untuk mengontrol infeksi dan perbaikan jaringan. Peningkatan ROS juga dapat merusak fosfolipid bilayer pada membran sel sehingga dinding menjadi rapuh (Gross, 2005).

Perbandingan antara kontrol positif dengan kelompok terapi pada **Tabel 5.2** menunjukkan bahwa ada perbedaan nyata antara kelompok positif ($71,99 \pm 7,79^d$) dibandingkan dengan kelompok P1 ($54,05 \pm 4,43^c$), kelompok P2 ($27,72 \pm 1,97^b$), dan kelompok P3 ($44,70 \pm 3,76^c$). Kelompok perlakuan P1 dan P3 memiliki hasil yang berbeda nyata juga dengan kelompok negatif yang ditunjukkan dengan notasi yang berbeda, namun dari hasil penelitian ini masing-masing kelompok mengalami penurunan ekspresi TNF- α . Kelompok perlakuan P2 dengan dosis 150 mg/kgBB mampu menurunkan ekspresi TNF- α yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok P1 dan P3. Dosis 150 mg/kgBB merupakan dosis terbaik dalam menurunkan ekspresi TNF- α pada tikus model DM.

Penurunan ekspresi TNF- α terjadi pada ketiga kelompok perlakuan. Hal tersebut disebabkan karena pemberian terapi menggunakan ekstrak daun

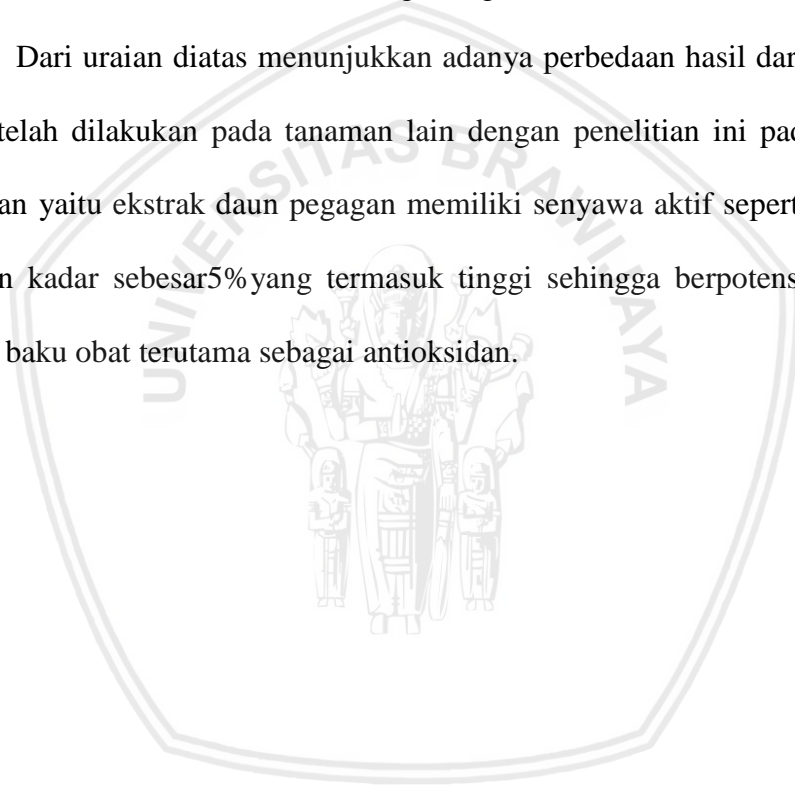
pegagan yang dapat menurunkan aktivitas ROS. Ekstrak etanol daun pegagan mengandung beberapa senyawa antara lain flavonoid sebagai antiinflamasi dan antioksidan (Wang *et al*, 2017). Flavonoid bekerja dengan cara sebagai agen antiinflamasi dengan menekan ekspresi sitokin proinflamasi, dan menekan produksi ROS (*Reactive oxygen species*). Flavonoid dapat menghambat beberapa sitokin proinflamasi diantaranya TNF- α , IL-1 β dan IL-6. Flavonoid dapat menghambat aktivasi dari NFK β yang disebabkan karna tingginya kadar ROS, turunya aktivitas NF-K β oleh senyawa flavonoid dalam ekstrak etanol daunpegagan akan menyebabkan adanya penurunan pada ekspresi TNF- α . Turunya NF-K β akan menstimulasi regenerasi sel pada tubulus yang mengalami nekrosis sehingga ekspresi TNF- α pada tubulus ginjal menurun (Evina,2011).

Pada penelitian ini dilakukan uji kuantitatif kadar flavonoid (kuersetin) ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica*) dan didapatkan hasil sebesar 5% yang berarti terdapat 5 gram kuersetin flavonoid dalam 100 gram ekstrak etanol daun pegagan. Hasil penelitian Anwar, dkk (2017) menunjukkan bahwa kadar rata-rata kuersetin flavonoid pada ekstrak etanol daun binjai adalah 3,99%, yang berarti setiap 100 gram ekstrak mengandung 3,99 gram kuersetin flavonoid dan telah dibuktikan dapat menurunkan kadar glukosa darah pada hewan tikus model DM. Sedangkan penelitian uji kadar flavonoid (kuersetin) pada umbi bawang tiwai sebesar 2,41 % (Supriningrum dkk, 2017).

Berbeda dengan penelitian Nugraha, A dan Ghozali (2012) dan Noer (2017), Mirna Lumbessy dkk (2015) mengidentifikasi kandungan flavonoid

dari beberapa daun yaitu daun waru, ketepeng, rumput teki dan rumput mutiara. Kadar flavonoid tertinggi sebesar 26,863 mg/ml pada daun ketepeng dan yang terendah sebesar 1,425 mg/ml pada daun waru. Flavonoid total pada ekstrak etanolik daun benalu mangga diperoleh dengan cara memasukkan nilai absorbansi pada kurva standar kuersetin dan didapatkan hasil senyawa flavonoid total sebesar 2,48% dihitung sebagai kuersetin (Yulianti, 2013).

Dari uraian diatas menunjukkan adanya perbedaan hasil dari penelitian yang telah dilakukan pada tanaman lain dengan penelitian ini pada tanaman pegagan yaitu ekstrak daun pegagan memiliki senyawa aktif seperti flavonoid dengan kadar sebesar 5% yang termasuk tinggi sehingga berpotensi sebagai bahan baku obat terutama sebagai antioksidan.



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka didapatkan kesimpulan yaitu:

1. Pemberian ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica*) menurunkan ekspresi Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) organ ginjal dengan dosis terbaik 150 mg/kg BB pada tikus model DM.
2. Pemberian ekstrak etanol daun pegagan (*C. asiatica*) meningkatkan kadarenzim superoksida dismutase (SOD) dengan dosis efektif sebesar 150 mg/kg BB pada tikus model DM.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah didapatkan, perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai kandungan dan aktivitas kadar antioksidan dari ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) yang berpengaruh terhadap peningkatan aktivitas enzim SOD dan penurunan ekspresi TNF- α organ ginjal pada tikus model DM.

DAFTAR PUSTAKA

- Adiyati PN. 2011. *Ragam Jenis Ektoparasit pada Hewan Coba Tikus Putih (Rattus norvegicus) Galur Sprague Dawley*. [Skripsi]. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi sebagai Bahan Antiinfertilitas*. Edisi 1. Adabia Press. Jakarta ISBN: 978-602-19751-7-6
- Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi MR, Jamshadi, Farhangi A, *et al.* 2007. *Induction of Diabetes by Streptozotocin in Rats*. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 22(2):60-64.
- Alvarez JG. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.* 8: 338- 348.
- Anita, D. C. 2015. Kadar Glukosa Darah dan Malondialdehid Ginjal Tikus Diabetes yang Diberi Latihan Fisik. *Muhammadiyah Journal of Nursing* 1(2): 109-116
- Anwar, K., Fadlillaturrahmah, dan D. P. Sari. Analisis Kandungan Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Binjai (*Magifera caesia*) dan Pengaruhnya terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus yang diinduksi Fruktosa-Lemak Tinggi. *Jurnal Ilmiah Sina*, 2 (1), 20-30
- Ardian, R., Aulanni'am dan P. Sasangka. 2013. Potensi Ekstrak Rumpun Laut Coklat (*Sargassum prismaticum*) untuk Meningkatkan Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) dan Gambaran Histologi Jaringan Hepar pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Diabetes Mellitus Tipe 1. *Kimia Student Journal* 2 (1): 414-420
- Banfield Pet Hospital. 2016. *State of Pet Health 2016 Report*. Banfield Pet Hospital. USA. 2-13
- Batutihe, D.N. 2010. Efek Ekstrak Rumpun Laut Coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) terhadap Profil Radikal Bebas dan Protein Kinase C Paru Tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar Benzo(A)piren [Thesis]. Universitas Brawijaya Malang.
- Ble-Castillo, J. L., M. A. Aparicio-Trapala, I. E. Juarez-Rojop, J. E. Torres-Lopez, J. D. Mendez, H. Aguilar-Mariscal, V. Olvera-Hernandez, L. C. Palma-Cordova dan J. C. Diaz-Zagoya. 2012. Differential Effects of High-Carbohydrate and High-Fat Diet Composition on Metabolic Control and Insulin Resistance in Normal Rats. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9: 1663-1676

- Breyer, M.D., E. Bottinger, F.C. Brosius, T.M. Coffman, R.C. Harris, C.W. Heilig and K. Sharma. 2005. Mouse Models of Diabetic Nephropathy. *JASN* January 1, 2005 vol. 16 no. 127
- Catchpole, B., J. M. Ristic, L. M. Fleeman dan L. J. Davison. 2005. Canine Diabetes Mellitus: Can Old Dogs Teach Us New Tricks. *Diabetologia* 48(10): 1948-1956
- Coelho D. F., L. O. Pereira-Lancha, D. S. Chaves, D. Diwan, R. Ferraz, P. L. Campos-Ferraz, J. R. Poortmans dan A. H. L. Junior. 2011. Effect of High-Fat Diets on Body Composition, Lipid Metabolism and Insulin Sensitivity, And the Role of Exercise on These Parameters. *Braz J Med Biol Res* 44(10): 966-972
- Cohen dan Bonta. 2004. *Copendium : an Inflammatory Disease*. Medical Word Bussiness Press.
- Dalimartha, S. 2000. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia 2*. Jakarta: Trubus Agriwidya.
- Depkes [Dinas Kesehatan]. 2005. *Pharmaceutical Care untuk Penyakit Diabetes Melitus. Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik*. Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan. Departemen Kesehatan RI. Jakarta. 10-13
- El-Soud, N.H.A., M.Y. Khalil, J.S. Hussein, F.S.H. Oraby, and A.R.H. Farrag. 2007. Antidiabetic of Fenugreek Alkaloid Extract in Streptozotocin Induced Hyperglycemic Rats. *Journal of Applied Sciences Research*, Vol 3(10): 1073-1083.
- Eleazu, C.O., K. E. Eleazu, S. Chukwuma dan U. N. Essien. 2013. Review of The Mechanism of Cell Death Resulting from Streptozotocin Challenge in Experimental Animals, Its Practical Use and Potential Risk to Humans. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. 12:60
- Etuk, E.U. 2010. Animals Models for Studying Diabetes Mellitus. *Agric. Biol. J. N. Am.* 1(2): 130-134
- Evina, 2011. Uji Efektifitas Ekstrak Kelopak Rossela (*Hibiscus sabdariffa* L) Terhadap Penurunan Kadar Kolesterol Serum Darah Ayam Broiler. Jurusan Kimia FMIPA UNIMED. Medan
- Fatimah, R.N. 2015. Diabetes Melitus Tipe 2. *J Majority*. Vol 4. No. 5
- Gao, Z., X. Zhang, A. Zuberi, D. Hwang, M. J. Quon, M. Lefevre, dan J. Ye. 2004. Inhibition of Insulin Sensitivity by Free Fatty Acids Requires Activation of Multiple Serine Kinases in 3T3-L1 Adipocytes. *Molecular Endocrinology* 18(8):2024–2034

- Gardner D, and Sholback D. 2007. Greenspans *Basic and Clinical Endocrinology 8th Edition*. USA:Mc.Graw-Hill.
- Garlanda, C, Dinarello C.A, Mantovani A, 2014. The Interleukin-1 Family: Back To the Future. PMC
- Green, E.A. dan R.A. Flavell. 2000. The temporal Importance of TNF- α Expression in the Development of Arthritis Reumatoid. *Journal immunity* 12: 459-469
- Gross J.L., L.H. Canani, M.L. Caramori. 2005. Diabetic Nephropathy : Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care*. 28:164-175
- Hakim, Arif Luqmanul. 2010. Potensi Beberapa Bentuk Sediaan Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) Terhadap Gambaran Histologis dan Kadar Antioksidan Pankreas Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Aloksan. Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang.
- Halliwell, B. and M. Whiteman. 2004. Measuring Reactive Species and Oxidative Damage in Vivo and in Cell Culture: How should you do it and what do the results mean? *Br. Journal Pharmacol* 142: 231-255.
- Heyne, K.1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia* Jilid III. Terjemahan Badan Litbang Kehutanan. Jakarta: Yayasan Sarana Wana Jaya.
- Holmes, A., L. J. Coppey, E. P. Davidson, dan M. A. Yorek. 2015. Rat Models of Diet Induced obesity and High Fat/Low Dose Streptozotocin Type 2 Diabetes: Effect of Reversal of High Fat Diet Compared to Treatment with Enalapril or Menhaden Oil on Glucose Utilization and Neuropathic Endpoints. *Journal of Diabetes Research*. 2015:8
- Hurrle, S. and W. H. Hsu. 2017. The Etiology of Oxidative Stress in Insulin Resistance. *Biomedical Journal* 40 (2017) 257-262
- Immunostar, 2010. *Immunohistochemistry Instruction Manual*. Wisconsin: Immunostar, Inc.
- Indranila, K.S. 2013. *Aspek Biomolekuler Apoptosis, Caspase-3 & RAK pada Pemberian Morinda Citrifolia L (Mengkudu) Tikus Sprague Dawley Diabetes Nefropati yang diinduksi Streptozotocin (STZ)*. Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi Semarang. Med Hosp 2013; vol 1 (3) : 150-158
- Islas-Andrade, S., M. C. R. Monsalve, J. E. de la Pena, A. C. Polanco, M. A. Palomino, dan A. F. Velasco. 2000. Streptozotocin and Alloxan in Experimental Diabetes: Comparison of Two Model in Rats. *Acta Histochem Cytochem* 33(3): 201-208

- Johnson-Delaney, C. A. dan L. R. Harrison.1996. *Exotic Companion Medicine Handbook for Veterinarians, Volume 1*. Zoological Education Network
- Kamble, P.M., S.C. Choudhari, and A.S. Yadav. 2015. Study of Lipid Profile, Oxidative Stress, and Antioxidant Satatus in Type 2 Diabetes Mellitus. *WIMJOURNAL*. Vol. 2(1).
- Kanwar, Y.S., J.Wada, L. Sun, P. Xie, W. Elisabeth. 2012. Diabetic Nephropathy: Mechanisms of Renal Disease Progression. *Experimental and Biology Medicine*. Vol 223: 4-11
- Kemenkes [Kementerian Kesehatan] RI. 2014. *Info Datin: Situasi dan Analisis Diabetes*. Pusat Data dan Informasi. Kementerian Kesehatan RI. Jakarta Selatan. 1-5
- King, A. J. F. 2012. The Use of Animal Models in Diabetes Research. *British Journal of Pharmacology*. 166: 877-894
- Kumar, MH Veerendra and YK Gupta. 2003. *Effect of Centella asiatica on Cognition and Oxidative Stress in an Intracerebroventricular Streptozotocin Model of Alzheimer's Disease in Rats*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 30: 336-342
- Kristanti, A.N. 2010. *Potensi Ekstrak Daun Pegagan (Centella asiatica L.) Urban) Dosis Tinggi Sebagai Antifertilitas Pada Mencit (Musmusculus) Betina*. [Online]. Tersedia <http://lib.uin-malang.ac.id/thesis/fullchapter/06520048-ari-nur-kristanti.pdf>. [27 September 2018]
- Kusumastuty, I., E. Falahia, P. Adi. 2014. Pengaruh Daun Ubi Jalar Ungu terhadap Kadar Superoksid Dismutase Tikus yang dipapar Asap Rokok. *Indonesian Journal of Human Nutrition* Vol. 1 No. 2 : 128-134
- Lasmadiwati, E.M., M. Herminati, dan Y.H. Indriani. 2004. Pegagan Meningkatkan Daya Ingat, Membuat Awet Muda, Menurunkan Gejala Stress dan Meningkatkan Stamina. Seri Agrisehat. Penerbit Penebar Swadaya, Jakarta. II + 69 hlm.
- McCann, T. M., K. E. Simpson, D. J. Shaw, J. A. Butt dan D. A. Gunn-Moore. 2007. Feline Diabetes Mellitus in the UK: The Prevalence Within an Insured Cat Population and A Questionnaire-Based Putative Risk Factor Analysis. *J Feline Med Surg* 9(4): 289-299
- Mirna, L., J. Abidjulu, J. Jessy, E. Paendong. 2015. Uji Total Flavonoid Pada Beberapa Tanaman Obat Tradisional Di Desa Waitina Kecamatan Mangoli Timur Kabupaten Kepulauan Sula Provinsi Maluku Utara. *Jurnal MIPA UNSRAT Online*, 2, 50-55
- Mohanty, S. 2012. *Role of Biochemical Markers for Evaluation of Oxidative Stress in Senile Cataract*. 2(2).

- Mythilli MD, Vyas R, Akila G, dan Gunaserkaran S. 2004. *Effect of Streptozotocin on the Ultrastucture of Rat Pancreatic Islet*. *Microscopy Research and Technique*. 63: pp274-281.
- Noer, S., R. D. Pratiwi, dan E. Gresinta. 2017. Penetapan Kadar Senyawa Fitokimia (Tanin, Saponin dan Flavonoid sebagai Kuersetin) pada Ekstrak Daun Ingg (*Ruta angustifolia L.*). *Jurnal Ilmu-ilmu MIPA* (19-29)
- Nugraha, Andika dan Ghozali. Penetapan kadar flavonoid kuersetin ekstrak kulit Buah apel hijau (*Pyrus malus l.*) dengan menggunakan Metode kromatografi cair kinerja tinggi. <http://thesis.umy.ac.id/datapublik/t34235.pdf>, Diakses tanggal 7 Februari 2019
- Nugroho, F. A., R. M. S. Ginting, dan Nurdiana. 2015. Kadar NF-K β Pankreas Tikus model Type 2 Diabetes Melitus dengan Pemberian Tepung Susu Sapi. *Indonesian Journal of Human Nutrition*. Vol. 2. 2: 91-100
- Nurhasanah, F. dan Syamsudin. 2005. Efek Antioksidan dari Ekstrak Biji Petai Cina (*Laucaena leucocephala L.*) pada Tikus Putih. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* 3(1): 13-16
- PERKENI [Perkumpulan Endokrinologi Indonesia]. 2015. Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia. Pengurus Besar Perkumpulan Endokrinologi Indonesia. 14-51
- Popa, C., M.G. Netea, M. Van der Meer, J.W.A. Stalenhoef. 2007. The Role of TNF- α in Chronic Inflammatory Conditions, Intermediary Metabolism, and Cardiovascular Risk. *J Lipid Res* 48:751-762
- Ragheb, R., dan A. M. Medhat. 2011. Mechanisms of Fatty Acid-Induced Insulin Resistance in Muscle and Liver. *J Diabetes Metab* 2:127
- Ramadhani, D., I. Kurnia, S. Soetopo, D.Tetrian, I. Ramli, Budiningsih, Andrijono, T. Kurjana, M.D.L Tobing. 2012. *Analisis Serta Stitiching Citra Imunohistokimia MB-1 Dengan Immunoratio dan Perangkat Lunak Nish Element*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta
- Ramos-Vara, J.A. 2005. Technical Aspect of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. 42:405-426.
- Raza H, and John A. 2013. *Streptozotocin-Induced Cytotoxicity, Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Human Hepatoma HepG2 Cells*. *Int. J. Mol. Sci*, 13, 5751-5767.
- Regensteiner, J. G., J. E. B. Reusch, K. J. Stewart, dan A. Veves. 2009. *Diabetes adn Exercise*. New York: Humana Press. Hal 16-19
- Skovso, S. 2014. Modeling Type 2 Diabetes in Rats Using High Fat Diet and Streptozotocin. *Journal of Diabetes Investigation*. 5: 349-358

- Srinivasan, K., B. Viswanad, L. Asrat, C. L. Kaul dan P. Ramarao. 2005. Combination of High-Fat Diet-Fed and Low-Dose Streptozotocin-Treated Rat: A Model for Type 2 Diabetes and Pharmacological Screening. *Pharmacological Research* 52: 313-320
- Sujaya, I N. 2009. Pola Konsumsi Makanan Tradisional Bali sebagai Faktor Risiko Diabetes Melitus Tipe 2 di Tabanan. *Jurnal Skala Husada* 6(1): 75-81
- Sumardika, I.W., dan Jawi. 2011. Ekstrak Air Daun Ubijalar Ungu Memperbaiki Profil Lipid dan Meningkatkan Kadar SOD Darah Tikus Yang Diberi Makanan Tinggi Kolesterol. *Jurnal Ilmiah Kedokteran* 43 (2): 67-70.
- Supriningrum, R., H. Nurhasnawati, dan M. Putri. 2017. Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Umbi Bawang Tiwai (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) Berdasarkan Ukuran Serbuk Simplisia. *Media Sains*, Volume 10 No 1
- Sutardi. 2016. Kandungan Bahan Aktif Tanaman Pegagan dan Khasiatnya untuk Meningkatkan Sistem Imun Tubuh. *Jurnal Litbang Pertanian* Vol. 35 No. 3 : 121-130
- Szkudelski, T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res.* 50: 536-546
- Ventura, S. J., V. D. Boone-Villa, C. N. Aguilar, R. Román-Ramos, E. Vega-Ávila, E. Campos-Sepúlveda, dan F. Alarcón-Aguilar. 2011. Effect of Varying Dose and Administration of Streptozotocin on Blood Sugar in Male CD1 Mice. *Proc West Pharmacol Soc* 2011, 54:5-9
- Wang, J., Mi H., Jie Y., Xinhua Ma, Sijian Z., Shihao D., Yun H., Xinzhou Y., & Ping Z. 2017. Anti-diabetic Activity of Stigmasterol from Soybean Oil by Targeting the GLUT4 Glucose Transporter. *Food & Nutrition Research*, 61(1)
- WHO [World Health Organization]. 2016. *Global Report on Diabetes*. World Health Organization Library Catalog. 21-25
- Wijayakusuma, H., A.S. Wirian, T. Yaputra, S. Dalimartha, dan B. Wibowo. 1994. *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia*. Jilid 1. Pustaka Kartini, Jakarta.
- Wild, S., G. Roglic, A. Green, R. Sicree, and H.King. 2004. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. May. Vol 27 (5) :1047-1453
- Winarsi, Hery. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas; Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.

- Winarto, W.R. dan M. Surbakti. 2003. *Khasiat dan Manfaat Pegagan*. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Wirryana, M. 2008. *Penerapan Terapi Insulin Intensif terhadap SOD, TNF- α dan IL-6 pada Penderita Kritis dengan Hiperglikemia*. Pasca S3 Universitas Udayana: Denpasar.
- Wright, E., J.L. Bacon, and L.C. Glass. 2006. Oxidative Stress in Type 2 Diabetes: The Role of Fasting and Postprandial Glycaemia. *Int J Clint Pract.* 60(3): 308-314
- Wu, J., dan L. J. Yan. 2015. Streptozotocin Induced Type 1 Diabetes in Rodents as A Model for Studying Mitochondrial Mechanisms of Diabetic β Cell Glucotoxicity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy.* 8:181-188
- Yoon, K.K., Y.O. Sun, G.J. Seong, W.P. Heung, Y.I. Soo, Y.C. Eun, B. Boram, S.L. Hyun, H.O. Min, S.K. You, H.K. Jong, S.G. Young, H.C. Sang, U.M. Kyung, Y.K. You, and Z. Zhu. 2008. Airway Exposure Levels of Lipopolysaccharide Determine Type 1 Versus Type 2 Experimental Asthma. *The Journal of Immunology* 178:5375-5382
- Yulianti, R., A. Dahlia, dan A. R. Ahmad. 2013. Penetapan Kadar Flavonoid Total dari Ekstrak Etanolik Daun Benalu Mangga. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, Vol 1. No. 1
- Zhang, M., Xiao-Y. Lv, J. Li, Zhi-G. Xu dan L. Chen. 2008. The Characterization of High-Fat Diet and Multiple Low-Dose Streptozotocin Induced Type 2 Diabetes Rat Model. *Exp Diabetes Res* 2008: 704045

LAMPIRAN



Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 927-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 : PEMANFAATAN EKSTRAK DAUN PEGAGAN
TERHADAP KADAR MALONDIALDEHID DAN
AKTIVITAS SUPEROXIDE DISMUTASE PADA TIKUS
MODEL DIABETES MELLITUS TIPE II

PENELITI : FIDIA HESTIKASARI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 26 Februari 2018
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



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

Lampiran 2. Determinasi Tanaman Pegagan



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU
 Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396
KOTA BATU 65313

Nomor : 074/391A/ 102.7/ 2018
 Sifat : Biasa
 Perihal : Determinasi Tanaman Pegagan

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : AULIA AZKA S.K
 NIM : 155130101111067
 Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

1. Perihal determinasi tanaman pegagan

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
 Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
 Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
 Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
 Kelas : Dicotyledonae
 Bangsa : Umbellales
 Suku : Umbelliferae
 Marga : Centella
 Jenis : *Centella asiatica* (Linn). Urban.
 Sinonim : *Hydrocotyle asiatica* Linn. = *Pasequinus* Rumph.
 Nama Daerah : Pegagan, gagan-gagan, rendeng, kerok batok (Jawa), daun kaki kuda (Indonesia), pegaga (Ujung Pandang), antanan gede, antanan rambat (Sunda), dau tungke (Bugis), kos tekosan (Madura), kori-kori (Halmahera).

Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-16a-239b-243b-244b-248b- 249b-250b-266b-267a-268a-269a-2b-3.

2. Morfologi : Pegagan merupakan terna menahun tanpa batang, tetapi dengan rimpang pendek dan stolon-stolon yang merayap dengan panjang 10-80 cm. Akar keluar dari setiap bonggol, banyak bercabang yang membentuk tumbuhan baru. Helai daun tunggal, bertangkai panjang sekitar 5-15 cm berbentuk ginjal. Tepinya bergerigi atau beringgit, dengan penampang 1-7 cm tersusun dalam roset yang terdiri atas 2-10 helai daun, kadang-kadang agak berambut. Bunga berwarna putih atau merah muda, tersusun dalam karangan berupa payung, tunggal atau 3-5 bersama-sama keluar dari ketiak daun. Tangkai bunga 5-50 mm. Buah kecil bergantung yang berbentuk lonjong/pipih panjang 2-2.5 mm, baunya wangi dan rasanya pahit.

3. Nama Simplisia : Centellae Folium/ Daun Pegagan.

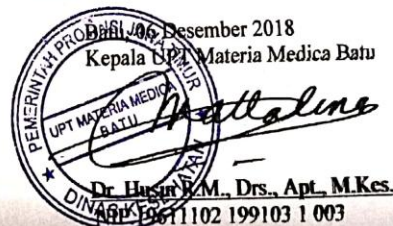
4. Kandungan : Asiaticoside, thankuniside, isothankuniside, madecassoside, brahmoside, brahminoside, brahmic acid, madasiatic acid, meso-inositol, centellose, carotenoids, garam-garam mineral seperti garam kalium, natrium, magnesium, kalsium, besi, vellarine, dan zat samak. Senyawa glikosida triterpenoida yang disebut asiaticoside dan senyawaan sejenis, mempunyai kasiat anti lepra. Daun kaki kuda mengandung senyawa glikosida trigergenoidea, alkaloid hidrokotilin, steroid, tanin, minyak atsiri, gula pereduksi dan garam-garam mineral seperti garam kalium, natrium, magnesium, kalsium dan besi.

5. Penggunaan : Penelitian

6. Daftar Pustaka

- Anonim. 1977. *Materia Medica Indonesia "Jilid I"*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Anonim. 2007. *Serial Tanaman Obat "PEGAGAN"*. Badan POM Republik Indonesia.
- Anonim. <http://www.iptek.net.id/pegagan>, diakses tanggal 29 oktober 2010.
- Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Hutapea, Johny Ria. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian Dan Pengembangan
- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.



Lampiran 3. Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Pegagan



**PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU**
Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu
KOTA BATU

65313

Nomor : 074 / 134D / 102.7 / 2018
Sifat : Biasa
Perihal : **Surat Keterangan Analisa Kualitatif**


Bersama ini kami sampaikan hasil analisa berikut ini :

1. Identitas Pemohon
 - Nama : Aulia Azka S.K
 - NIM : 155130101111067
 - Instansi : Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya
 - Alamat Instansi : Malang
 - Nomor Telp. Instansi : -
2. Identitas Sampel
 - Nama daerah sampel : Pegagan
 - Nama latin : *Centella asiatica*
 - Bagian sampel : Daun
 - Bentuk sampel : Serbu
 - Asal sampel : -
 - Tanggal penerimaan : 06 Desember 2018
 - Tanggal pemeriksaan : 06 Desember 2018

3. Hasil

No	Identifikasi Senyawa	Parameter	Hasil
1.	Flavonoid	Merah Bata, Merah Muda, Merah Tua	Positif
2.	Alkaloid		
	Meyer	Endapan Putih	(tidak dilakukan)
	Dragendorf	Endapan Jingga	(tidak dilakukan)
	Bouchardat	Endapan Cokelat	(tidak dilakukan)
3.	Tanin	Hijau Kehitaman, Biru Kehitaman, Coklat Kehitaman	(tidak dilakukan)
4.	Saponin	Busa Permanen	(tidak dilakukan)
5.	Fenol	Hijau Kehitaman, Biru Kehitaman	(tidak dilakukan)

4. Lampiran

Nama Sampel	Flavonoid
Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	

5. Pustaka
 - Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1978. "Materia Medika Indonesia", Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.

Demikian disampaikan untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 06 Desember 2018
Kepala UPT Materia Medica Batu


Dr. Husni RM, Drs., Apt., MKes.
NIP. 19611102 199103 1 003



Lampiran 4. Uji Kuantitatif Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Pegagan



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU
Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu
KOTA BATU

65313

Nomor : 074 / 09D / 102.7 / 2019
Sifat : Biasa
Perihal : **Surat Keterangan Analisa KLT Kuantitatif**

Bersama ini kami sampaikan hasil analisa berikut ini :

1. Identitas Pemohon

Nama : Aulia Azka Suradi K.
NIM : 155130101111067
Instansi : Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya
Alamat Instansi : Malang
Nomor Telp. Instansi : -

2. Identitas Sampel

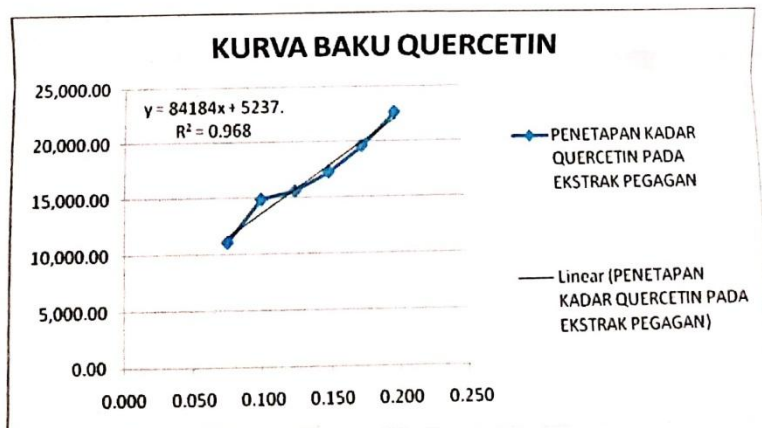
Nama daerah sampel : Pegagan
Nama latin : *Centella asiatica*
Bagian sampel : Daun
Bentuk sampel : Ekstrak
Pelarut : Etanol 96%
Asal sampel : UPT Materia Medica Batu
Tanggal penerimaan : 06 Februari 2019
Tanggal pemeriksaan : 06 Februari 2019

3. Kurva Baku

Penimbangan : 10 mg serbuk Quercetin
Jenis Pelarut : Etanol P.A
Volume Pelarut : 50 mL
Konsentrasi Larutan induk : 0.20 µg/µL

Persamaan : $Y = BX + A$
 $A = 84,184.34$
 $B = 5,237.20$
 $R^2 = 0.968$

Kadar (µg/µL)	Luas Area (AUC)
0.075	11,041.60
0.100	14,849.20
0.125	15,553.90
0.150	17,258.40
0.175	19,574.30
0.200	22,597.90

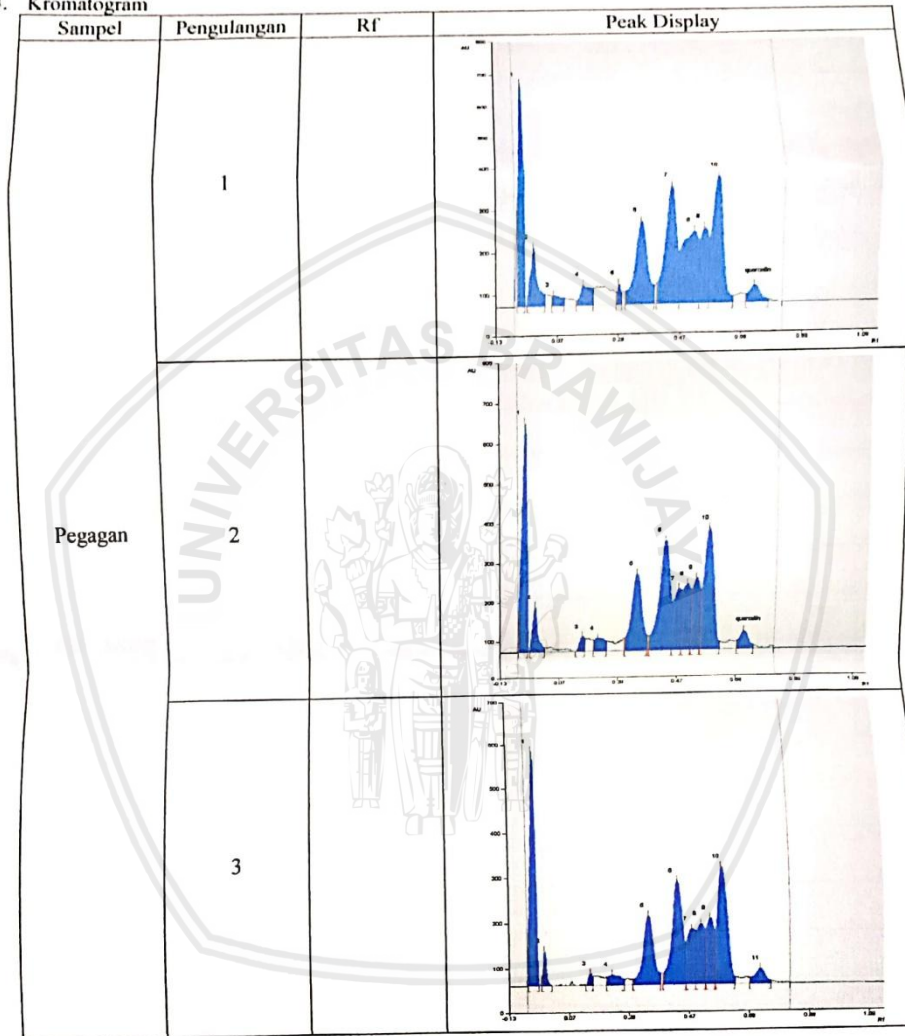




**PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU**
Jalan Labor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu
KOTA BATU

65313

4. Kromatogram



5. Hasil

Sampel	Penimbangan (mg)	Volume Penotolan (μL)	Luas Area (AUC)	Kadar (%)	Rata-rata (%)	SD
Pegagan	1000.00	4.00	1,394.80	0.05	0.05	0.002
	1000.00	4.00	1,292.30	0.05		
	1000.00	4.00	1,107.30	0.05		

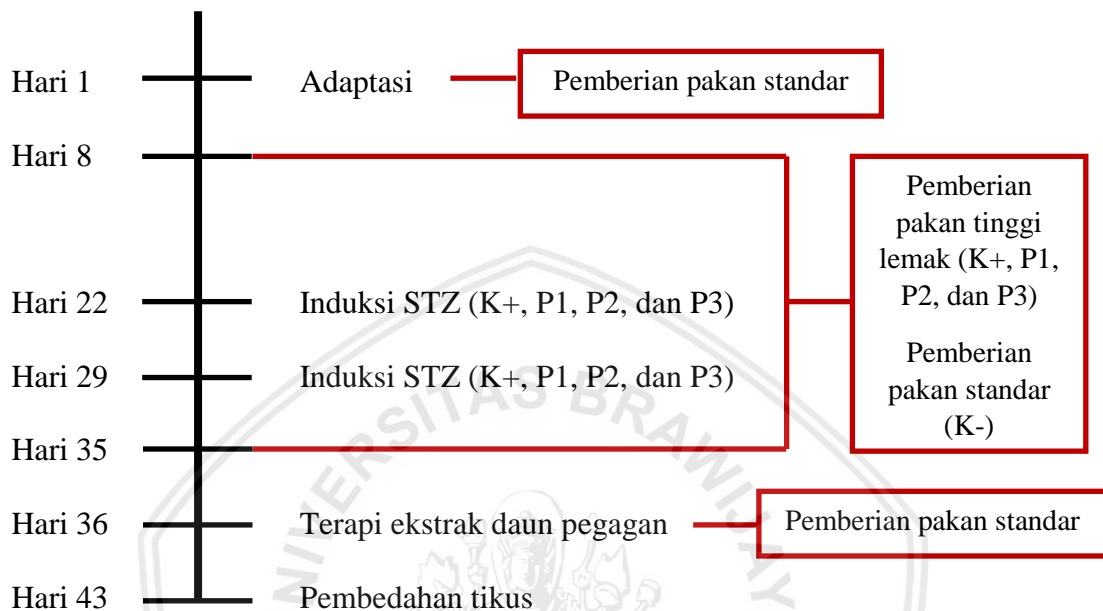
Demikian disampaikan untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 16 Februari 2019
Kepala UPT Materia Medica Batu

Dr. Husin R. K. Ds., Apt., MKes.
KIP 0661102 199103 1 003



Lampiran 3. Rancangan Perlakuan



Keterangan :

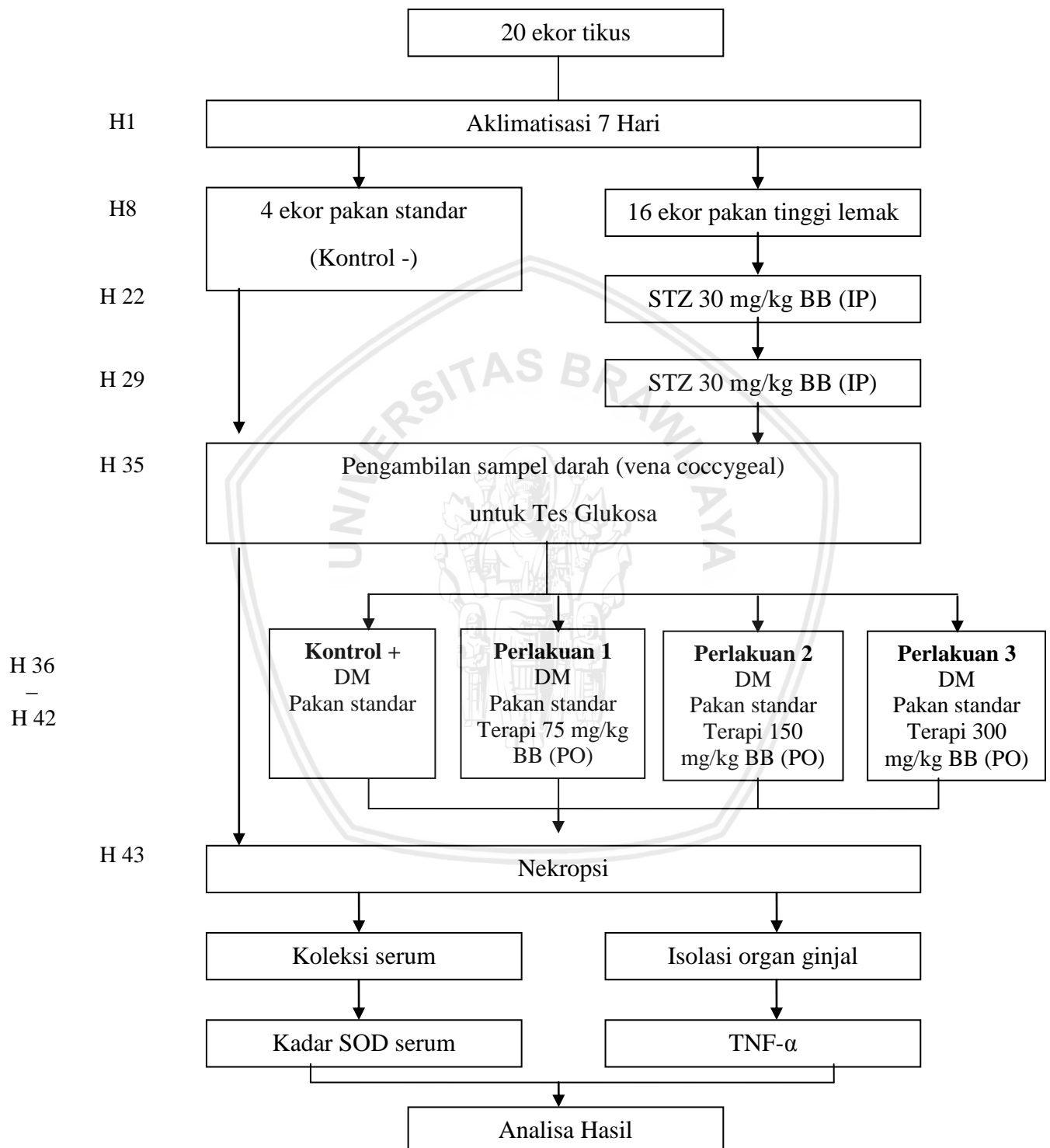
1. Induksi pakan tinggi lemak diberikan sebanyak 40 g/ekor/hari dengan sediaan padat dan pakan standar diberikan sebanyak 40 g/ekor/hari dengan sediaan pellet.
2. Induksi STZ dilakukan secara intraperitoneal dengan dosis 30 mg/kg BB dengan pelarut buffer sitrat pada kelompok kontrol positif (K+), kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), dan kelompok perlakuan 3 (P3).
3. Pada hari ke 36 hingga hari ke 42 dilakukan terapi daun pegagan dengan dosis 75 mg/kg BB pada kelompok perlakuan 1 (P1), 150 mg/kg BB pada

kelompok perlakuan 2 (P2), dan 300 mg/kg BB pada kelompok perlakuan 3 (P3).

4. Pada hari ke 43 dilakukan pembedahan pada semua kelompok untuk mengisolasi organ ginjal guna mengetahui ekspresi TNF- α dan koleksi serum guna melakukan pengukuran SOD.



Lampiran 4. Kerangka operasional



Lampiran 5. Pembuatan Larutan STZ

5.1 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 yang dilarutkan dalam 30 mL aquades steril, kemudian distirer dan diatur pHnya pada 4,5. Selanjutnya dipindah pada labu ukur 50 mL dan ditanda batas dengan aquades, dihomogenkan. Kemudian dipindah pada botol gelap dan disterilisasi dengan autoclave (Sofhia, 2013).

5.2 Pembuatan Larutan Streptozotocin

Dosis STZ yang diberikan yaitu 30 mg/kg BB. Kebutuhan dosis STZ dihitung berdasarkan berat badan masing-masing tikus. STZ diencerkan dengan menggunakan buffer sitrat yang telah dibuat sebelumnya. Streptozotocin sebanyak 500 mg dilarutkan dalam 7.500 μ L buffer sitrat, sehingga dalam 1 μ L buffer sitrat terdapat 0,067 mg STZ.

Rumus Pemberian STZ per ekor per hari =

$$\frac{\frac{BB}{1000} \times \text{dosis} \times 1 \text{ mL}}{0,067 \text{ mg}}$$

Lampiran 6. Hasil Perhitungan Dosis STZ

a. Injeksi STZ Tahap Pertama

Kelompok	Ulangan	BB Tikus (gram)	Dosis STZ (mg/kg BB)	Dosis Injeksi (µL)
K +	U1	144,6	30	64,74
	U2	137,6	30	61,60
	U3	127,3	30	55,99
	U4	136,4	30	61,07
P1	U1	137,5	30	61,56
	U2	179,8	30	80,49
	U3	147,9	30	66,21
	U4	124,6	30	55,78
P2	U1	159,6	30	71,45
	U2	138,4	30	61,96
	U3	156,7	30	70,15
	U4	137	30	61,33
P3	U1	145,5	30	65,14
	U2	164	30	73,42
	U3	143,7	30	64,33
	U4	138,3	30	61,92

b. Injeksi STZ Tahap Kedua

Kelompok	Ulangan	BB Tikus (gram)	Dosis STZ (mg/kg BB)	Dosis Injeksi (µL)
K +	U1	154,6	30	69,21
	U2	139,3	30	62,36
	U3	129,4	30	57,93
	U4	137,1	30	61,38
P1	U1	138,5	30	62,01
	U2	182	30	81,48
	U3	155,2	30	69,48
	U4	131,7	30	58,96
P2	U1	166,2	30	74,40
	U2	143,3	30	64,15
	U3	162	30	72,53
	U4	139,1	30	62,27
P3	U1	148,2	30	66,35
	U2	164,8	30	73,78
	U3	144,2	30	64,56
	U4	139,7	30	62,54

Lampiran 7. Perhitungan Dosis Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica*)

Dosis eksperimental ditentukan berdasarkan penelitian Andriani (2014) yang menggunakan ekstrak seledri (*Apium graveolens L.*), berdasarkan kekerabatannya dalam satu family umbelliferae, peneliti berasumsi bahwa daun pegagan memiliki kandungan kimia yang relatif sama dengan daun seledri. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 75 mg/kg BB, 150 mg/kg BB, 300 mg/kg BB.

Perhitungan dosis ekstrak dengan asumsi rata-rata berat badan tikus adalah 150 gram, terdapat 4 ekor tikus dalam tiap kelompok serta tiap ekor tikus disonde dengan ekstrak sebanyak 1 mL adalah sebagai berikut :

➤ **Kelompok p1 (Dosis terapi 75mg/kg BB)**

$$\begin{aligned}
 \text{Berat ekstrak daun pegagan} &= \text{Dosis pemberian} \times \text{BB} \times \text{Jumlah tikus} \\
 &= 75 \text{ mg/kg} \times 150 \text{ g} \times 4 \\
 &= \frac{75 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 600 \text{ g} \\
 &= 45 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

➤ **Kelompok P2 (Dosis terapi 150 mg/kg BB)**

$$\begin{aligned}
 \text{Berat ekstrak daun pegagan} &= \text{Dosis pemberian} \times \text{BB} \times \text{Jumlah tikus} \\
 &= 150 \text{ mg/kg} \times 150 \text{ g} \times 4 \\
 &= \frac{150 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 600 \text{ g} \\
 &= 90 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

➤ **Kelompok P3 (Dosis terapi 300 mg/kg BB)**

Berat ekstrak daun pegagan = Dosis pemberian x BB x Jumlah tikus

$$= 300 \text{ mg/kg} \times 150 \text{ g} \times 4$$

$$= \frac{300 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 600 \text{ g}$$

$$= 180 \text{ mg}$$



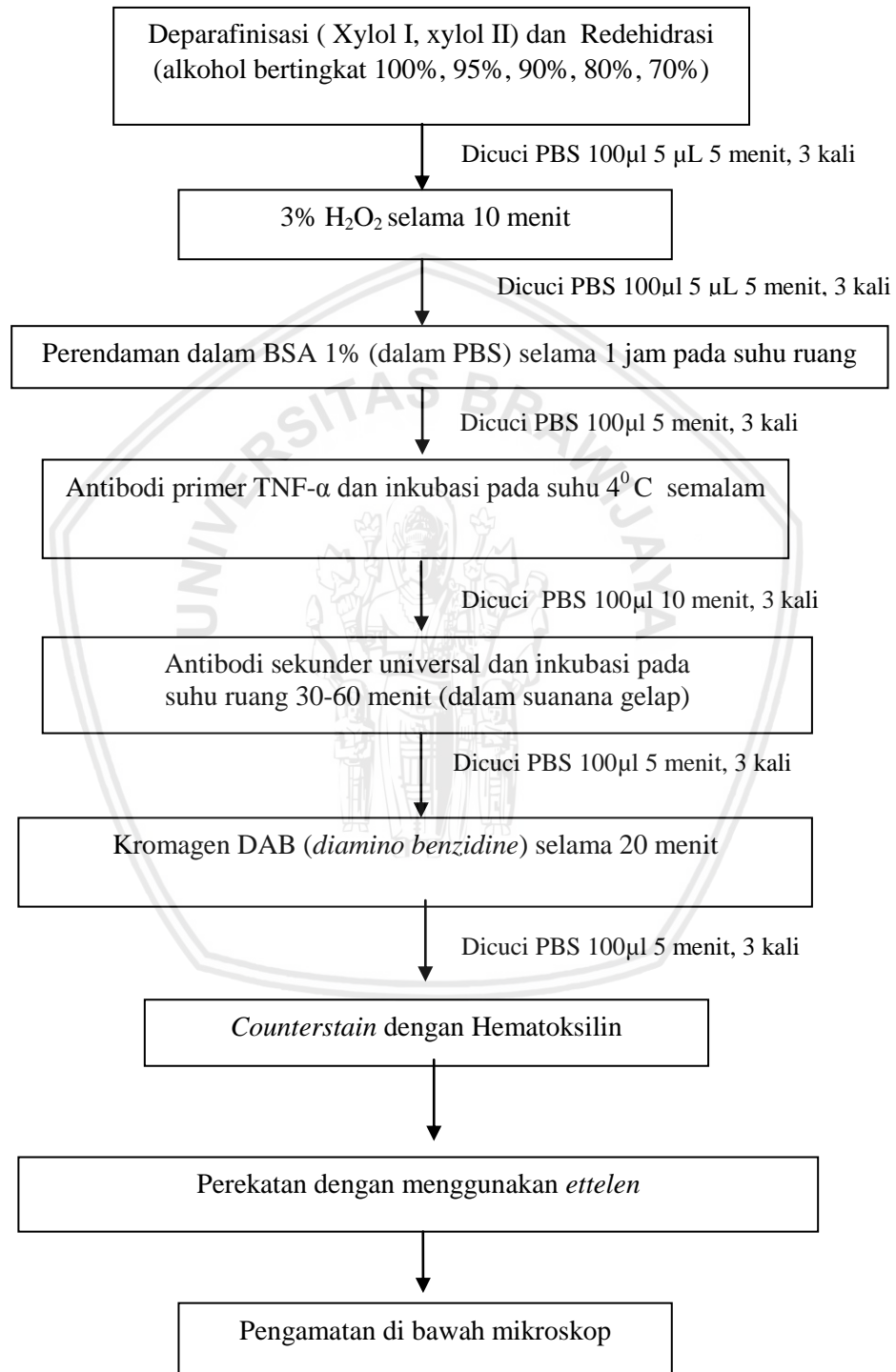
Lampiran 8. Hasil Tes Glukosa

8.1 Setelah induksi pakan tinggi lemak dan STZ

Perlakuan	Ulangan				Rata-rata
	1	2	3	4	
P1	227	359	225	211	255.5
P2	369	334	210	209	280.5
P3	358	345	275	479	364.25
K -	82	77	108	98	91.25
K +	294	239	473	378	346

8.2 Setelah terapi ekstrak pegagan

Perlakuan	Ulangan				Rata-rata
	1	2	3	4	
P1	167	181	149	151	162
P2	178	164	158	138	159.5
P3	185	177	169	197	182
K -	93	109	87	94	95.75
K +	206	376	425	348	338.75

Lampiran 9. Analisis Ekspresi TNF- α Ginjal Dengan Metode IHK

Lampiran 10. Uji Statistika SOD

Perlakuan	Hasil SOD (unit/100 μ L)	Rata-rata
Kontrol negatif (normal) 1	59,64	58,67
Kontrol negatif (normal) 2	56,58	
Kontrol negatif (normal) 3	59,37	
Kontrol negatif (normal) 4	59,10	
Kontrol positif (sakit) 1	40,63	36,52
Kontrol positif (sakit) 2	31,53	
Kontrol positif (sakit) 3	36,52	
Kontrol positif (sakit) 4	37,39	
Perlakuan 1 (dosis 75 mg/kg BB) 1	53,42	52,10
Perlakuan 1 (dosis 75 mg/kg BB) 2	52,07	
Perlakuan 1 (dosis 75 mg/kg BB) 3	52,10	
Perlakuan 1 (dosis 75 mg/kg BB) 4	50,81	
Perlakuan 2 (dosis 150 mg/kg BB) 1	60,09	57,87
Perlakuan 2 (dosis 150 mg/kg BB) 2	55,23	
Perlakuan 2 (dosis 150 mg/kg BB) 3	58,29	
Perlakuan 2 (dosis 150 mg/kg BB) 4	57,87	
Perlakuan 3 (dosis 300 mg/kg BB) 1	50,36	48,50
Perlakuan 3 (dosis 300 mg/kg BB) 2	48,50	
Perlakuan 3 (dosis 300 mg/kg BB) 3	48,92	
Perlakuan 3 (dosis 300 mg/kg BB) 4	46,22	

10.1 Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Perlakuan	SOD
N		20	20
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	3,0000	50,7312
	Std. Deviation	1,45095	8,47428
Most Extreme Differences	Absolute	,155	,146
	Positive	,155	,135
	Negative	-,155	-,146
Test Statistic		,155	,146
Asymp. Sig. (2-tailed)		,200 ^{c,d}	,200 ^{c,d}

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. This is a lower bound of the true significance.

10.2 Uji Deskriptif

Descriptives

SOD

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K-	4	58,6713	1,41353	,70676	56,4220	60,9205	56,58	59,64
K+	4	36,5167	3,76529	1,88264	30,5253	42,5081	31,53	40,63
P1	4	52,1020	1,06656	,53328	50,4049	53,7991	50,81	53,42
P2	4	57,8677	2,00824	1,00412	54,6721	61,0632	55,23	60,09
P3	4	48,4983	1,71773	,85887	45,7650	51,2316	46,22	50,36
Total	20	50,7312	8,47428	1,89491	46,7651	54,6973	31,53	60,09

10.3 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

SOD

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,967	4	15	,454

10.4 Uji Anova

ANOVA

SOD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1291,565	4	322,891	66,448	,000
Within Groups	72,890	15	4,859		
Total	1364,455	19			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: SOD

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	K+	22,15458*	1,55874	,000	17,3413	26,9678
	P1	6,56925*	1,55874	,006	1,7560	11,3825
	P2	,80357	1,55874	,984	-4,0097	5,6168
	P3	10,17293*	1,55874	,000	5,3597	14,9862
K+	K-	-22,15458*	1,55874	,000	-26,9678	-17,3413
	P1	-15,58533*	1,55874	,000	-20,3986	-10,7721
	P2	-21,35100*	1,55874	,000	-26,1643	-16,5377
	P3	-11,98165*	1,55874	,000	-16,7949	-7,1684
P1	K-	-6,56925*	1,55874	,006	-11,3825	-1,7560
	K+	15,58533*	1,55874	,000	10,7721	20,3986
	P2	-5,76568*	1,55874	,016	-10,5789	-,9524
	P3	3,60368	1,55874	,195	-1,2096	8,4169
P2	K-	-,80357	1,55874	,984	-5,6168	4,0097
	K+	21,35100*	1,55874	,000	16,5377	26,1643
	P1	5,76568*	1,55874	,016	,9524	10,5789
	P3	9,36935*	1,55874	,000	4,5561	14,1826
P3	K-	-10,17293*	1,55874	,000	-14,9862	-5,3597
	K+	11,98165*	1,55874	,000	7,1684	16,7949
	P1	-3,60368	1,55874	,195	-8,4169	1,2096
	P2	-9,36935*	1,55874	,000	-14,1826	-4,5561

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

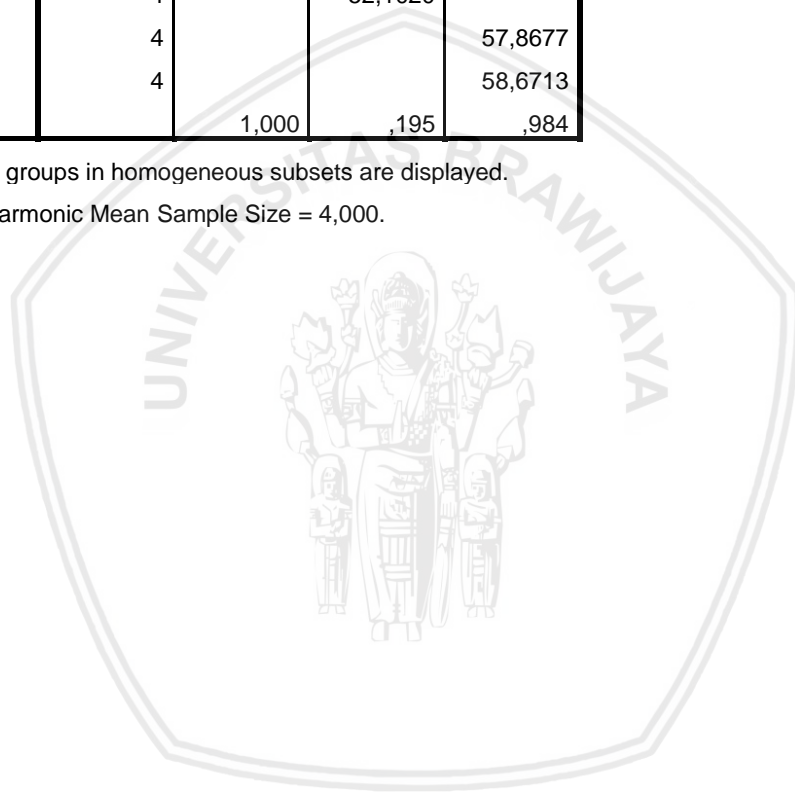
10.5 Uji Tukey

SODTukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
K+	4	36,5167		
P3	4		48,4983	
P1	4		52,1020	
P2	4			57,8677
K-	4			58,6713
Sig.		1,000	,195	,984

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.



Lampiran 11. Uji Statistika TNF- α

Perlakuan	TNF α (%)	Rata-rata
Kontrol negatif (normal) 1	10,32	14,77
Kontrol negatif (normal) 2	14,46	
Kontrol negatif (normal) 3	14,77	
Kontrol negatif (normal) 4	19,54	
Kontrol positif (sakit) 1	71,99	71,99
Kontrol positif (sakit) 2	76,32	
Kontrol positif (sakit) 3	61,06	
Kontrol positif (sakit) 4	78,60	
Perlakuan 1 (dosis 75 mg/kg BB) 1	55,22	54,05
Perlakuan 1 (dosis 75 mg/kg BB) 2	54,05	
Perlakuan 1 (dosis 75 mg/kg BB) 3	58,80	
Perlakuan 1 (dosis 75 mg/kg BB) 4	48,14	
Perlakuan 2 (dosis 150 mg/kg BB) 1	27,12	27,72
Perlakuan 2 (dosis 150 mg/kg BB) 2	25,32	
Perlakuan 2 (dosis 150 mg/kg BB) 3	29,94	
Perlakuan 2 (dosis 150 mg/kg BB) 4	28,48	
Perlakuan 3 (dosis 300 mg/kg BB) 1	39,38	44,70
Perlakuan 3 (dosis 300 mg/kg BB) 2	47,40	
Perlakuan 3 (dosis 300 mg/kg BB) 3	47,32	
Perlakuan 3 (dosis 300 mg/kg BB) 4	44,70	

11.1 Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Perlakuan	TNF α
N		20	20
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	3,0000	42,6470
	Std. Deviation	1,45095	20,92496
Most Extreme Differences	Absolute	,155	,128
	Positive	,155	,128
	Negative	-,155	-,089
Test Statistic		,155	,128
Asymp. Sig. (2-tailed)		,200 ^{c,d}	,200 ^{c,d}

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. This is a lower bound of the true significance.

11.2 Uji Deskriptif

Descriptives

TNFalfa

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K-	4	14,7733	3,77056	1,88528	8,7735	20,7731	10,32	19,54
K+	4	71,9933	7,78687	3,89343	59,6027	84,3840	61,06	78,60
P1	4	54,0533	4,42943	2,21471	47,0051	61,1015	48,14	58,80
P2	4	27,7150	1,96858	,98429	24,5826	30,8474	25,32	29,94
P3	4	44,7000	3,76195	1,88097	38,7139	50,6861	39,38	47,40
Total	20	42,6470	20,92496	4,67896	32,8538	52,4402	10,32	78,60

11.3 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

TNFalfa

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,079	4	15	,402

11.4 Uji Anova

ANOVA

TNFalfa

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7981,729	4	1995,432	88,686	,000
Within Groups	337,500	15	22,500		
Total	8319,228	19			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TNFalfa

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	K+	-57,22000*	3,35410	,000	-67,5772	-46,8628
	P1	-39,28000*	3,35410	,000	-49,6372	-28,9228
	P2	-12,94168*	3,35410	,011	-23,2989	-2,5845
	P3	-29,92668*	3,35410	,000	-40,2839	-19,5695
K+	K-	57,22000*	3,35410	,000	46,8628	67,5772
	P1	17,94000*	3,35410	,001	7,5828	28,2972
	P2	44,27832*	3,35410	,000	33,9211	54,6355
	P3	27,29332*	3,35410	,000	16,9361	37,6505
P1	K-	39,28000*	3,35410	,000	28,9228	49,6372
	K+	-17,94000*	3,35410	,001	-28,2972	-7,5828
	P2	26,33833*	3,35410	,000	15,9811	36,6955
	P3	9,35332	3,35410	,086	-1,0039	19,7105
P2	K-	12,94168*	3,35410	,011	2,5845	23,2989
	K+	-44,27832*	3,35410	,000	-54,6355	-33,9211
	P1	-26,33833*	3,35410	,000	-36,6955	-15,9811
	P3	-16,98500*	3,35410	,001	-27,3422	-6,6278
P3	K-	29,92668*	3,35410	,000	19,5695	40,2839
	K+	-27,29332*	3,35410	,000	-37,6505	-16,9361
	P1	-9,35332	3,35410	,086	-19,7105	1,0039
	P2	16,98500*	3,35410	,001	6,6278	27,3422

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

11.5 Uji Tukey

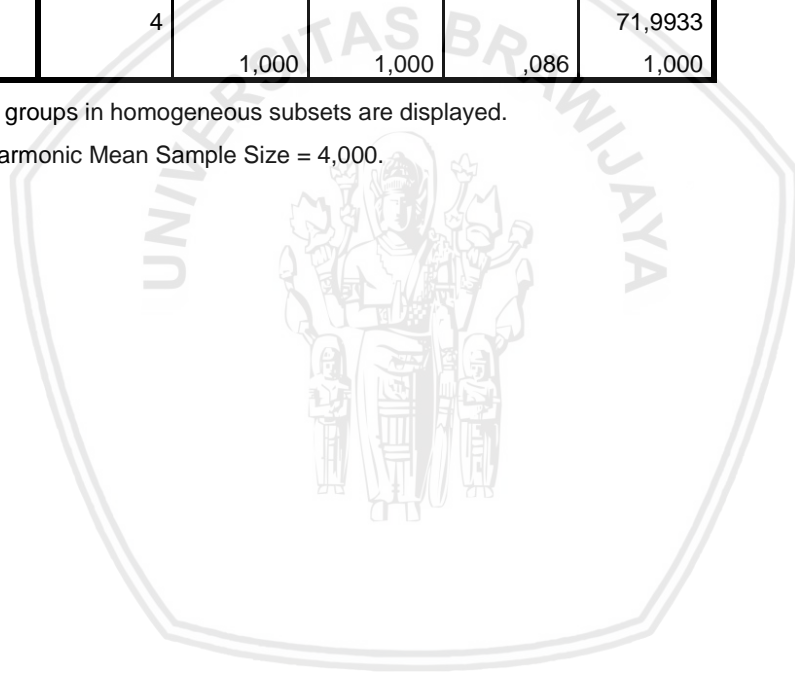
TNFalfa

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
K-	4	14,7733			
P2	4		27,7150		
P3	4			44,7000	
P1	4			54,0533	
K+	4				71,9933
Sig.		1,000	1,000	,086	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.



Lampiran 12. Perhitungan Presentase Peningkatan dan penurunan Ekspresi
TNF- α dan Kadar SOD

- Perhitungan presentasi peningkatan dan penurunan Ekspresi TNF- α

$$\text{Penurunan/ Peningkatan (\%)} = \frac{A-B}{B} \times 100\%$$

- A. [K(-) diasumsikan sebagai rata-rata nominal ekspresi TNF- α]

$$\text{Peningkatan (\%)} = \frac{14,77-14,77}{14,77} \times 100\% = 0$$

- B. [K(+) diasumsikan dengan K (-)]

$$(\%) = \frac{71,99-14,77}{14,77} \times 100\% = 387,41\%$$

- C. [PI dibandingkan dengan K (+)]

$$(\%) = \frac{54,05-71,99}{71,99} \times 100\% = -(24,92\%)$$

- D. [P2 dibandingkan dengan K(+)]

$$(\%) = \frac{27,72-71,99}{71,99} \times 100\% = -(61,51\%)$$

- E. [P3 dibandingkan dengan K(+)]

$$(\%) = \frac{44,70-71,99}{71,99} \times 100\% = -(37,91\%)$$

- Perhitungan presentasi peningkatan dan penurunan Kadar SOD

$$\text{Penurunan/ Peningkatan (\%)} = \frac{A-B}{B} \times 100\%$$

- A. [K(-) diasumsikan sebagai rata-rata nominal ekspresi TNF- α]

$$\text{Peningkatan (\%)} = \frac{58,67-58,67}{58,67} \times 100\% = 0$$

- B. [K(+) diasumsikan dengan K (-)]

$$(\%) = \frac{36,52-58,67}{58,67} \times 100\% = -(37,75\%)$$

C. [PI dibandingkan dengan K (+)]

$$(\%) = \frac{52,10-36,52}{36,52} \times 100\% = 42,66\%$$

D. [P2 dibandingkan dengan K(+)]

$$(\%) = \frac{57,87-36,52}{36,52} \times 100\% = 58,46\%$$

E. [P3 dibandingkan dengan K(+)]

$$(\%) = \frac{48,49-36,52}{36,52} \times 100\% = 32,78\%$$

