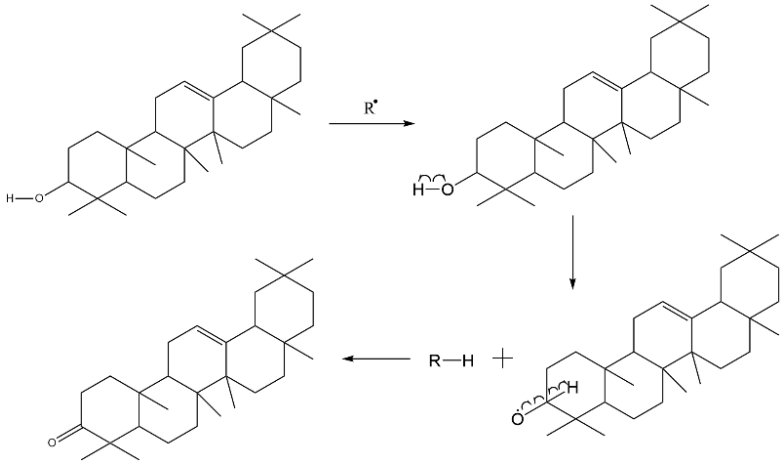
BAB IV
PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak n-heksana Akar Pletekan terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah pada Tikus Putih (*Rattus novergicus*) yang terpapar MLD-STZ

Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana akar pletekan (*Ruellia Tuberosa* L.) dapat menurunkan kadar glukosa darah tikus karena senyawa antioksidannya. Hasil uji fitokimia memberikan hasil positif pada uji Triterpenoid, sedangkan pada uji flavonoid dan steroid menunjukkan hasil negatif. Hal tersebut ditunjukkan oleh terjadinya perubahan warna pada masing-masing perlakuan uji. Uji Triterpenoid menunjukkan hasil positif dengan adanya perubahan warna dari kuning kemerahan (orange) menjadi coklat kemerahan setelah ditambahkan H_2SO_4. Uji flavonoid dan steroid menunjukkan hasil negatif karena tidak terbentuknya warna merah pada uji flavonoid dan warna biru pada uji steroid.



Gambar 4.1 Mekanisme reaksi triterpenoid sebagai *radical scavenger* untuk radikal bebas.

Triterpenoid melepas atom H pada gugus hidroksil (-OH). Sehingga radikal bebas akan berikatan dengan atom yang memiliki elektronegativitas yang tinggi. Akan membentuk ikatan rangkap dua dan menjadi stabil.

Streptozotocin (STZ) merupakan bahan kimia yang bersifat toksik pada sel β pankreas. STZ yang diberikan dengan cara dosis rendah berulang (*Multiple low doses*, MLD-STZ) pada tikus dengan dosis 20 mg/kgBB/hari selama 5 hari dan diinjeksi secara intraperitonial (*i.p*) menyebabkan tikus menderita diabetes melitus (DM) tipe 1. DM tipe 1 ditandai dengan rusaknya sel β pankreas dan meningkatnya kadar glukosa darah.

Akibat dari kerusakan sel β pankreas, menyebabkan produksi insulin berkurang atau tidak adanya produksi insulin dalam tubuh. Berkurangnya produksi insulin oleh sel β pankreas menyebabkan penurunan penggunaan glukosa ke dalam sel, penurunan penggunaan glukosa oleh berbagai jaringan, peningkatan katabolisme protein sehingga terjadi peningkatan asam amino dalam plasma yang akan menyebabkan produksi gula melalui glikogenesis meningkat. Hal ini menyebabkan hiperglikemia.

Perubahan tingkat kadar glukosa darah pada tikus yang terpapar MLD-STZ diamati setiap minggu selama 2 minggu setelah injeksi MLD-STZ. Selama masa pengamatan kadar glukosa darah tikus yang diinjeksi MLD-STZ, dilakukan juga pengamtan untuk tikus kontrol negatif. Hasil pengukuran glukosa darah disajikan dalam **Tabel 4.1**

Tabel 4.1 Kadar Glukosa Darah (mg/dL) Tikus Kontrol Negatif, Positif dan Terapi 250 mg/kg BB

Kelompok Perlakuan	**Rata-rata Kadar Glukosa Darah (mg/dL)**	**Kadar Glukosa (%)**	
		Peningkatan	**Penurunan**
Kontrol Negatif	83.17 ±7.47[a]		
Kontrol Positif	299.67 ± 24.7[b]	260.32	
Terapi 250 mg/kg BB	119 ± 24.63[c]		60.29

Berdasarkan hasil analisa statistik yang ditunjukkan pada **Lampiran E.** kadar glukosa darah memiliki varian yang sama (homogen) dengan standar $p>0.05$. Untuk uji *ANOVA* menggunakan *One-Way ANOVA* menunjukkan bahwa kelompok terapi mampu menurunkan kadar glukosa darah secara signifikan ($p<0.05$). Jika dilihat dari data $F_{hitung} > F_{tabel}$ dan dilihat dari nilai $p<0.05$ maka dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan. Data tersebut menunjukkan adanya perbedaan antar perlakuan. Jika ada perbedaan diteruskan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur)/Tukey. Hasil analisis BNJ menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar semua kelompok.

Berdasarkan data pada **Tabel 4.1** terlihat bahwa kadar glukosa darah kelompok tikus kontrol negatif yaitu 83.17 ± 7.47 mg/dL termasuk dalam range kadar glukosa darah normal yaitu 50-135 mg/dL. Rataan kadar glukosa darah pada kelompok control negative akan dijadikan adanya peningkatan karena pengaruh perlakuan. Sedangkan pada kelompok tikus yang terpapar MLD-STZ (kontrol positif) mengalami kenaikan sebesar 260.32%. Dengan rataan kadarnya sebesar 299.67 ± 24.7 mg/dL kadar glukosa darah tersebut termasuk dalam rentang kadar glukosa tikus DM. Hewan coba dapat didiagnosa menderita DM tipe 1 jika kadar glukosa darahnya mencapai >200 mg/dL. Untuk Tikus yang diterapi ekstrak n-heksana akar pletekan (*Ruellia Tuberosa* L.). Untuk tikus kelompok terapi mengalami penurunan sebesar 60.29 % dengan rataan kadar glukosa darah 119 ± 24.63 mg/dL. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pengaruh antioksidan jenis triterpenoid pada ekstrak n-heksana akar pletekan (*Ruellia Tuberosa* L.) dapat mencegah produksi ROS dengan mencegah autooksidasi glukosa dengan glikasi.

4.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak n-heksana akar Pletekan terhadap Aktivitas Protease pada Ginjal Tikus Putih (*Rattus novergicus*) yang terpapar MLD-STZ

Unit aktivitas protease dinyatakan dengan banyaknya jumlah mikro mol (µmol) tirosin yang dihasilkan tiap menitnya dari hidrolosis ikatan peptida pada protein oleh protease hasil isolasi dari ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) pada kondisi optimum yaitu pH 6,5, suhu 37^0C dan waktu inkubasi 60 menit.

Aktivitas protease merupakan kemampuan protease dalam menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Metode yang digunakan untuk analisis aktivitas enzim adalah metode spektrofotometri atau CDU (Casein Digestion Unit). Metode ini didasarkan atas hidrolisis enzimatis oleh protease yang diuji dari larutan substrat kasein 1 % pada pH 7, dan diikuti dengan pengendapan substrat yang tidak terhidrolisis menggunakan asam trichloroacetat (TCA) 4 % untuk menghentikan reaksi. Hasil hidrolisis dari larutan substrat kasein adalah L-Tirosin. Oleh karena itu, pada pengukuran aktivitas enzim protease digunakan kurva baku tirosin dengan λ 275 nm karena hasil akhir (produk) yang terukur dengan spektrofotometri UV.

Tabel 4.2 Aktivitas Enzim Protease (µmol/mLmenit) pada Ginjal Tikus Kontrol Negatif, DM tipe 1 dan Terapi 150 mg/kg BB

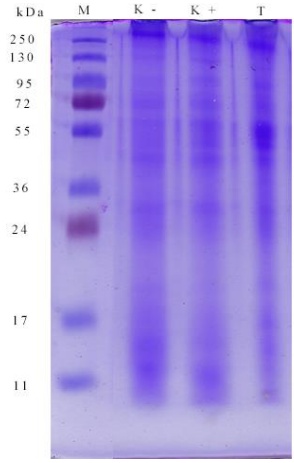
Kelompok Perlakuan	Rata-rata Aktivitas Protease (µmol/mL. menit)	Aktivitas Protease (%)	
		Peningkatan	Penurunan
Kontrol Negatif	0.05 ± 0.01^a		
Kontrol Positif	0.13 ± 0.02^b	120.81	
Terapi 250 mg/kg BB	0.07 ± 0.01^a		43.28

Berdasarkan hasil uji statistik pada **Lampiran E.2** menunjukkan bahwa aktivitas protease antar kelompok memiliki varian yang sama (homogen) dengan $p>0.05$. Jika data memiliki varian yang sama dapat dilanjutkan dengan uji *one-way ANOVA*. Dari data analisis menunjukkan adanya perbedaan aktivitas protease antar kelompok dengan $p<0.05$. Jika dilihat dari data $F_{hitung} > F_{tabel}$ dan dilihat dari nilai $p<0.05$ maka dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan. Jika ada perbedaan diteruskan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur)/Tukey. Hasil analisis BNJ menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok kontrol negative dan positif.

Berdasarkan **Tabel 4.2** kelompok tikus kontrol positif yang terpapar MLD-STZ (kontrol positif) dengan dosis 20 mg/kgBB mengalami peningkatan 120.81 % dengan rataan aktivitas protease 0.13 ± 0.02 µmol/mL.menit. Rataan aktivitas protease kelompok tikus negatif akan dijadikan standar untuk mengukur peningkatan karena pengaruh perlakuan. Besarnya peningkatan tersebut mengindikasikan adanya kerusakan sel pada hewan coba pasca induksi MLD-STZ. Kerusakan tersebut dapat menyebabkan protein berukuran kecil akan lolos dan akan terjadi hiperfiltrasi protein [22]. Keadaan stress oksidatif menimbulkan kerusakan oksidatif mulai dari tingkat sel, jaringan hingga ke organ tubuh. ROS yang berlebih dapat berikatan dengan senyawa apa saja terutama komponen membrane seperti lipid dan protein yang menyebabkan transport membrane terganggu. Peningkatan aktivitas protease yang berlebihan di ginjal akan menyebabkan seluruh protein membrane rusak sehingga integritas membrane hilang dan merusak jaringan ginjal [24]. Efek yang ditimbulkan dalam tubuh dapat dinetralisir oleh antioksidan alami [23]. Dapat dilihat pada tikus kelompok terapi mengalami penurunan sebesar 43.28 % dengan rataan aktivitas protease sebesar 0.07 ± 0.01 µmol/mL.menit. Hal tersebut menunjukkan bahwa antioksidan yang terkandung dalam tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) memberikan pengaruh dalam meredam radikal bebas, dapat dilihat pada **Gambar 4.1**

4.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak n-heksana akar Pletekan terhadap Profil Pita Protein Hasil Isolasi dari Ginjal Tikus Putih (*Rattus novergicus*) yang terpapar MLD-STZ

Profil pita protein yang diperoleh dari hasil elektroforesis SDS-PAGE antara tikus kontrol negatif, positif dan tikus yang diterapi dengan ekstrak n-heksan akar pletekan (*Ruellia Tuberosa* L.) selama 14 hari dengan dosis 250 mg/kg BB tikus menunjukkan adanya perbedaan pita protein yang hilang (Gambar 4.3)



Keterangan :
M = Marker Protein
K (-) = Kontrol Negatif
K (+) = Kontrol Positif
T = Kelompok Terapi

Gambar 4.3. Profil pita protein ginjal tikus (*Rattus novergicus*) kontrol negatif, positif dan tikus yang diterapi dengan ekstrak n-heksan akar pletekan dengan teknik SDS-PAGE

Tabel 4.3 Perbedaan Berat Molekul (BM) Protein Ginjal Hasil Isolasi Ginjal Tikus Kontrol Negatif, Positif dan Terapi akar Ekstrak n-heksan

	BM Protein (kDa)							
	136	106	91	75	62	52	49	29
Kontrol Negatif	√	√	-	-	√	-	√	√
Kontrol Positif	√	√	√	√	√	√	√	√
Terapi 250 mg/kg BB	√	√	√	√	√	-	√	√

Data pada **Tabel 4.3** menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pita protein pada tikus kontrol negatif terdapat pita protein yang muncul dengan berat molekul tertentu. Berbeda dengan tikus yang mendapat perlakuan dengan *Streptozotocin* (kontrol positif) terdapat perubahan pada profil pita protein yaitu terdapat protein baru dengan berat molekul 91, 75, dan 52 kDa. Maka dari itu, dapat diketahui bahwa paparan MLD-STZ dan ekstrak n-heksan akar pletekan dalam organ tikus menyebabkan perubahan profil protein di ginjal.

Protein yang terekspresi pada tikus dengan kontrol positif dan kelompok terapi dengan berat molekul sebesar 52 kDa diduga sebagai *Hemopexin* [41]. Protein dengan berat molekul 91 kDa diduga sebagai kelompok protein stress yaitu Hsp 90. Protein dengan berat molekul 75 kDa diduga sebagai kelompok protein stress yaitu Hsp70. Sebagaimana bahwa Hsp70 merupakan jenis protein yang memiliki rentang massa molekul 74-75 kDa [40].

Hemopexin berfungsi mengikat heme bebas dengan afinitas tinggi sebagai radikal heme. Heme berpotensi sangat beracun karena kemampuannya untuk menyambung bilayers lipid dan menghasilkan radikal bebas seperti radikal hidroksil [43]. Kadar hemopexin meningkat pada penderita diabetes. Menurut penelitian Chia-Ching Chen, Hemopexin diekspresikan dalam beberapa sel yang berasal dari jaringan yang berbeda. Dan juga meningkatkan konsentrasi glukosa

dalam kultur sel dan memodulasi tingkat ROS dalam sel dengan menambahkan glutathione yang berkurang. [41]

Kelompok protein stress (*Heat Shock Protein*) berperan dalam melindungi sel. Dan juga berperan melindungi jaringan akibat kerusakan oksidatif. Hsp dapat mengendalikan regulasi protein yang meliputi konformasi protein sebelum dan setelah terjadi *stress*, serta mampu menghambat kematian sel. Hsp dipicu oleh kerusakan oksidatif suatu jaringan akibat toksisitas bahan kimia [42].

.