

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak n-heksan Akar Pletakan (*Ruellia tuberosa* L.) terhadap Penurunan Kadar Glukosa Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Diabetes Melitus Tipe 1 Pasca Induksi MLD-STZ

Streptozotocin (STZ) merupakan senyawa kimia yang dapat menyebabkan nekrosis pada sel β pankreas. Pemberian STZ secara intraperitoneal yang dilakukan selama 5 hari berturut-turut terhadap tikus putih dengan dosis rendah berulang (*multiple low doses*) sebesar 20 mg/kg BB dapat menyebabkan tikus putih menderita diabetes mellitus (DM) tipe 1 dengan proses autoimun. Hal tersebut dapat ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah akibat kerusakan sel β pankreas. Kerusakan ini diawali dengan peristiwa alkilasi pada basa guanin DNA sehingga rantai DNA ribosa terputus dan terjadi kerusakan DNA. Kemudian kerusakan DNA menyebabkan aktifnya *poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP) sehingga terbentuk polimer ADP-ribosa. Polimer ADP-ribosa akan menekan NAD^+ seluler sehingga jumlah ATP menurun. Penurunan ATP akan menyebabkan terjadinya nekrosis sel β pankreas dan menghambat sintesis maupun sekresi insulin. Sintesis maupun sekresi insulin yang terhambat akan menyebabkan glukosa terakumulasi dalam darah, sehingga kadar glukosa darah meningkat melebihi kadar glukosa darah normal yang disebut dengan keadaan hiperglikemia.

Pada hasil penelitian ini, dapat dilihat pada **Tabel 4.1** menunjukkan bahwa rata-rata kadar glukosa tikus kontrol negatif termasuk dalam rentang kadar glukosa darah normal yakni $83,17 \pm 7,47$ mg/dL. Kadar glukosa darah tikus normal berkisar 50-135 mg/dL [35]. Tikus kelompok positif mengalami peningkatan kadar glukosa darah sebesar 260,32 % terhadap kontrol negatif. Sehingga dapat dinyatakan bahwa tikus kelompok positif menderita DM. Rata-rata kadar glukosa tikus kelompok positif yakni $299,67 \pm 24,70$ mg/dL. Tikus dikatakan menderita DM apabila kadar glukosa darah >200 mg/dL [12]. Pada kelompok terapi 250 mg/kg BB, kadar glukosa darah tikus mengalami

penurunan sebesar 60,29% terhadap tikus kelompok positif. Rata-rata kadar glukosa darah tikus kelompok terapi 250 mg/kg BB adalah $119,00 \pm 24,63$ mg/dL. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak n-heksan akar pletekan (*Ruellia tuberosa*) dengan dosis 250 mg/kg BB yang diberikan secara oral selama 21 hari mampu menurunkan kadar glukosa darah tikus DM tipe 1 pasca induksi MLD-STZ.

Tabel 4.1 Kadar glukosa darah tikus kontrol negatif, kelompok positif, dan kelompok terapi 250 mg/kg BB

| Kelompok Perlakuan | Rata-rata Kadar Glukosa (mg/dL) | Kadar Glukosa (%) | |
|---------------------|---------------------------------|-------------------|-----------|
| | | Peningkatan | Penurunan |
| Kontrol Negatif | $83,17 \pm 7,47^a$ | - | - |
| Kelompok Positif | $299,67 \pm 24,70^c$ | 260,32 | - |
| Terapi 250 mg/kg BB | $119,00 \pm 24,63^b$ | - | 60,29 |

keterangan: Perbedaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok dengan nilai $p < 0,05$

Berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan bahwa data kadar glukosa darah antar kelompok memiliki varian yang sama atau homogen dan terdistribusi secara normal ($p > 0,05$). Hasil uji *one-way* ANOVA menunjukkan adanya perbedaan kadar gula darah secara signifikan antar kelompok ($p < 0,05$). Hasil perhitungan statistik *Tukey test*, pemberian notasi menunjukkan adanya perbedaan kadar glukosa yang nyata antara kontrol negatif, kelompok positif, dan kelompok terapi 250 mg/kg BB. Hal ini terbukti dengan adanya nilai notasi yang berbeda pada tiap kelompok perlakuan. Perbedaan yang nyata antara kelompok positif dengan kelompok terapi 250 mg/kg BB menunjukkan adanya pengaruh pemberian ekstrak n-heksan akar pletekan (*Ruellia tuberosa*).

Ekstrak akar pletekan (*Ruellia tuberosa*) mampu menurunkan kadar glukosa darah karena mengandung antioksidan jenis triterpenoid. Hal ini dibuktikan dengan uji fitokimia menggunakan metode Lieberman-Burchard terhadap ekstrak n-heksan akar

pletakan (*Ruellia tuberosa*). Hasil identifikasi menunjukkan hasil yang positif dengan adanya perubahan warna dari warna oranye menjadi merah kecoklatan, dapat dilihat pada **Lampiran E**. Perubahan warna terjadi akibat adanya reaksi oksidasi pada senyawa triterpenoid. Metode uji Lieberman-Burchard menggunakan campuran pereaksi asam asetat anhidrat dan H₂SO₄ pekat. Penambahan H₂SO₄ pekat mengakibatkan asam asetat anhidrat bereaksi dengan atom H⁺ dari H₂SO₄ pekat sehingga membentuk karbokation. Kemudian atom O dari gugus –OH pada senyawa triterpenoid akan bereaksi dengan karbokation menghasilkan gugus asetil yang merupakan hasil reaksi asetilasi. Selanjutnya, gugus tersebut akan lepas dan menginisiasi pembentukan ikatan rangkap dan terjadi resonansi akibat lepasnya atom H. Akibatnya, senyawa triterpenoid akan bertindak sebagai karbokation dan menyerang senyawa triterpenoid lain. Hal ini menyebabkan terjadinya adisi elektrofilik dan pelepasan atom H. Selanjutnya terjadi penggabungan karbokation yang menyebabkan terjadinya perpanjangan konjugasi ikatan rangkap yang ditandai dengan terbentuknya warna merah kecoklatan

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat reaksi oksidasi atau mampu meredam radikal bebas [36]. Antioksidan yang terkandung dalam ekstrak n-heksan akar pletakan (*Ruellia tuberosa*) mampu meredam radikal bebas yang merusak sel β pankreas. Hal ini menyebabkan terjadinya perbaikan sel β pankreas, sehingga sel β pankreas mampu menghasilkan dan meningkatkan sekresi insulin. Meningkatnya sekresi insulin menyebabkan glukosa yang terakumulasi dalam darah terdistribusi ke dalam tubuh dan dapat diubah menjadi energi maupun disimpan sebagai glikogen.

4.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak n-heksan Akar Pletakan (*Ruellia tuberosa* L.) terhadap Penurunan Aktivitas Protease Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Diabetes Melitus Tipe 1 Pasca Induksi MLD-STZ

Pengukuran aktivitas protease dilakukan untuk mengetahui tingkat kerusakan jaringan pada hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi MLD-STZ. Unit aktivitas protease dari hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) didefinisikan sebagai

banyaknya mikro mol tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis ikatan peptida pada protein oleh protease hasil isolasi dari hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Tabel 4.2 Aktivitas Protease tikus kontrol negatif, kelompok positif, dan kelompok terapi 250 mg/kg BB

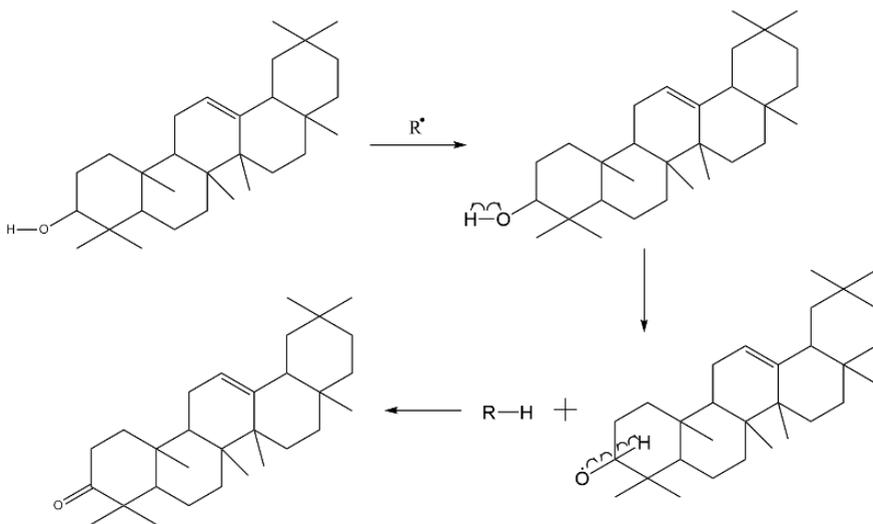
| Kelompok Perlakuan | Rata-rata Aktivitas Protease ($\mu\text{mol/mL.menit}$) | Aktivitas Protease (%) | |
|---------------------|---|------------------------|-----------|
| | | Peningkatan | Penurunan |
| Kontrol negatif | $0,04 \pm 0,005^a$ | - | - |
| Kelompok positif | $0,09 \pm 0,003^c$ | 134,32 | - |
| Terapi 250 mg/kg BB | $0,05 \pm 0,009^b$ | - | 44,87 |

Berdasarkan **Tabel 4.2**, tikus kelompok negatif menunjukkan aktivitas protease sebesar $0,04 \pm 0,005 \mu\text{mol/mL.menit}$. Nilai aktivitas protease kontrol negatif digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya peningkatan atau penurunan pada tiap perlakuan. Kelompok tikus positif memiliki nilai aktivitas protease lebih tinggi ($0,09 \pm 0,003 \mu\text{mol/mL.menit}$), jika dibandingkan dengan nilai aktivitas protease kelompok terapi 250 mg/kg BB ($0,05 \pm 0,009 \mu\text{mol/mL.menit}$) dan kontrol negatif ($0,04 \pm 0,005 \mu\text{mol/mL.menit}$). Hasil uji statistik menunjukkan bahwa aktivitas protease antar kelompok memiliki varian yang sama atau homogen dan terdistribusi secara normal ($p > 0,05$). Hasil uji *one-way* ANOVA menunjukkan adanya perbedaan aktivitas protease antar kelompok ($p < 0,05$). Hasil perhitungan statistik *Tukey test*, menunjukkan adanya perbedaan aktivitas protease yang nyata antar kelompok namun terjadi penurunan aktivitas protease sebesar 44,87% pada kelompok terapi ekstrak n-heksan akar pletekan 250 mg/kgBB terhadap kelompok positif DM (**Tabel 4.2**).

Meningkatnya aktivitas protease sebesar 134,32% mengindikasikan adanya inflamasi pada hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) DM tipe 1 pasca induksi MLD-STZ. STZ merupakan senyawa toksik yang memiliki gugus nitrosoarea berupa nitrogen oksida (NO), dimana gugus NO tersebut merupakan salah satu radikal bebas. Ketika STZ diinjeksikan ke dalam tubuh, maka

radikal NO akan berikatan dengan substansi lain dan memicu terbentuknya ROS (*Reactive Oxygen Species*). Menurut Zhang (2001), ROS berlebih dalam tubuh akan menstimulasi pengaktifan PKC- α yang memicu pengaktifan NF-kB. NF-kB merupakan faktor transkripsi yang mengatur ekspresi sel-sel sitokin pro-inflamatori seperti TNF- α dan interleukin. TNF- α akan menyebabkan inflamasi dan mengaktifasi neutrofil, sedangkan interleukin akan memicu aktivinya sel mast. Neutrofil dan sel mast yang teraktivasi akan menghasilkan enzim protease sebagai respon terjadinya inflamasi. Pengukuran aktivitas protease dapat digunakan untuk melihat tingkat keparahan inflamasi, semakin tinggi nilai aktivitas protease maka semakin parah tingkat kerusakan jaringan yang terjadi. Hal ini disebabkan karena enzim protease berperan dalam perbaikan sel yang mengalami kerusakan serta membunuh bakteri pada jaringan yang mengalami inflamasi. Oleh karena itu, nilai aktivitas protease kelompok positif meningkat terhadap nilai aktivitas protease kontrol negatif.

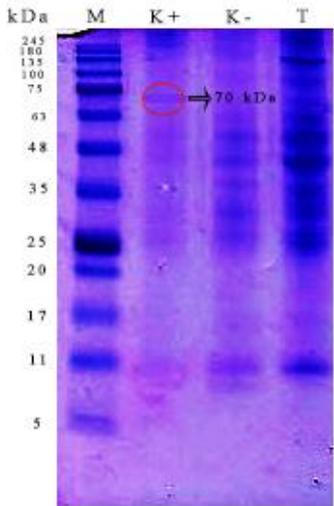
Hasil pengukuran aktivitas protease kelompok terapi 250 mg/kg BB mengalami penurunan sebesar 44,87% terhadap kontrol positif dan secara statistik berbeda nyata ($p < 0,05$). Hal tersebut dinyatakan dengan notasi yang berbeda dari hasil *Tukey-test*. Menurunnya aktivitas protease menunjukkan bahwa pemberian ekstrak n-heksan akar pletekan (*Ruellia tuberosa*) memberikan pengaruh dalam meredam radikal bebas. Hal ini dapat disebabkan karena ekstrak n-heksan akar pletekan mengandung senyawa antioksidan triterpenoid. Triterpenoid akan melepaskan atom H pada gugus -OH, kemudian radikal bebas akan berikatan dengan atom H (**Gambar 4.2**). Sehingga oksidan dan antioksidan dalam tubuh menjadi seimbang dan mampu meminimalisir kerusakan jaringan dan sekresi enzim protease.



Gambar 4.1 Dugaan mekanisme reaksi senyawa triterpenoid dalam meredam radikal bebas

4.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak n-heksan Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) terhadap Profil Protein pada Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Diabetes Melitus Tipe 1 Pasca Induksi MLD-STZ

Analisa profil protein dengan metode elektroforesis SDS-PAGE pada tikus kontrol negatif DM 1, tikus kelompok positif DM 1, dan tikus kelompok terapi ekstrak n-heksan akar pletekan dosis 250 mg/kgBB menunjukkan adanya perbedaan pita protein (**Gambar 4.1**) yang selanjutnya diinterpretasikan dalam **Tabel 4.3**.



Keterangan:

M = Marker Protein

K (-) = Tikus negatif DM 1

K (+) = Tikus positif DM 1

T = Tikus terapi ekstrak n-heksan akar pletakan dosis 250 mg/kg BB

Gambar 4.1 Profil pita protein hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan metode elektroforesis SDS-PAGE

Tabel 4.3 Perbedaan Berat Molekul Protein Hepar Hasil Isolasi Organ Hepar Tikus Kontrol Negatif, Kelompok Positif, dan Kelompok Positif Terapi 250 mg/kgBB

| Kelompok | Berat Molekul Protein (kDa) | | | | | | | |
|----------|-----------------------------|----|----|----|----|----|----|----|
| | 123 | 89 | 79 | 70 | 65 | 55 | 29 | 10 |
| K (+) | - | - | - | √ | √ | - | √ | √ |
| K (-) | √ | - | √ | - | √ | √ | √ | √ |
| T | √ | √ | √ | - | √ | √ | √ | √ |

Berdasarkan hasil analisa profil pita protein dengan metode SDS-PAGE pada **Gambar 4.1** dan **Tabel 4.3** terdapat beberapa jenis protein yang tidak muncul pada kelompok positif DM yakni protein dengan berat molekul 123, 89, 79, dan 55 kDa, namun muncul pada kontrol negatif dan kelompok terapi ekstrak n-heksan akar pletekan dosis 250 mg/kgBB. Hilangnya protein pada kelompok positif DM dimungkinkan mengalami apoptosis pada sel yang mengekspresikan protein tersebut akibat senyawa radikal bebas yang terbentuk karena injeksi *Streptozotocin*. Dari hasil tersebut dapat membuktikan bahwa *Streptozotocin* mampu mengakibatkan penurunan kadar protein, hal ini juga dibuktikan dengan peningkatan aktivitas enzim protease pada tikus kelompok positif DM. Enzim protease diduga menghidrolisis ikatan peptida pada protein tikus kelompok positif DM menjadi molekul yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino, sehingga terdapat beberapa protein yang tidak muncul pada tikus kelompok positif DM. Pada **Tabel 4.3** terdapat protein dengan berat molekul 70 kDa yang muncul pada tikus kelompok positif namun tidak terdapat pada tikus kontrol negatif dan kelompok terapi ekstrak n-heksan akar pletekan dosis 250 mg/kgBB.

Protein dengan berat molekul 70 kDa diduga merupakan protein HSP (*Heat Shock Protein*) 70 [37]. Protein HSP adalah protein yang dihasilkan karena adanya HSR (*Heat Shock Response*). HSR merupakan suatu respon berbasis genetik untuk menginduksi gen-gen yang mengkode *molecular chaperone*, protease dan protein-protein lain yang penting dalam mekanisme pertahanan. Beberapa hal yang dapat memicu ekspresi HSP diantaranya kenaikan temperatur, logam-logam berat, senyawa toksik, infeksi dan gangguan radikal bebas [38]. HSP 70 berperan sebagai pertahanan sel islet terhadap radikal bebas dan mencegah terjadinya peroksidasi lipid dan *subsequent* apoptosis yang diinduksi oleh TNF- α , yang merupakan salah satu faktor penyebab inflamasi [37][38].

Setelah diberikan terapi ekstrak n-heksan akar pletekan dengan dosis 250 mg/kgBB, terjadi perbaikan profil protein terhadap tikus kelompok positif DM tipe 1. Hal ini ditunjukkan dengan protein yang memiliki berat molekul 123, 79, 55 kDa

terekspresi kembali pada profil protein tikus kelompok terapi 250mg/kgBB. Selain itu, munculnya protein baru dengan berat molekul 89 kDa pada tikus kelompok terapi ekstrak n-heksan akar pletakan. Protein tersebut diduga merupakan protein HSP 90 yang muncul ketika terjadi perbaikan sel atau jaringan. Protein HSP 90 merupakan protein *chaperone* yang berperan dalam pelipatan protein, pematangan dan stabilisasi protein. Terutama pada protein yang berperan dalam transduksi sinyal, regulasi siklus sel, dan pertahanan diri [39][40]. Hasil analisa profil protein kelompok terapi juga menunjukkan tidak ditemukannya protein HSP 70. Hal ini membuktikan bahwa senyawa antioksidan triterpenoid dari akar pletakan mampu meredam radikal bebas dan mampu memperbaiki kerusakan sel sehingga sel mampu mensekresikan kembali protein yang hilang pada tikus kelompok positif DM 1.