

**UJI AKTIVITAS PENINGKATAN SENSITIVITAS INSULIN EKSTRAK
BIJI JINTAN HITAM MELALUI PENGUKURAN KONSENTRASI
TIROSIN TERFOSFORILASI INSULIN RESEPTOR SUBSTRAT-1
(Terhadap Tikus Wistar Model Diabetes Mellitus Tipe 2)**

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi



Oleh:
Fenny Kristanti Panggabean
0910753024

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

ABSTRAK

Panggabean, Fenny Kristanti. 2014. Uji Aktivitas Peningkatan Sensitivitas Insulin Ekstrak Biji Jintan Hitam Melalui Pengukuran Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi Insulin Reseptor Substrat-1 (Terhadap Tikus Wistar Model Diabetes Mellitus Tipe 2). Tugas Akhir, Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Efta Triastuti, M. Farm. Klin., Apt. (2) Ema Pristi Yunita, M. Farm. Klin., Apt.

Biji jintan hitam merupakan tanaman herbal untuk terapi dan pencegahan Diabetes Mellitus (DM tipe 2). Salah satu penyebab DM tipe 2 adalah penurunan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS (insulin receptor substrat)-1 yang berefek pada peningkatan resistensi insulin. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas peningkatan sensitivitas insulin dari ekstrak biji jintan hitam pada kondisi resistensi insulin melalui pengukuran konsentrasi tirosin terfosforilasi pada IRS-1 dan korelasinya dengan konsentrasi glukosa darah puasa. Desain penelitian yang digunakan adalah *true eksperimental*, dengan sampel tikus wistar jantan berjumlah 24 ekor dengan 5 kelompok perlakuan dan 1 kontrol normal. Kelompok perlakuan diinduksi DM dengan diet fruktosa sebanyak 16 gram yang diberikan melalui larutan fruktosa untuk penyondean dan campuran pakan tikus. Kelompok Pp mendapatkan metformin, Pn tanpa pemberian ekstrak, P₁, P₂, P₃ mendapatkan ekstrak jintan hitam 24 mg/kgBB, 48 mg/kgBB, dan 96 mg/kgBB. Induksi DM dilakukan dengan diet tinggi fruktosa selama 6 minggu dan terapi dilakukan setelah induksi DM2, selama 30 hari. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak biji jintan hitam secara statistik tidak memiliki efek peningkatan sensitivitas insulin melalui peningkatan konsentrasi tirosin terfosforilasi pada IRS-1 yang berbeda antar kelompok dengan nilai $p > 0,05$ (0,151) dan nilai korelasi yang bervariasi antar kelompok, kemungkinan disebabkan kegagalan induksi fruktosa untuk mengkondisikan tikus menjadi tikus model DM tipe 2.

Kata kunci : Diabetes Mellitus tipe 2 (DM tipe 2), ekstrak biji jintan hitam, tirosin terfosforilasi IRS-1

ABSTRACT

Panggabean, Fenny Kristanti. 2014. Activity Test Of Insulin Sensitivity Elevation by Black Seed Extract Through Measuring Insulin Receptor-1 Phosphorylated Tyrosine Concentration (Against Type 2 Diabetes Mellitus Model Wistar Rats). Final Assignment, Study Program of Pharmacy, Medical Faculty, Brawijaya University. Supervisors: (1) Efta Triastuti, M. Farm. Klin., Apt. (2) Ema Pristi Yunita, M. Farm. Klin., Apt.

Black seed (*Nigella sativa*) is a herbal plant that serves as treatment and prevention of type 2 Diabetes Mellitus (DM2). One of the causes of type 2 Diabetes Mellitus is depletion IRS concentration (insulin receptor substrate)-1 phosphorylated tyrosine which induced insulin resistance elevation. This research aimed to examine activity of elevation insulin sensitivity used black seed extract on insulin resistance condition. Elevation of insulin sensitivity known through measuring concentration of phosphorylated tyrosine on IRS-1 and its correlation with concentration of fasting blood glucose. This study used a true experimental design, sample consisted of 24 male Wistar rats, consisted 5 treatment groups (Pp, Pn, P₁, P₂, P₃) and 1 normal control group. Pp group received metformin, Pn group received none, P₁, P₂, and P₃ received black seed extract 24 mg/kgBW, 48 mg/kgBW, and 96 mg/kgBW. Diabetes induction done by high-fructose diet for 6 weeks. The therapy performed after DM2 induction for 30 days. The results showed Nonparametric Kruskal-Wallis value $p > 0.05$ (0.151) which means that there was no significant differences in the concentrations of phosphorylated tyrosine IRS-1 among treatment groups. The conclusion of this study that black seed extract had no statistically significant effect of increased insulin sensitivity through increased tyrosine phosphorylation of IRS-1 at different on each treatment with $p > 0.05$ (0.151) and variation in correlation value on each treatment probably caused by failure rats fructose induction to became rat DM2 model.

Keywords: type 2 Diabetes Mellitus (DM2), black seed extract, IRS-1 phosphorylated tyrosine

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERUNTUKAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum.....	5
1.3.2 Tujuan Khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
• Terhadap pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi.	5
• Terhadap pelayanan kesehatan kepada pasien.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Diabetes	7
2.1.1 Defenisi dan Klasifikasi Diabetes.....	7
2.1.2 Patofisiologi Diabetes Mellitus Tipe 2	8
2.1.3 Mekanisme <i>Insulin Signaling</i>	10
2.1.4 Mekanisme Fruktosa Menyebabkan Gangguan Toleransi Glukosa.....	11
2.1.5 Insulin Reseptor Substrat-1.....	13
2.2 Biji Jintan Hitam	14
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi Jintan Hitam	14
2.2.2 Penggunaan Ekstrak Biji Jintan Hitam sebagai Terapi Tambahan	15



2.2.3 Kandungan Kimia yang Berperan pada Diabetes Mellitus Tipe 2.....	16
2.2.4 Potensi Ekstrak Biji Jintan Hitam sebagai Antidiabetes	18
2.3 Pengukuran Insulin Reseptor Substrat-1 dengan ELISA.....	19
2.4 Metformin sebagai Terapi Antidiabetes.....	20
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	21
3.1 Kerangka Konseptual	21
3.2 Hipotesis Penelitian	23
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	24
4.1 Rancangan Penelitian.....	24
4.1.1 Desain Penelitian	24
4.1.2 Jenis Data	24
4.2 Sampel Penelitian	25
4.2.1 Sampel	25
4.2.2 Besar Sampel.....	25
4.2.3 Prosedur Pengambilan Sampel.....	26
4.2.4 Kriteria Subyek.....	27
4.3 Variabel Penelitian dan Defenisi Operasional.....	28
4.3.1 Variabel Penelitian	28
4.3.2 Definisi Operasional.....	28
4.4 Instrumen Analisis.....	30
4.5 Instrumen Penelitian	30
4.5.1 Bahan Penelitian.....	30
4.5.2 Alat Penelitian	33
4.6 Tempat dan Waktu Penelitian	34
4.7 Prosedur Penelitian	35
4.7.1 Penyiapan Ekstrak Biji Jintan Hitam.....	35
4.7.2 Uji Standarisasi Ekstrak.....	35
4.7.3 Uji Fitokimia Kualitatif.....	37
4.7.4 Pengkondisian Hewan Coba	38
4.7.5 Induksi Diabetes Mellitus Tipe 2 pada Tikus	39
4.7.6 Prosedur Euthanasia Tikus.....	39
4.7.7 Prosedur Pembuatan Homogenat Jaringan Otot	40



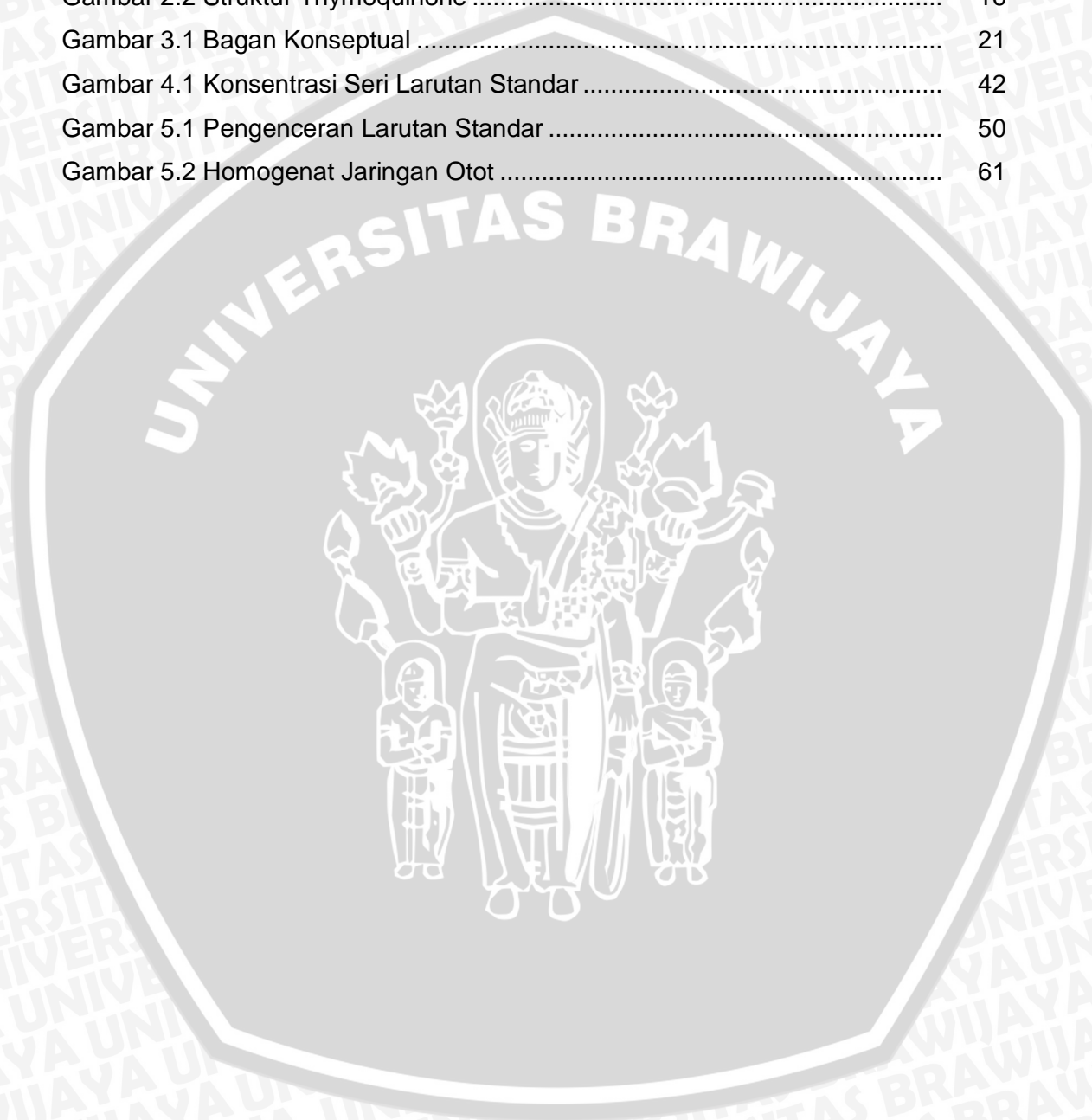
4.7.8	Prosedur Pengukuran Kadar Fosforilasi IRS-1 dengan ELISA	41
4.7.9	Prosedur Perlakuan pada Tikus	44
4.8	Kerangka Operasional	46
4.9	Analisis Data	47
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA		48
5.1	Hasil Penelitian	48
5.1.1	Hasil Pengelompokkan, Pengkondisian, dan Induksi DM Hewan Coba	48
5.1.2	Hasil Ekstraksi dan Uji Fitokimia Biji Jintan Hitam	49
5.1.3	Hasil Pembuatan Larutan Standar dan Kurva Baku	50
5.1.4	Hasil Pengukuran Kadar Fosforilasi Tirosin IRS-1 dengan ELISA	52
5.1.5	Hasil Perubahan Glukosa Darah Puasa	54
5.1.6	Hasil Pengukuran Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1 dan Delta Glukosa Darah Puasa	59
5.1.7	Hasil Pembuatan Homogenat Jaringan Otot	61
BAB 6 PEMBAHASAN		63
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN		76
DAFTAR PUSTAKA		77

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Komposisi Kandungan Umum Biji Jintan Hitam	17
Tabel 2.2 Komposisi Senyawa pada <i>Fixed Oil</i> Biji Jintan Hitam	17
Tabel 2.3 Komposisi Kandungan Utama <i>Volatle Oil</i> Biji Jintan Hitam.....	18
Tabel 4.1 Kandungan Zat Gizi dan Energi per 100 gram Bahan Diet Normal Tikus	31
Tabel 5.1 Kelompok Perlakuan dan Jumlah Tikus	49
Tabel 5.2 Hasil Uji Fitokimia Kualitatif.....	50
Tabel 5.3 Hasil Absorbansi Larutan Standar	51
Tabel 5.4 Konsentrasi Fosforilasi Tirosin IRS-1	53
Tabel 5.5 Hasil Analisis Korelasi Pearson Kelompok Pp	55
Tabel 5.6 Hasil Analisis Korelasi Pearson Kelompok Pn	55
Tabel 5.7 Hasil Analisis Korelasi Pearson Kelompok P ₁	56
Tabel 5.8 Hasil Analisis Korelasi Pearson Kelompok P ₂	56
Tabel 5.9 Hasil Analisis Korelasi Pearson Kelompok P ₃	57
Tabel 5.10 Interpretasi Koefisien Korelasi Nilai r	58
Tabel 5.11 Hasil Perubahan Glukosa Darah Puasa Sebelum dan Setelah Perlakuan	59
Tabel 5.12 Hasil Pengukuran Konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 dan Delta Glukosa Darah Puasa Kelompok Pp	60
Tabel 5.13 Hasil Pengukuran Konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 dan Delta Glukosa Darah Puasa Kelompok Pn.....	60
Tabel 5.14 Hasil Pengukuran Konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 dan Delta Glukosa Darah Puasa Kelompok P ₁	60
Tabel 5.15 Hasil Pengukuran Konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 dan Delta Glukosa Darah Puasa Kelompok P ₂	60
Tabel 5.16 Hasil Pengukuran Konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 dan Delta Glukosa Darah Puasa Kelompok P ₃	60

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Mekanisme Fruktosa menyebabkan Gangguan Toleransi Glukosa	12
Gambar 2.2 Struktur Thymoquinone	16
Gambar 3.1 Bagan Konseptual	21
Gambar 4.1 Konsentrasi Seri Larutan Standar	42
Gambar 5.1 Pengenceran Larutan Standar	50
Gambar 5.2 Homogenat Jaringan Otot	61



DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1 Alokasi Waktu Penelitian
- Lampiran 2 Alokasi Biaya Penelitian
- Lampiran 3 Dosis Metformin untuk Tiap Tikus
- Lampiran 4 Tabel Konversi Dosis Hewan dengan Manusia
- Lampiran 5 Hasil Uji Statistik SPSS
- Lampiran 6 Sisa Pakan Tikus Induksi
- Lampiran 7 Berat Badan Tikus dan Perhitungan Dosis
- Lampiran 8 Perhitungan Pengenceran Pelarut
- Lampiran 9 Perhitungan Dosis Insulin
- Lampiran 10 Prosedur Pembuatan Homogenasi
- Lampiran 11 Perhitungan Hasil ELISA
- Lampiran 12 Prosedur Uji Fitokimia
- Lampiran 13 Surat Keterangan Laik Etik



DAFTAR SINGKATAN

Akt	:	nama lain protein kinase-B
AMPK	:	Adenosine monophosphate-activated protein kinase
ANOVA	:	Analysis of Variance
AS160	:	Akt substrate of 160 kilodaltons
BB	:	Berat Badan
BPOM	:	Badan Pengawasan Obat dan Makanan
BSA	:	Bovime Serum Albumin
CRP	:	C-reactive Protein
DM tipe 1	:	Diabetes Mellitus tipe 1
DM tipe 2	:	Diabetes Mellitus tipe 2
DM	:	Diabetes Mellitus
EDTA	:	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	:	Enzym-Linked Immunosorbent Assay
FDA	:	Food and Drug Association
FFA	:	Free Fatty Acid
GLUT-4	:	Glucose Transporter-4
Grb2	:	Growth factor receptor-bound protein 2
HRP	:	Horse Radish Peroxide
IDF	:	International Diabetes Federation
IgG	:	Immunoglobulin G
IL	:	Interleukin
IR	:	Insulin Receptor
IRS	:	Insulin Reseptor Substrat
IRS-1	:	Insulin Reseptor Substrat 1
IRS-2	:	Insulin Reseptor Substrat 2
IU	:	International Unit
MCP	:	Monocyte Chemoattractant proteint
mTOR	:	molecular target of rapamycin
NCDs	:	non-communicable disease
PAI	:	Plasminogen Activator Inhibitor
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	:	Phosphate Buffered Saline with Tween



PDK1	:	phosphoinositid dependent kinase 1
PH	:	plecstrin homology
pH	:	potential hydrogen
PI3-kinase	:	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	:	phosphatidyl-inositol-3-4-biphosphate
PIP3	:	phosphatidyl-inositol-3,4,5-triphosphate
PKB	:	Protein Kinase B
PKC	:	Protein Kinase C
PMSF	:	Phenylmethylsulfonyl fluoride
P _{n1234p0}	:	Sampel dengan perlakuan n, 1, 2, 3, 4, p, 0
RAS	:	Rat Sarcoma Protein
RCT	:	Randomized Control Trial
RI	:	Republik Indonesia
Ser	:	Serine
SH2	:	Src-homology-2 domain protein
SHPTP2	:	Src homology 2 protein tyrosine phosphatase
Spektro-vis	:	Spektrofotometer-visibel
SPSS	:	Statistical Package for The Social Sciences
Syp	:	Synaptophysin
Thr	:	Threonin
TMB	:	Tetramethylbenzidine
TNF	:	Tumor Necrosis Factor
TORC	:	mammalian target of rapamycin Rictor complex
UPT	:	Unit Pelaksana Teknis
VAT	:	Visceral Adipose Tissue
VLDL	:	Very-low-density-lipoprotein
WHO	:	World Health Organization

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes merupakan salah satu penyakit yang masuk dalam kategori *non-communicable disease* (NCDs) dan menjadi salah satu “pembunuh” terbesar secara global, selain penyakit kardiovaskular, kanker, dan gangguan pernapasan kronik berdasarkan data dari WHO (*World Health Organization*). Pada tahun 2011, IDF (*International Diabetes Federation*) mengemukakan bahwa 366 juta orang di dunia mengidap diabetes dengan angka kematian 4,6 juta orang dan diperkirakan pada tahun 2030 akan meningkat menjadi 552 juta orang. 80% penderita diabetes berasal dari negara dengan tingkat pertumbuhan ekonomi menengah ke bawah dengan tingkat prevalensi terbesar pada usia 40-59 tahun. Sumber yang sama mengatakan bahwa 183 juta orang (50%) mengalami diabetes yang tidak terdeteksi. Alasan inilah yang menjadi salah satu perhatian tenaga kesehatan global (*International Diabetes Federation*, 2011)

Diabetes, berdasarkan WHO (2012), merupakan penyakit kronis yang muncul ketika pankreas tidak dapat memproduksi insulin dengan cukup atau ketika tubuh tidak dapat menggunakan insulin yang diproduksi secara efektif. Diabetes dibagi menjadi 2, yaitu diabetes mellitus tipe 1 dan diabetes mellitus tipe 2. Sumber yang sama menyatakan bahwa diabetes mellitus tipe 1 atau lebih dikenal dengan *insulin-dependent*, adalah kondisi ketergantungan pada pemberian insulin dari luar untuk mengatasi kondisi

kekurangan insulin, yang penyebab pastinya tidak dapat diketahui dan tidak dapat dicegah dengan pengetahuan yang ada sekarang ini, sedangkan diabetes mellitus tipe 2 (*non-insulin-dependent*) merupakan kondisi saat tubuh tidak menggunakan insulin secara efektif. Diabetes mellitus tipe 2 ini dialami oleh 90% orang dari total keseluruhan penderita diabetes di seluruh dunia yang rata-rata diakibatkan oleh kelebihan berat badan dan kurangnya aktivitas fisik, selain faktor resiko lain yang berperan sebagai penyebab penyakit ini.

Pada kondisi DM, berdasarkan WHO (2012), baik tipe 1 dan tipe 2, insulin merupakan suatu senyawa yang memiliki peran terbesar dalam menyebabkan diabetes. Insulin merupakan hormon yang diproduksi oleh pankreas yang berfungsi meregulasi gula darah di dalam tubuh. Insulin akan berikatan dengan reseptornya untuk dapat menjalankan fungsinya, yaitu meregulasi darah di dalam tubuh. Resistensi insulin merupakan faktor resiko terbesar DM 2 dan mengarah kepada kondisi ketika konsentrasi fisiologis insulin bekerja kurang efektif. Peningkatan konsentrasi insulin sebagai kompensasi perkembangan dari resistensi insulin yang berdampak pada penurunan pengambilan dan pemanfaatan glukosa di dalam tubuh (Han *et al.*, 2012).

Resistensi insulin merupakan gangguan metabolik yang dikarakterisasi oleh penurunan kemampuan jaringan-jaringan yang sensitif terhadap insulin dan ditandai oleh penurunan metabolisme glukosa sebagai respon terhadap insulin yang dihasilkan dari interaksi kompleks antara faktor-faktor genetik dan lingkungan, serta biasanya dikaitkan dengan beberapa penyakit seperti DM 2, hipertensi, obesitas dan jantung koroner

(Liu *et al.*, 2011). Selain itu, pemberian produk dengan kandungan *high-fructose diet* dapat mengubah tahapan awal transduksi sinyal insulin yang memiliki peran penting dalam penginduksian resistensi insulin (Qin *et al.*, 2004).

Konduksi sinyal insulin (*insulin signaling*) pada otot rangka diawali dengan terikatnya insulin dengan reseptor di membran sel, lalu ikatan insulin-reseptor akan mengaktifkan aktivitas intrinsik dari tirosin kinase insulin reseptor dan menyebabkan auto-fosforilasi insulin reseptor β -subunit, serta tirosin terfosforilasi pada IRS-1. Tirosin terfosforilasi IRS-1 merekrut subunit p85 dari PI3-kinase ke membran sel. Pada membran sel, PI3-kinase akan memfosforilasikan PIP_2 (*phosphatidyl-inositol-3-4-biphophate*) menjadi PIP_3 (*phosphatidyl-inositol-3,4,5-triphosphate*), dan akan meningkatkan ikatan protein PIP_3 yang Akt dan PDK-1 ke membran sel. Ketika Akt berada pada membran sel, akan difosforilasi oleh PDK-1 pada Thr dan TORC2 pada Ser. Pengaktifan Akt, AS160 akan difosforilasi yang akan menyebabkan translokasi GLUT-4 ke membran sel sehingga glukosa dari darah dapat masuk ke dalam sel (Lark, 2010).

Pada penelitian ini, pengujian aktivitas perbaikan resistensi insulin dari ekstrak biji jintan hitam dilakukan dengan pengukuran konsentrasi tirosin terfosforilasi pada *insulin receptor substrat-1* (IRS-1) karena IRS-1 memiliki konsentrasi terbesar dari insulin receptor tirosin kinase dan terbukti dapat mengaktifasi *phosphatidylinositol* (PI)3-kinase dan mendukung dalam translokasi dari GLUT-4 (Ura *et al.*, 1996). IRS-1 merupakan salah satu substrat selular yang berperan pada proses pengikatan insulin yang menginisiasi kaskade fosforilasi. IRS-1 juga

memiliki fungsi yang penting untuk menghubungkan reseptor tirosin kinase dengan proses-proses selular di dalam tubuh (Hotamisligil *et al.*, 1994). Griffin *et al.* (1999) menemukan bahwa penurunan ambilan glukosa memiliki hubungan yang signifikan dengan penurunan tirosin terfosforilasi pada IRS-1. Selain itu, letak senyawa tersebut pada jaringan otot dan lemak sehingga mempermudah proses observasi dengan melakukan metode pembedahan sederhana (Hotamisligil *et al.*, 1994).

Biji jintan hitam merupakan tanaman herbal yang banyak digunakan sebagai bumbu dan pengawet makanan, serta terapi pencegahan atau pengobatan berbagai macam penyakit, salah satunya antidiabetes dan hiperglikemi yang telah dilaporkan pada beberapa studi ilmiah *in vivo* dan *in vitro* (Meral *et al.*, 2001; Al-Awadi *et al.*, 1985, 1987, 1991; Al-Hader *et al.*, 1993; Labhal *et al.*, 1999; El-Dakhkhny *et al.*, 2002; Fararh *et al.*, 2002, 2004; Kanter *et al.*, 2003; Rchid *et al.*, 2004; Le *et al.*, 2004). Ekstrak etanol biji jintan hitam terbukti memiliki efek terhadap aktivasi jalur AMPK (*adenosine monophosphate-activated protein kinase*) pada otot skelet sehingga terjadi peningkatan sintesis dan translokasi GLUT-4 yang akan berdampak pada peningkatan transport atau ambilan glukosa pada otot (Benhaddou-Andaloussi *et al.*, 2011). Aktivitas ekstrak tanaman herbal tersebut terhadap konsentrasi tirosin terfosforilasi pada IRS-1 yang juga berperan pada peristiwa pengikatan insulin terhadap reseptornya belum diketahui sehingga penelitian ini menekankan pada aktivitas ekstrak biji jintan hitam terhadap konsentrasi tirosin terfosforilasi pada IRS-1.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak biji jintan hitam meningkatkan sensitivitas insulin melalui pengukuran konsentrasi tirosin terfosforilasi pada insulin reseptor substrat-1?
2. Apakah terdapat korelasi antara konsentrasi glukosa darah puasa dan konsentrasi tirosin terfosforilasi pada insulin reseptor substrat-1?

1.1 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Menguji aktivitas peningkatan sensitivitas insulin dari ekstrak biji jintan hitam pada kondisi resistensi insulin melalui pengukuran konsentrasi insulin reseptor substrat-1 tirosin terfosforilasi dan korelasi konsentrasi insulin reseptor substrat-1 dengan glukosa darah puasa.

1.3.2 Tujuan Khusus

Menguji aktivitas peningkatan sensitivitas insulin dari ekstrak biji jintan hitam dengan beberapa nilai dosis melalui pengukuran tirosin terfosforilasi pada insulin reseptor substrat-1 dan korelasinya dengan glukosa darah puasa pada jaringan otot tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar model DM 2.

1.2 Manfaat Penelitian

- Terhadap pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi

Dapat memberikan informasi tambahan mengenai manfaat ekstrak biji jintan hitam pada kondisi resistensi insulin dengan memberikan

kontribusi pemikiran bahwa ekstrak biji jintan hitam dapat meningkatkan tirosin terfosforilasi pada IRS-1 sehingga dapat meningkatkan sensitivitas insulin agar dapat dikembangkan untuk penelitian selanjutnya mengenai penggunaan ekstrak biji jintan hitam untuk penyakit-penyakit yang berhubungan dengan resistensi insulin.

- Terhadap pelayanan kesehatan kepada pasien
Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk memberikan dukungan terhadap penggunaan etnofarmasi dari ekstrak biji jintan hitam untuk kondisi resistensi insulin bagi masyarakat.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes

2.1.1 Defenisi dan Klasifikasi Diabetes

Diabetes, menurut FDA, merupakan gangguan yang terjadi pada populasi heterogen yang dikarakterisasi oleh kondisi hiperglikemi yang persisten. Diabetes, menurut WHO, merupakan penyakit kronis yang muncul ketika pankreas sudah tidak dapat memproduksi insulin secara cukup atau ketika tubuh tidak dapat lagi menggunakan insulin yang diproduksi secara efektif. Insulin merupakan suatu hormon yang meregulasi glukosa dalam darah. Seseorang dikatakan mengalami diabetes ketika gula darah puasanya $\geq 7,0$ mmol/L.

Diabetes Mellitus, menurut WHO (2012), dibagi menjadi dua, yaitu Diabetes Mellitus tipe 1 dan Diabetes Mellitus tipe 2.

a. Diabetes Mellitus tipe 1 (DM 1)

DM tipe 1 atau biasa disebut dengan *insulin-dependent* yang biasa diderita oleh anak-anak hingga remaja, dikarakterisasi oleh kekurangan produksi insulin dan membutuhkan penambahan insulin per harinya. Penyebab dari kondisi ini tidak diketahui dan tidak dapat dicegah dengan ilmu pengetahuan yang ada saat ini. Gejala yang dapat ditimbulkan adalah ekskresi urin yang berlebih (*polyuria*), rasa haus berlebih (*polydipsia*), rasa lapar yang bersifat

konstan, penurunan berat badan, gangguan penglihatan, serta kelelahan.

b. Diabetes mellitus tipe 2 (DM 2)

DM 2 atau biasa dikenal dengan *non-insulin-dependent*, yang kebanyakan penderitanya adalah orang dewasa, merupakan kondisi dimana tubuh tidak dapat menggunakan atau mengolah insulin secara efektif. DM 2 diderita oleh 90% pasien diabetes di seluruh dunia dan secara umum diakibatkan oleh kelebihan berat badan atau obesitas ($\geq 120\%$ berat badan ideal atau indeks massa tubuh $\geq 30 \text{ kg/m}^2$) dan kurangnya aktivitas tubuh. Gejala dari DM 2 bisa sama dengan DM tipe 1, tetapi lebih sering tidak terdeteksi. Oleh karena itu, diagnosis terhadap DM 2 baru bisa ditegakkan setelah beberapa tahun setelah onset, ketika komplikasi telah muncul. Beberapa komplikasi dari diabetes mellitus adalah kerusakan pada hati, pembuluh darah, mata, ginjal, dan saraf.

2.1.2 Patofisiologi Diabetes Mellitus Tipe 2

Obesitas memiliki kontribusi terbesar dalam terjadinya resistensi insulin pada DM 2. Peningkatan resistensi insulin dengan obesitas secara langsung berhubungan dengan jumlah dari *visceral adipose tissue* (VAT). VAT merupakan sel lemak yang terdapat pada *abdominal cavity* dan termasuk *omental*, *mesenteric*,

retroperitoneal, dan *perinephric adipose tissue*. Jaringan lemak ini terbukti lebih banyak di lipolisis daripada lemak subkutan, menyebabkan peningkatan pada produksi *free fatty acid* (FFA). FFA akan dilepaskan ke sirkulasi portal dan dialirkan menuju liver yang menyebabkan stimulasi terhadap produksi *very-low-density lipoprotein* (VLDL) di liver dan penurunan sensitivitas insulin di jaringan perifer (Singla *et al.*, 2010)

Sebanyak 25% glukosa dalam tubuh diubah menjadi glikogen di otot yang merupakan organ yang sangat bergantung pada insulin. Pada *fasting state* sekitar 85% produksi glukosa berasal dari liver dan sisanya diproduksi oleh ginjal. Mekanisme *counter regulation* glukagon merupakan senyawa yang diproduksi oleh sel alfa pankreas melalui mekanisme *counter regulation* dari kerja insulin. Glukagon bekerja berlawanan dengan insulin dan meningkatkan produksi glukosa hepatic. Jadi, glukagon merupakan senyawa yang dapat mencegah terjadinya hipoglikemia atau mengembalikan kondisi normoglikemia jika terjadi hipoglikemia. Pada *fed state*, proses pencernaan karbohidrat meningkatkan konsentrasi glukosa darah dan menstimulasi pelepasan insulin dari sel beta pankreas. Akibat dari hiperinsulinemia, yaitu penghambatan produksi glukosa hepatic dan stimulasi ambilan glukosa oleh jaringan perifer (Dipiro *et al.*, 2008)

2.1.3 Mekanisme *Insulin Signaling*

Insulin receptor (IR) merupakan suatu heterotetramer yang terdiri dari dua subunit alpha dan dua subunit beta yang dihubungkan oleh ikatan disulfida. Insulin terikat pada subunit alfa dari reseptor insulin dan mengaktifasi tirosin kinase pada subunit beta. Ketika tirosin kinase dari insulin reseptor diaktivasi akan menyebabkan terjadinya autofosforilasi dari subunit beta, dimana fosforilasi dari ketiga residu tirosin (Tyr-1158, Tyr-1162, dan Tyr-1163) dibutuhkan untuk amplifikasi dari aktivitas kinase (White *et al.*, 1988)

Kebanyakan dari efek metabolik dan antiapoptosis dari insulin dimediasi oleh *signaling pathway* yang melibatkan proses fosforilasi dari protein *insulin receptor substrate* (IRS), serta aktivasi phosphatidylinositol (PI) 3-kinase, protein kinase B (Akt), target molekular dari rapamycin (mTOR), dan p70 S6 kinase. Reseptor insulin tirosin kinase memfosforilasi protein IRS (IRS-1 dan IRS-2), dan residu *phosphotirosin* pada protein IRS menjadi target yang baik untuk p85 regulatory subunit dari PI3-kinase (Alessi *et al.*, 1998)

Aktivasi dari PI3-kinase menghasilkan *3'-phosphoinositide* [*phosphatidyl-inositol-3-4-biphosphate* (PIP2) dan *phosphatidyl-inositol-3,4,5-triphosphate* (PIP3)] yang terikat pada *phosphoinositiddependent kinase 1* (PDK1). PDK memiliki substrat yang diketahui merupakan protein kinase B (PKB) dan juga merupakan bentuk atipikal dari protein kinase C (PKC). Protein

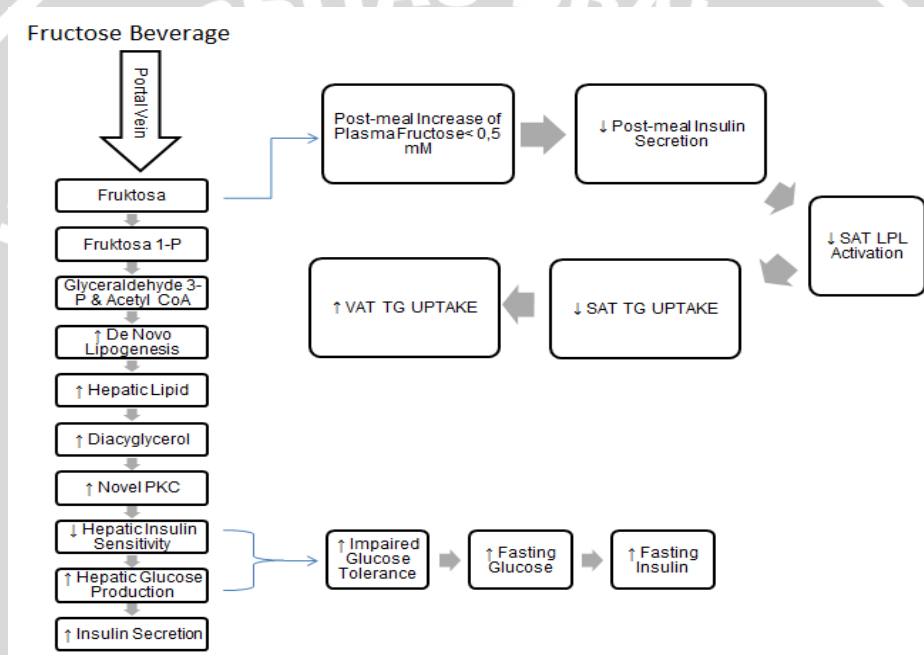
kinase B juga dikenal dengan nama *serine/threonine kinase Akt* yang merupakan pemicu efek insulin pada liver, contohnya sintesis glikogen dan mensupresi produksi dari glukosa hepatic (Saini, 2010).

PKB memiliki peran yang penting dengan menghubungkan *glucose transporter (GLUT4)* kepada *signaling pathway* sehingga terjadi aktivasi GLUT4. Aktivasi GLUT4 ditandai dengan berpindahnya GLUT4 ke permukaan sel untuk mentransport glukosa ke dalam sel (Kotani *et al.*, 1998)

2.1.4 Mekanisme Fruktosa menyebabkan Gangguan Toleransi Glukosa

Pada beberapa penelitian dinyatakan bahwa konsumsi fruktosa pada manusia meningkatkan *visceral adiposity*, *lipid dysregulation*, dan penurunan sensitivitas insulin, yang semua hal tersebut berhubungan dengan peningkatan resiko penyakit kardiovaskular dan DM 2. Stanhope & Havel (2010) menyatakan bahwa metabolisme glukosa hepatic diatur oleh fosfofruktokinase, yang dihambat oleh ATP dan sitrat ketika status energi tinggi, sehingga membatasi penyerapan diet glukosa hepatic. Hal ini memungkinkan banyak glukosa yang masuk ke dalam tubuh melalui vena portal untuk menembus hepar dan mencapai sirkulasi sistemik. Fruktosa sebagian besar dimetabolisme melalui fruktokinase, yang tidak diatur berdasarkan status energi. Hal ini menyebabkan penyerapan fruktosa yang lebih besar oleh hepar

dengan sedikit konsumsi fruktosa yang mencapai sirkulasi. Fruktosa yang dimetabolisme oleh fruktokinase menjadi fruktosa 1-p di hepar menyebabkan peningkatan produksi substrat lipogenik, *glyceraldehydes 3-P* dan *acetyl CoA*, dengan demikian mengarahkan kepada peningkatan DNL (*de novo lipogenesis*) (Stanhope & Havel, 2010).



Gambar 2.1 Mekanisme Fruktosa menyebabkan Gangguan Toleransi Glukosa

Peningkatan DNL setelah konsumsi fruktosa menghasilkan asam lemak untuk produksi hepatic TG sehingga meningkatkan lipid hepatic. Peningkatan suplai lipid hepatic juga dapat menginduksi resistensi insulin hepatic, kemungkinan melalui peningkatan kadar intrahepatik dari *diacylglycerol*, yang mengaktifasi novel-PKC. Novel-PKC menurunkan tirosin terfosforilasi dan/atau meningkatkan

fosforilasi serin dari reseptor insulin dan IRS-1, menyebabkan penurunan sensitivitas insulin, peningkatan produksi glukosa hepatic, dan peningkatan glukosa puasa dan konsentrasi insulin, serta gangguan toleransi glukosa. Penurunan insulin sebagai respon terhadap konsumsi fruktosa mengarahkan kepada penurunan aktivitas *insulin-mediated* LPL (*lipoprotein lipase activity*) pada SAT (*subcutaneous adipose tissue*), memperkenankan peningkatan penyerapan TG oleh VAT (*visceral adipose tissue*) (Stanhope & Havel, 2010).

2.1.5 Insulin Reseptor Substrat-1

Secara umum terdapat empat macam protein IRS, yaitu IRS-1, IRS-2, IRS-3, dan IRS-4. IRS-1 dan IRS-2 merupakan protein dengan kadar paling banyak terdistribusi secara luas di jaringan tubuh. IRS-1 merupakan IRS terbesar di otot rangka, sedangkan IRS-2 merupakan IRS penting di liver yang berfungsi dalam aktivitas perifer dari insulin dan pertumbuhan dari sel beta pankreas. IRS-3 terdapat pada jaringan adiposa, sel beta, dan liver, sedangkan IRS-4 ditemukan di timus, otak, dan ginjal. IRS yang telah terfosforilasi akan mengikat *src-homology-2 domain protein* (SH2) yang spesifik, yang meliputi enzim penting seperti PI3-kinase, *phosphotyrosin phosphatase SHPTP2* (Syp), dan protein lainnya yang bukan enzim, tetapi dapat menghubungkan IRS-1 dengan sistem konduksi sinyal intraseluler seperti protein adaptor Grb2 yang terhubung dengan jalur RAS (*rat sarcoma protein*) (Wilcox, 2005).

IRS-1 merupakan suatu substrat berupa protein dengan konsentrasi terbesar dari insulin receptor tirosin kinase dan terbukti dapat mengaktivasi *phosphatidylinositol* (PI)3-kinase dan mendukung dalam translokasi dari GLUT-4 (Ura *et al.*, 1996).

2.2 Biji jintan hitam

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi Jintan Hitam

Jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) merupakan tanaman seperti rumput yang tumbuh pada temperatur dan iklim daerah yang dingin dan memiliki warna bunga yang putih atau biru pucat dan memiliki biji berukuran kecil dan berwarna hitam. Tanaman ini bisa tumbuh hingga mencapai tinggi 40-70 cm. Daun jintan hitam berbentuk lanset dan bergaris dengan panjang 1,5-2 cm, ujung meruncing, serta memiliki tiga tulang daun yang berbulu. Bunganya memiliki lima kelopak bunga dengan bentuk bulat telur. Beberapa nama lain dari jintan hitam ini, yaitu *Habbat ul Sauda* (Arab), *Black Cumin* atau *Black Caraway* (Inggris), *Kalaunji* (India). Jintan hitam merupakan *family Ranunculaceae* yang tumbuh di tepian laut Mediterania, Pakistan, Siria, Lebanon, Israel, India, Eropa Selatan, serta di wilayah tropis lainnya atau merupakan tanaman asli dari wilayah Asia, dan tanaman yang diolah dan diadaptasikan di wilayah Eropa dan Afrika Utara. (El-Tahir *et al.*, 2006; Azadi *et al.*, 2010; Paraakh *et al.*, 2010; Benhaddou-Andaloussi *et al.*, 2011; Boseila *et al.*, 2011). Taksonomi dari jintan hitam adalah sebagai berikut (Khasanah, 2009).

<i>Kingdom</i>	:	Plantae
<i>Division</i>	:	Magnoliophyta
<i>Class</i>	:	Magnoliopsida
<i>Order</i>	:	Ranunculales
<i>Family</i>	:	Ranunculaceae
<i>Genus</i>	:	<i>Nigella</i>
<i>Species</i>	:	<i>N. sativa</i>

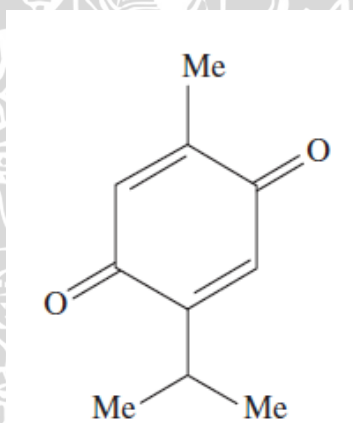
Bagian tanaman yang paling banyak digunakan adalah biji jintan hitam. Biji jintan hitam kecil dan pendek (panjang 2,5-3,5 mm dan lebar 1,5-2 mm), berwarna hitam, berbentuk trigonal, tampak seperti batu api jika diamati dengan mikroskop. Biji-biji ini berada dalam buah yang berbentuk bulat telur atau agak bulat (El-Tahir *et al.*, 2006; Khasanah *et al.*, 2009).

2.2.2 Penggunaan Ekstrak Biji Jintan Hitam sebagai Terapi Tambahan

Ekstrak biji jintan hitam banyak digunakan sebagai terapi tambahan untuk mengatasi berbagai penyakit, contohnya minyak atsiri jintan hitam digunakan untuk mengobati penyakit kulit secara topikal. Beberapa penggunaan lain dari ekstrak biji jintan hitam, yaitu mengatasi inflamasi, antimikroba, antikanker, analgesik, dan pengobatan pada gangguan gastrointestinal (Gilani *et al.*, 2004).

2.2.3 Kandungan Kimia yang Berperan pada Diabetes Mellitus Tipe 2

Ekstrak biji jintan hitam memiliki berbagai macam kandungan, salah satunya thymoquinon. Thymoquinon merupakan salah satu komponen *volatile oil* terbesar pada biji jintan hitam (El-Tahir *et al.*, 2006). Salah satu penelitian mengenai thymoquinon membuktikan bahwa terjadi penurunan serum glukosa dan peningkatan pada konsentrasi serum insulin yang rendah pada tikus yang diinduksi Streptozocin untuk menghasilkan kondisi diabetes (Paarakh, 2010). Bamosa *et al.* (2002) dan Badary *et al.* (2000) dalam jurnal Pourghassem-gargari *et al.* (2009) membuktikan bahwa thymoquinon memiliki efek hipolipidemik.



Gambar 2.2 Struktur Thymoquinon(Gali-Muhtasib *et al.*, 2006)

Kandungan kimia secara umum yang menjadi komposisi dari biji jintan hitam adalah sebagai berikut (El-Tahir *et al.*, 2006).

Tabel 2.1 Komposisi Kandungan Umum Biji Jintan Hitam

Kandungan	% Kadar (w/w)
Minyak	31-35,5
Protein	16-19,9
Karbohidrat	33-34
Fiber	4,5-6,5
Abu	3,7-7
Saponin	0,013
Kelembaban	5-7

Sumber: El-Tahir *et al.*, 2006

Komposisi Senyawa dari kandungan *oil* biji jintan hitam terdiri dari *fixed oil* (36-38%) dan *volatile oil* (0.4-2.5%) (Al-Attar, 2010). Beberapa contoh dari fixed oil adalah sebagai berikut (El-Tahir *et al.*, 2006).

Tabel 2.2 Komposisi Senyawa pada *Fixed Oil* Biji Jintan hitam

Kandungan	% Kadar (w/w)
Asam Linoleat	44,7-56
Asam Oleat	20,7-24,6
Asam Linolenat	0,6-1,8
Asam Arasidat	2-3
Asam Palmitoleat	3
Asam Eikosadienoat	2-2,5
Asam Palmitat	12-14,3
Asam Stearat	2,7-3
Asam Miristat	0,16
Sterol	0,5

Sumber: El-Tahir *et al.*, 2006

Komposisi senyawa kandungan utama *volatile oil* biji jintan hitam adalah sebagai berikut (Al-Attar, 2010)

Tabel 2.3 Komposisi Kandungan Utama *Volatile Oil* Biji Jintan Hitam

Kandungan	% Kadar (w/w)
<i>Thymoquinone</i>	27,8-57,0
<i>p-cymene</i>	7,1-15,5
<i>Caevacrol</i>	5,8-11,6
<i>t-anethole</i>	0,25-2,3
<i>4-terpineol</i>	2,0-6,69
<i>Longifenoline</i>	1,0-8,0

Sumber: Al-Attar, 2010

2.2.4 Potensi ekstrak Biji Jintan Hitam sebagai Antidiabetes

Ekstrak etanol biji jintan hitam secara *in vitro* terbukti dalam meningkatkan sekresi insulin, induksi proliferasi sel beta pankreas, dan stimulasi ambilan glukosa pada sel otot dan lemak. Pada penelitian *in vivo* didapatkan bahwa ekstrak biji jintan hitam memiliki efek sebagai antidiabetik ketika dicobakan pada model diabetes mellitus tipe 1 (Benhaddou-Andaloussi *et al.*, 2011)

Salah satu penelitian mengenai mekanisme kerja ekstrak biji jintan hitam sebagai antidiabetes memberikan hasil bahwa ekstrak biji jintan hitam bekerja menurunkan kadar gula darah dengan mencegah glukoneogenesis, menjaga dan memperbaiki integritas sel beta langerhan, dan insulinotropik (memicu sekresi insulin). Peningkatan glukoneogenesis di hepar menjadi salah satu penyebab hiperglikemia sehingga mekanisme pencegahan ekstrak biji jintan hitam, terutama kandungan thymoquinonnya, memiliki peran dalam penurunan glukoneogenesis diduga melalui hambatan

enzim kunci dalam proses glukoneogenesis, yaitu *glucose-6-phosphatase* dan *fructose-1,6-biphosphatase*. Selain itu, thymoquinon juga terbukti meningkatkan ambilan glukosa di jaringan perifer (Fararh, 2005; Houchner, 2007; Bilal, 2008)

Aktivitas lain dari ekstrak biji jintan hitam adalah sebagai antioksidan, yaitu mencegah terjadinya stres oksidatif yang berdampak pada ketidakseimbangan produksi radikal bebas intraseluler dan mekanisme pertahanan seluler. Kedua hal ini akan menyebabkan peningkatan kematian sel beta secara khusus pada kasus diabetes mellitus (Kanter, 2004; Kaleem, 2006).

2.3 Pengukuran Insulin Reseptor Substrat-1 dengan ELISA

ELISA merupakan singkatan dari *enzym-linked immunosorbent assay* dan metode yang sangat berguna untuk memperkirakan kuantitas material yang terkandung dalam suatu larutan, misalnya serum, urin, sperma dan supernatan dari kultur (Savige *et al.*, 1998). Prinsip dasar dari ELISA adalah penggunaan enzim untuk mendeteksi ikatan antigen dan antibodi. Enzim tersebut akan mendeteksi ikatan dengan melakukan perubahan warna dari warna awal. Pada metode ini akan digunakan *plate* sebagai wadah dari antibodi dan antigen sehingga keduanya dapat membentuk ikatan. Ikatan tersebut biasanya terbentuk pada suhu 4°C dan memerlukan waktu semalaman sehingga ikatan yang terbentuk benar-benar sempurna (Ma *et al.*, 2006).

Pada beberapa penelitian mengenai penentuan konsentrasi fosforilasi protein *insulin receptor substrate-1* (IRS-1), metode ELISA dapat

digunakan sebagai penentu kadar fosforilasi dari protein IRS-1 (Rocha *et al.*, 1997; Stefan *et al.*, 2002)

2.4 Metformin sebagai terapi Antidiabetes

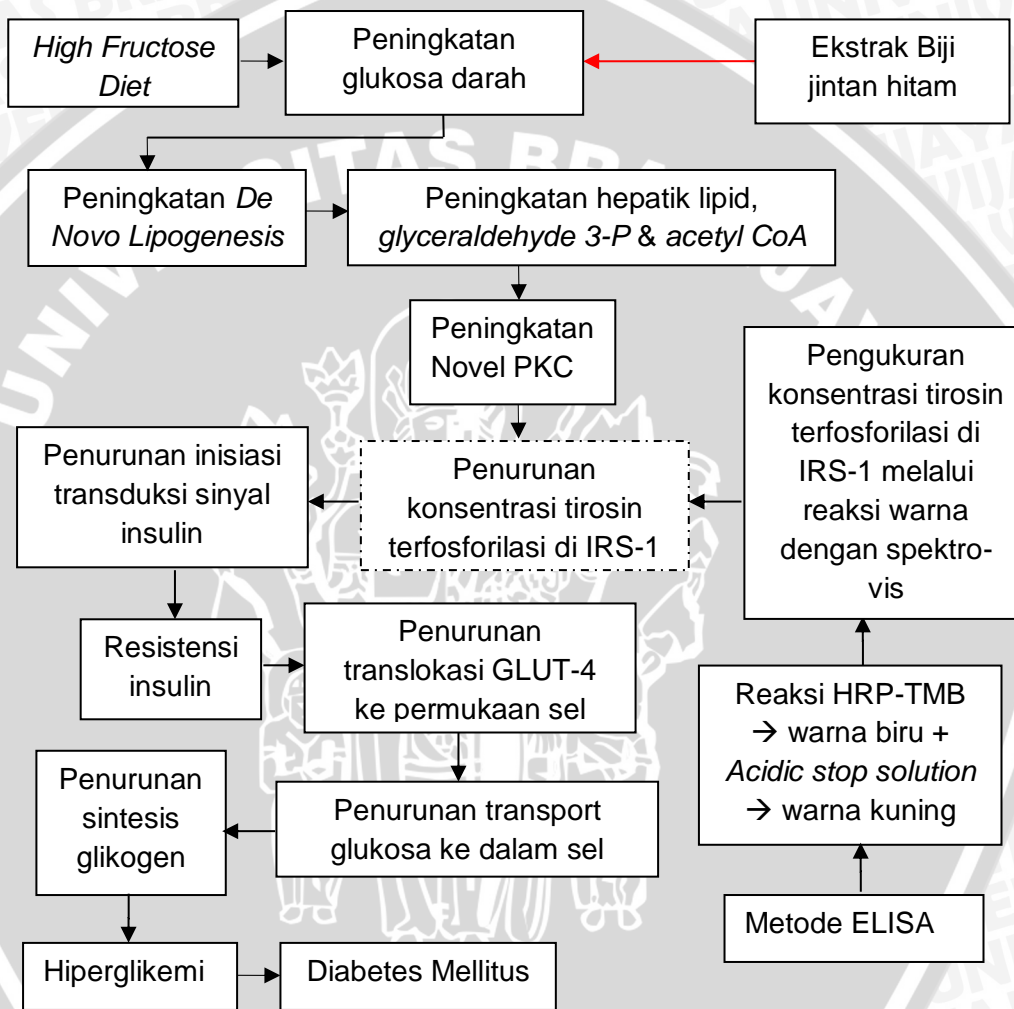
Metformin (golongan biguanide) digunakan sebagai salah satu terapi dari Antidiabetes yang bekerja dengan cara menurunkan gula darah pada DM 2. Pada Martindale (2009) dikemukakan bahwa metformin memiliki banyak kemungkinan mekanisme kerja. Mekanisme utama dari terapi ini adalah meningkatkan transport glukosa menembus membran sel pada jaringan otot. Salah satu penelitian *in vitro* (Tanaka *et al.*, 1997) membuktikan salah satu mekanisme kerja metformin adalah menghambat pembentukan produk akhir glikosilasi tingkat lanjut.

Kumar *et al.* (2002) membuktikan bahwa pemberian metformin selama 24 jam pada kultur jaringan otot dapat meningkatkan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 sebanyak 45% pada kultur sel jaringan otot yang diberikan injeksi insulin sebesar 100 nm selama 3 hari dan 90% pada sel jaringan otot dengan 0.05% BSA tanpa injeksi insulin. Penelitian Yuan *et al.* (2003) juga membuktikan peningkatan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 pada kultur sel jaringan otot dengan konsentrasi metformin 0.01 mmol/L dan 0.1 mmol/L.

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Bagan Konseptual

Keterangan:

- : Jalur mekanisme kerja
- (red) : Hambatan
- - - - : Variabel yang diteliti



Pemberian *high-fructose diet* akan meningkatkan kadar glukosa dalam darah, khususnya glukosa darah puasa dimana pemberian biji jantan hitam diharapkan dapat menurunkan kadar glukosa darah puasa tikus. Fruktosa dimetabolisme oleh fruktokinase menjadi fruktosa 1-p di hepar menyebabkan peningkatan produksi substrat lipogenik, *glyceraldehydes 3-P* dan *acetyl CoA*, dengan demikian mengarahkan kepada peningkatan de novo lipogenesis (DNL). Peningkatan DNL setelah konsumsi fruktosa menghasilkan asam lemak yang akan meningkatkan suplai lipid hepatic. Peningkatan suplai lipid hepatic dapat menginduksi resistensi insulin, kemungkinan melalui peningkatan kadar intrahepatik dari *diacylglycerol*, yang mengaktivasi novel PKC. Aktivasi novel PKC akan berdampak pada penurunan tirosin terfosforilasi di IRS-1 (Stanhope & Havel, 2010).

Pengukuran konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 diharapkan mampu menggambarkan kondisi resistensi insulin di dalam tubuh tikus Wistar. Penurunan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 tersebut mengakibatkan penurunan inisiasi transduksi sinyal insulin yang mengakibatkan terjadinya resistensi insulin. Pada resistensi insulin, transport GLUT-4 ke permukaan sel akan menurun sehingga translokasi glukosa ke dalam sel juga akan menurun.

Penurunan transport glukosa ke dalam sel akan menurunkan proses sintesis glikogen. Sekitar 60% glukosa dalam tubuh diserap di liver yang berfungsi untuk sintesis glikogen. Pada kondisi resistensi insulin, sintesis glikogen akan menurun sehingga kadar glukosa dalam darah meningkat atau disebut dengan hiperglikemi (Dipiro *et al.*, 2008).

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Ekstrak biji jintan hitam dapat meningkatkan sensitivitas insulin melalui peningkatan konsentrasi tirosin terfosforilasi pada IRS-1.
2. Peningkatan konsentrasi tirosin terfosforilasi pada IRS-1 memiliki korelasi dengan penurunan konsentrasi glukosa darah puasa.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini telah mendapatkan surat keterangan kelaikan etik (*Ethical Clearance*) NO. 236A / EC / KEPK / 05 / 2013 / yang telah disetujui dan dikeluarkan pada tanggal 31 Mei 2013 oleh Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Komisi Etik Penelitian dan Kesehatan.

4.1.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan desain *posttest group* untuk menguji aktivitas peningkatan sensitivitas insulin dari ekstrak biji jintan hitam dilihat melalui pengukuran konsentrasi tirosin terfosforilasi pada IRS-1 pada tikus (*Rattus norvegicus*) wistar yang diberikan asupan fruktosa selama 6 minggu dan pengukuran konsentrasi fosforilasi IRS-1 dengan metode ELISA. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara pembedahan sederhana pada jaringan otot tikus yang diikutsertakan di dalam penelitian.

4.1.2 Jenis Data

Penelitian ini menggunakan jenis data primer yang didapatkan dari hasil pengukuran konsentrasi tirosin terfosforilasi pada IRS-1 yang diambil dari jaringan otot tikus wistar dengan menggunakan *enzyme linked-immunoassay (ELISA) reader*.

4.2 Sampel Penelitian

4.2.1 Sampel

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan berusia 8 minggu dengan berat badan berkisar antara 150-220 gram (Widad *et al.*, 2011). Pemilihan sampel ini didasarkan oleh kemampuan sampel dalam mensimulasikan kondisi DM 2, penanganan yang mudah, dan harga yang terjangkau (Javia *et al.*, 2011)

4.2.2 Besar Sampel

Estimasi jumlah sampel dihitung menggunakan rumus Federer (Federer, 1991), yaitu:

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

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

dimana n adalah jumlah sampel tiap kelompok, yaitu 4 tikus tiap kelompoknya dan t adalah jumlah perlakuan, yaitu 6 perlakuan sehingga didapatkan total tikus, yaitu 24 ekor.

Kelompok uji dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Kelompok kontrol negatif (P_n): 4 ekor tikus wistar model DM 2 diberikan pelarut ekstrak biji jintan hitam, yaitu etanol+aquades selama 30 hari.

- b. Kelompok perlakuan (P_1): 4 ekor tikus wistar model DM 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 24 mg/kg/hari selama 30 hari.
- c. Kelompok perlakuan (P_2): 4 ekor tikus wistar model DM 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 48 mg/kg/hari selama 30 hari.
- d. Kelompok perlakuan (P_3): 4 ekor tikus wistar model DM 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 96 mg/kg/hari selama 30 hari.
- e. Kelompok perlakuan (P_p): 4 ekor tikus wistar model DM 2, diberikan metformin dengan dosis yang sesuai dengan berat badan tikus, yaitu 150-220 gram (Lampiran 2).
- f. Kelompok normal (P_0): 4 ekor tikus wistar model DM 2, tidak diinduksi DM 2 dan tidak mendapat perlakuan.

Penentuan dosis ekstrak biji jintan hitam berdasarkan salah satu penelitian, yaitu dosis 48 mg/kg/hari atau setara dengan 2 gram tanaman/kg/hari terbukti efektif sebagai agen antidiabetes (Benhaddou-Andaloussi *et al.*, 2011).

4.2.3 Prosedur Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari subyek yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai subyek penelitian. Teknik pengambilan sampel memakai metode randomisasi sederhana, yaitu sistem *lotree* sebanyak 2 kali, setelah dilakukan perhitungan besar sampel minimal. *Lotree* pertama menentukan perlakuan yang akan diambil

terlebih dahulu, sedangkan *lotree* kedua untuk mengelompokkan tikus.

Pada *lotree* pertama (penentuan perlakuan), terdapat 6 macam kertas, yaitu P_n , P_1 , P_2 , P_3 , P_p , P_0 . Kertas yang keluar lebih dulu adalah kelompok perlakuan yang lebih dulu ditentukan anggotanya, lalu kertas yang sudah, tidak dimasukkan kembali. Selanjutnya *lotree* kedua (pengelompokkan hewan coba), diawali dengan memisahkan hewan coba berdasarkan jenis kelamin, masing-masing kelompok diberi nomor 1-20. Kemudian, tiap kelompok jenis kelamin di *lotree* untuk dikelompokkan lagi sehingga terbentuk kelompok tertentu. Nomor *lotree* yang sudah keluar, tidak dimasukkan kembali.

4.2.4 Kriteria Subyek

Subyek dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar karena dapat mensimulasikan kondisi DM 2, penanganan mudah dan harga terjangkau. Kriteria tikus yang digunakan adalah sebagai berikut.

a. Kriteria inklusi

- Berjenis kelamin jantan
- Usia 8 minggu karena pada usia tersebut tikus telah dewasa
- Berat badan 150-220 gram

- b. Kriteria eksklusi
 - Tikus dengan DM sebelum dilakukan induksi diabetes mellitus tipe 2

4.3 Variabel Penelitian dan Defenisi Operasional

4.3.1 Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas

Dalam penelitian ini adalah ekstrak biji jintan hitam dosis 24 mg/kg/hari, 48 mg/kg/hari, dan 96 mg/kg/hari.
- b. Variabel terikat

Dalam penelitian ini adalah konsentrasi tirosin terfosforilasi *insulin receptor substrate-1* (IRS-1) pada jaringan otot dihitung dengan menggunakan ELISA. Jika konsentrasi tirosin terfosforilasi pada IRS-1 meningkat pada jaringan otot, maka akan meningkatkan transport glukosa dari intraseluler ke membran sel.

4.3.2 Definisi Operasional

- a. Diabetes, berdasarkan WHO, merupakan penyakit kronis yang muncul ketika pankreas tidak dapat memproduksi insulin dengan cukup atau ketika tubuh tidak dapat menggunakan insulin yang diproduksi secara efektif (resistensi insulin). DM pada penelitian ini difokuskan pada

DM 2 yang menurut WHO merupakan kondisi saat tubuh tidak menggunakan insulin secara efektif.

- b. Resistensi insulin merupakan kondisi ketika tubuh tidak dapat menggunakan insulin yang diproduksi secara efektif. Kondisi ini ditandai dengan penurunan konsentrasi tirosin terfosforilasi di jaringan otot. Pada penelitian ini, resistensi insulin dibuat dengan cara pemberian fruktosa selama 6 minggu berdasarkan salah satu penelitian yang menggunakan metode induksi fruktosa tinggi pada tikus Wistar tahun 2003 oleh Qin *et al.*
- c. Ekstrak Biji jintan hitam yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari UPT Batu Materia Medika.
- d. Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar berusia 8 minggu dengan berat badan tiap ekornya berkisar antara 150-220 gram. Pemilihan hewan coba ini karena tikus putih dapat mensimulasikan kondisi diabetes mellitus tipe 2 setelah dilakukan induksi fruktosa.
- e. Konsentrasi fosforilasi IRS-1 pada penelitian ini merupakan konsentrasi fosforilasi IRS-1 pada jaringan otot yang akan mengekspresikan kadar glukosa dalam tubuh akibat resistensi insulin. IRS-1 merupakan salah satu substrat

selular berupa protein yang berperan pada proses pengikatan insulin yang menginisiasi kaskade fosforilasi.

- f. ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) merupakan uji yang menggunakan teknik immunoassay enzim berlapis kuantitatif. Spesifik antibodi untuk *insulin receptor substrat-1* (IRS1) yang disediakan dalam bentuk jadi atau telah disediakan dalam bentuk lempeng. Standar dan sampel yang mengandung IRS-1 akan terikat dengan antibodi tersebut dan dengan berbagai prosedur setelahnya akan didapatkan warna yang dapat diukur.

4.4 Instrumen Analisis

Konsentrasi tirosin terfosforilasi insulin reseptor substrat-1 (IRS-1) pada jaringan otot tikus dihitung menggunakan ELISA yang selanjutnya diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer-vis pada panjang gelombang 450 nm. Konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 diketahui dengan memasukkan nilai absorbansi ke dalam kurva baku.

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

Pada penelitian ini, bahan yang digunakan dikelompokkan berdasarkan metode masing-masing, yaitu sebagai berikut.

- a. Bahan untuk pemeliharaan tikus: sekam sebagai alas kandang tikus, alkohol 70% untuk memandikan tikus, dan

pakan comfeed PAR-S dan tepung terigu dengan perbandingan 2:1 (makanan standar tikus). Kandungan zat gizi dan energi per 100 gram bahan diet normal tikus adalah sebagai berikut.

Tabel 1.4 Kandungan Zat Gizi dan Energi per 100 gram

Bahan Diet Normal Tikus(Anggraeni et al., 2009)

Zat Gizi	Comfeed PAR-S	Tepung Terigu
Energi (kkal)	344	340
Protein (gram)	19	11
Lemak (gram)	4	0.9
Karbohidrat (gram)	58	72

Tikus dengan diet normal membutuhkan 102 kkal yang bersumber dari comfeed PAR-S dan tepung terigu (Anggraeni *et al.*, 2009), sedangkan 1 gram fruktosa setara dengan 3.9 kkal energi (Roberfroid, 1999). Fruktosa yang akan diberikan kepada tikus adalah sebesar 60% dari 102 kkal atau sama dengan 61.2 kkal. Fruktosa yang dibutuhkan untuk mencapai 61.2 kkal adalah sebesar 15.66 gram. Setiap gram diet normal mengandung energi sebesar 6.8 kkal sehingga untuk mendapatkan 40% dari jumlah kalori yang dibutuhkan sehari (40.8 kkal) membutuhkan 6 gram diet normal dengan rincian 4 gram dari comfeed PAR-S dan 2 gram dari tepung terigu.

- b. Bahan untuk pembuatan ekstrak biji jintan hitam: serbuk biji jintan hitam sebanyak 1 kg yang didapatkan dari Batu Materia Medika, Kota Batu, Provinsi Jawa Timur. Pelarut ekstraksi yang digunakan adalah etanol dan aquadest dengan perbandingan 80:20.
- c. Bahan uji standarisasi ekstrak
- Parameter Susut Pengerinan: ekstrak biji jintan hitam sebanyak 1-2 gram dan silika pengering.
 - Parameter Kadar Abu: biji jintan hitam sebanyak 2-3 gram, krus silikat, air panas, dan kertas saring.
 - Parameter Organoleptik: ekstrak biji jintan hitam secukupnya.
- d. Uji Fitokimia Kualitatif
- Minyak atsiri: ekstrak biji jintan hitam dan Sudan III.
 - Protein: ekstrak biji jintan hitam dan asam nitrat.
 - Alkaloid: ekstrak biji jintan hitam, reagen Meyer, reagen Dragendroff, reagen wagner.
 - Saponin: ekstrak biji jintan hitam dan aquadest.
- e. Bahan untuk prosedur euthanasia: ketamin HCl 0,2 mL di ad 0,5 mL dengan water for injection.
- f. Bahan untuk pembuatan homogenat jaringan otot: jaringan otot tikus, *Buffer lysis* (EDTA 0,0074 g, NaCl 0,8775 g, NP 40 0,125 g, Protease Inhibitor Cocktail (PIC) merk Sigma 50 µl, Tris Base 0,1211 g, dan PMSF 0,009 g).

- g. Bahan untuk pengukuran konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 menggunakan ELISA: Anti-phospho-IRS1 (Tyr 1222) polyclonal antibody, anti-rabbit IgG biotin, antigen sampel, *Phosphate Buffered Saline* (PBS), *Washing buffer* (PBS-T), *Labeled detection* antibodi, HRP subtrat (TMB), HRP *stop solution*.

4.5.2 Alat Penelitian

- a. Alat untuk Pemeliharaan Tikus
Kandang pemeliharaan hewan coba, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, dan tempat makan.
- b. Alat untuk Pembuatan Ekstrak biji jintan hitam
Timbangan digital untuk menimbang sampel, gelas beker sebagai wadah dalam proses maserasi, batang pengaduk, *Buchner funnel* untuk menghasilkan filtrat serta rotari evaporator untuk memekatkan ekstrak.
- c. Alat Uji Standar Ekstrak
Tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, dan gelas arloji.
- d. Fitokimia Kualitatif
Alat yang digunakan untuk uji fitokimia kualitatif adalah tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, dan gelas arloji.
- e. Alat Pemberian Ekstrak Biji jintan hitam pada Tikus

Timbangan OHAUS dengan kapasitas maksimal penimbangan 250 gram dengan ketelitian 0.1 mg, mortar, gelas ukur, pengaduk, sonde lambung tikus.

- f. Alat Pembedahan Tikus
Pisau bedah, papan bedah, pinset, dan vorteks.
- g. Alat Pembuatan Homogenat Jaringan Otot: mortar, stemper, sentrifuga.
- h. Alat Pengujian Konsentrasi Tirosin terfosforilasi Insulin Reseptor Subtrat-1
ELISA kit dengan sensitivitas tinggi dan spesifisitas yang sempurna untuk mendeteksi konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 pada jaringan otot tikus.

4.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk perawatan dan perlakuan hewan coba, sedangkan untuk pengujian konsentrasi tirosin terfosforilasi pada IRS-1 dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pembuatan ekstrak biji jintan hitam dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Brawijaya.

Waktu penelitian dimulai pada Februari 2013 setelah mendapatkan persetujuan etik dan berakhir pada minggu terakhir Juni 2013.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Penyiapan Ekstrak Biji Jintan Hitam

Tahap penyiapan ekstrak biji jintan hitam adalah sebagai berikut (Houchner, 2007).

- a. Dimasukkan 400 gram serbuk biji jintan hitam ke dalam toples kaca bertutup.
- b. Ditambahkan 80% aquadest-etanol sebanyak 4 liter ke dalam toples, aduk *ad homogen*, lalu toples ditutup. Didiamkan hingga 24 jam.
- c. Disaring hasil maserasi menggunakan corong dan kertas saring, residu penyaringan dimaserasi kembali dengan 50% methanol selama 2 jam, diulangi sekali lagi.
- d. Disatukan hasil ekstraksi pertama dan ekstraksi residu. Kemudian, dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu kurang dari 40°C hingga pelarut menguap.

4.7.2 Uji Standarisasi Ekstrak

Metode uji standarisasi ekstrak berdasarkan parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat yang diterbitkan oleh Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM) RI tahun 2000:

- a. Parameter Susut Kering
 - Ditimbang ekstrak 1 gram sampai 2 gram secara seksama.

- Dimasukkan ke dalam botol timbang tertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara.
- Sebelum ditimbang, diratakan ekstrak dalam botol menggunakan batang pengaduk hingga mencapai tebal 5 mm sampai 10 mm.
- Dimasukkan ke dalam ruang pengering dengan keadaan botol terbuka, dikeringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap.
- Sebelum setiap pengeringan berikutnya, dibiarkan botol dalam keadaan tertutup mendingin dalam eksikator hingga suhu kamar.
- Jika ekstrak sulit kering dan mencair pada pemanasan, ditambahkan 1 gram silika pengering yang telah ditimbang seksama setelah dikeringkan dan disimpan dalam eksikator suhu kamar.
- Dicampurkan silika ke dalam ekstrak, kemudian dikeringkan kembali pada suhu penetapan hingga bobot tetap.

b. Parameter Kadar Abu

- Digerus ekstrak sejumlah tertentu.
- Ditimbang ekstrak yang telah digerus sebanyak 2 gram sampai 3 gram.

- Dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan diratakan.
- Dipijarkan perlahan hingga arang habis, dinginkan lalu timbang.
- Jika cara di atas tidak mampu menghilangkan arang, ditambahkan air panas kemudian disaring menggunakan kertas saring bebas abu.
- Dipijarkan sisa kertas dan kertas disaring dalam krus yang sama.
- Dimasukkan filtrat ke dalam krus, diuapkan, dipijarkan hingga bobot tetap kemudian ditimbang.
- Dihitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

4.7.3 Uji Fitokimia Kualitatif

a. Minyak Atsiri

- Diambil ekstrak biji jintan hitam sebanyak 0,3 gram, ditempatkan dalam gelas arloji.
- Ditambahkan Sudan III, hasil positif jika terbentuk warna merah.

b. Saponin

- Diambil ekstrak biji jintan hitam 0,3 gram, dilarutkan dengan 20 ml aquades di dalam tabung reaksi.
- Dikocok selama 15 menit, lalu didiamkan.

- Hasil bernilai positif jika terbentuk busa stabil setebal 1 cm di permukaan larutan.
- c. Alkaloid
- Tes Meyer: ekstrak biji jintan hitam sebanyak 0,3 gram ditambah dengan reagen Meyer (*Potassium Mercuric Iodide*). Hasil bernilai positif jika terbentuk endapan berwarna kuning.
 - Tes Wagner: ekstrak biji jintan hitam sebanyak 0,3 gram ditambah dengan reagen Wagner (Iodin dalam kalium iodida). Hasil bernilai positif jika terbentuk endapan merah.
- d. Protein
- Tes Xanthoproteic: ekstrak biji jintan hitam sebanyak 0,3 gram ditambah dengan beberapa tetes asam nitrat konsentrat. Hasil positif jika terbentuk warna kuning.

4.7.4 Pengkondisian Hewan Coba

Pengkondisian hewan coba bertujuan agar tikus dapat menyesuaikan diri dalam kondisi percobaan. Pengkondisian ini dilakukan sebelum tikus diberi perlakuan. Berikut adalah cara pengkondisian hewan coba.

- a. Hewan coba ditempatkan pada kandang dengan penutup anyaman kawat dengan suhu ruangan $23 \pm 1^\circ \text{C}$.
- b. Setiap kandang diisi oleh 4 ekor tikus dengan jenis kelamin yang sama dan perlakuan yang sama.

- c. Penyediaan air minum untuk hewan coba juga disediakan dengan aturan pakai *ad libitum* dan pakan, yaitu *comfeed* PAR-S dan tepung terigu dengan perbandingan 2:1.
- d. Sekam ditempatkan dalam kandang dan dilakukan penyemprotan dengan alkohol 70% setiap sekam diganti.
- e. Diadaptasi tikus di laboratorium farmakologi selama tujuh hari.

4.7.5 Induksi Diabetes Mellitus Tipe 2 pada Tikus

Induksi diabetes tipe 2 pada tikus dilakukan dengan cara sebagai berikut.

- a. Tikus wistar sejumlah 20 ekor diberi diet tinggi fruktosa.
- b. Selama diet, kebutuhan kalori tikus sebanyak 60% diperoleh dari fruktosa selama 6 minggu. Pemberian fruktosa dengan cara disonde sebanyak 16 gram setiap hari.
- c. Setelah 6 minggu, dilakukan cek kadar gula darah acak, dikatakan tikus mengalami diabetes jika nilai lebih dari 200 mg/dL.

4.7.6 Prosedur Euthanasia Tikus

Euthanasia tikus bertujuan untuk mengambil jaringan otot tikus. Prosedur euthanasia adalah sebagai berikut.

- a. Hewan coba dianestesi menggunakan ketamin HCl secara intravena 0,2 mL di *ad* 0,5 mL dengan *water for injection* untuk semua tikus.

- b. Diinjeksi insulin *rapid acting* sebanyak 10 IU/kgBB secara bolus melalui vena porta tikus.
- c. Ditunggu selama 120 detik.
- d. Disuntikkan *syringe* berisi udara ke daerah batang otak tikus melalui bagian bawah tempurung kepala tikus.

4.7.7 Prosedur Pembuatan Homogenat Jaringan Otot

Prosedur pembuatan homogenat jaringan otot untuk analisa menggunakan ELISA adalah sebagai berikut (Hotamisligil *et al.*, 1994).

- a. Diambil jaringan otot dari tikus, disimpan pada keadaan beku hingga digunakan untuk analisis.
- b. Jaringan otot hewan coba dalam keadaan beku dihaluskan di mortar dan dihomogenisasi pada suhu 4°C dengan buffer sejumlah 6 kali jumlah jaringan. *Buffer lysis* mengandung EDTA 0,0074 g, NaCl 0,8775 g, NP 40 0,125 g, Protease Inhibitor Cocktail (PIC) merk *Sigma* 50 µl, Tris Base 0,1211 g, dan PMSF 0,009 g.
- c. Ekstrak jaringan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada 4°C.
- d. Diambil bagian supernatan yang akan digunakan untuk analisa selanjutnya.

4.7.8 Prosedur Pengukuran Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi pada IRS-1 dengan ELISA

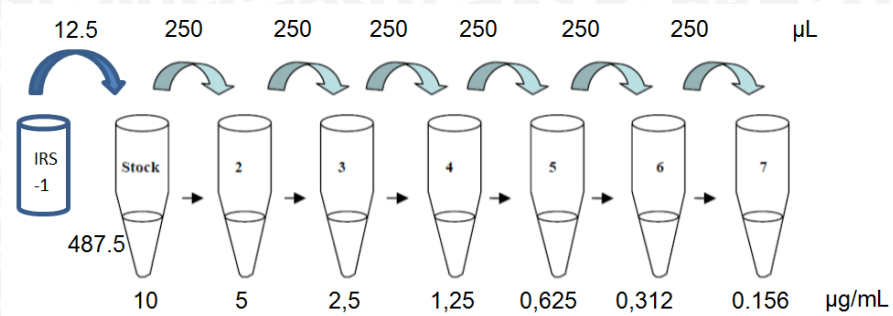
Reagen yang akan digunakan pada prosedur ini disiapkan terlebih dahulu. Prosedur penyiapan reagen yang akan digunakan adalah sebagai berikut.

a. Larutan Standar dan Kurva Baku

Direkonstitusikan larutan standar dengan pelarut ELISA pada vial yang berlabel untuk mencapai konsentrasi 100 Unit/mL. Dikocok secara perlahan vial dan biarkan vial selama 10 menit untuk memastikan larutan terekonstitusi secara sempurna. Larutan standar harus direkonstitusikan sesegera mungkin sebelum penggunaan. Larutan stok pada vial pertama tersebut akan dijadikan dasar dari pembuatan kurva standar.

- Dicampurkan larutan IRS-1 Rabbit Antibody konsentrasi 10 µg/mL sebanyak 500 µL dengan PBS sebanyak 12,5 µl untuk mendapatkan larutan stok dengan konsentrasi 400 µg/ml.
- Ditunggu 15 menit terlebih dahulu sebelum membuat seri larutan sebagai berikut:

f



Gambar 4.1 Konsentrasi Seri Larutan Standar

- Lakukan pengecekan panjang gelombang maksimal menggunakan spektro-vis.
 - Lakukan pengukuran absorbansi pada masing-masing konsentrasi menggunakan spektro-vis pada panjang gelombang perkiraan 450 nm.
 - Buat kurva baku dari nilai pengukuran yang didapatkan sehingga dapat dibuat persamaan liniernya.
- b. *IRS-1 Rabbit Antibody*: antibodi diencerkan dengan larutan dapar (PBS) pada perbandingan 1:5000
 - c. Sampel antigen: sampel dilarutkan dengan PBS
 - d. Antibodi dideteksi
 - e. *HRP* yang diberi label antibodi dilarutkan dalam PBS dengan perbandingan 1:5000.

Semua reagen harus dicampur secara perlahan sebelum dipipet dan tidak boleh terbentuk busa. Setiap strip digunakan satu kali dan tidak dianjurkan untuk diulang. Berikut prosedur pengukuran IRS-1:

Hari 1 Pelapisan Antigen

1. Dicampur homogenat : *coating buffer* = 1:1 @100 μ l
2. Dibungkus *plate* dengan *aluminium foil*
3. Diinkubasi 4°C, semalaman

Hari 2

1. Dibuang hasil inkubasi, dicuci *plate* dengan PBS-Tween sebanyak 3 kali @5 menit @100 μ l
2. Dilapisi *plate* dengan *blocking buffer* 1% BSA-PBS @ 100 μ l
3. Dibungkus *plate* dengan *aluminium foil*
4. Diinkubasi selama 1 jam di suhu ruang
5. Dibuang hasil inkubasi, dicuci *plate* dengan PBS-Tween sebanyak 3 kali @5 menit @100 μ l
6. Dilapisi *plate* dengan antibodi primer anti-phospho-IRS 1(Tyr 1222) polyclonal antibody 1:30-1:3000
7. Dibungkus *plate* dengan *aluminium foil*
8. Diinkubasi selama 2 jam di suhu ruang
9. Dibuang hasil inkubasi, dicuci *plate* dengan PBS-Tween 3 kali @5 menit @100 μ l
10. Dilapisi *plate* dengan antibodi sekunder anti rabbit IgG biotin 1:1000
11. Dibungkus *plate* dengan *aluminium foil*
12. Diinkubasi 1 jam di suhu ruang

13. Dibuang hasil inkubasi, dicuci *plate* dengan PBS-Tween 3 kali @5 menit @100 μ l

Pelapisan *plate* dengan enzim SAHRP 1:1000

14. Dibungkus *plate* dengan *aluminium foil*
15. Diinkubasi selama 1 jam di suhu ruang
16. Dibuang hasil inkubasi, dicuci *plate* dengan PBS-Tween 3 kali
17. Ditambahkan enzim SAHRP @50 μ l dalam ruang gelap
18. Diinkubasi selama 30 menit
19. Ditambahkan H_2SO_4 2 N @50 μ l (*stop solution*)
20. Diinkubasi 5-10 menit di suhu ruang
21. Dibaca absorbansi dengan ELISA pada panjang gelombang 450 nm.

4.7.9 Prosedur Perlakuan pada Tikus

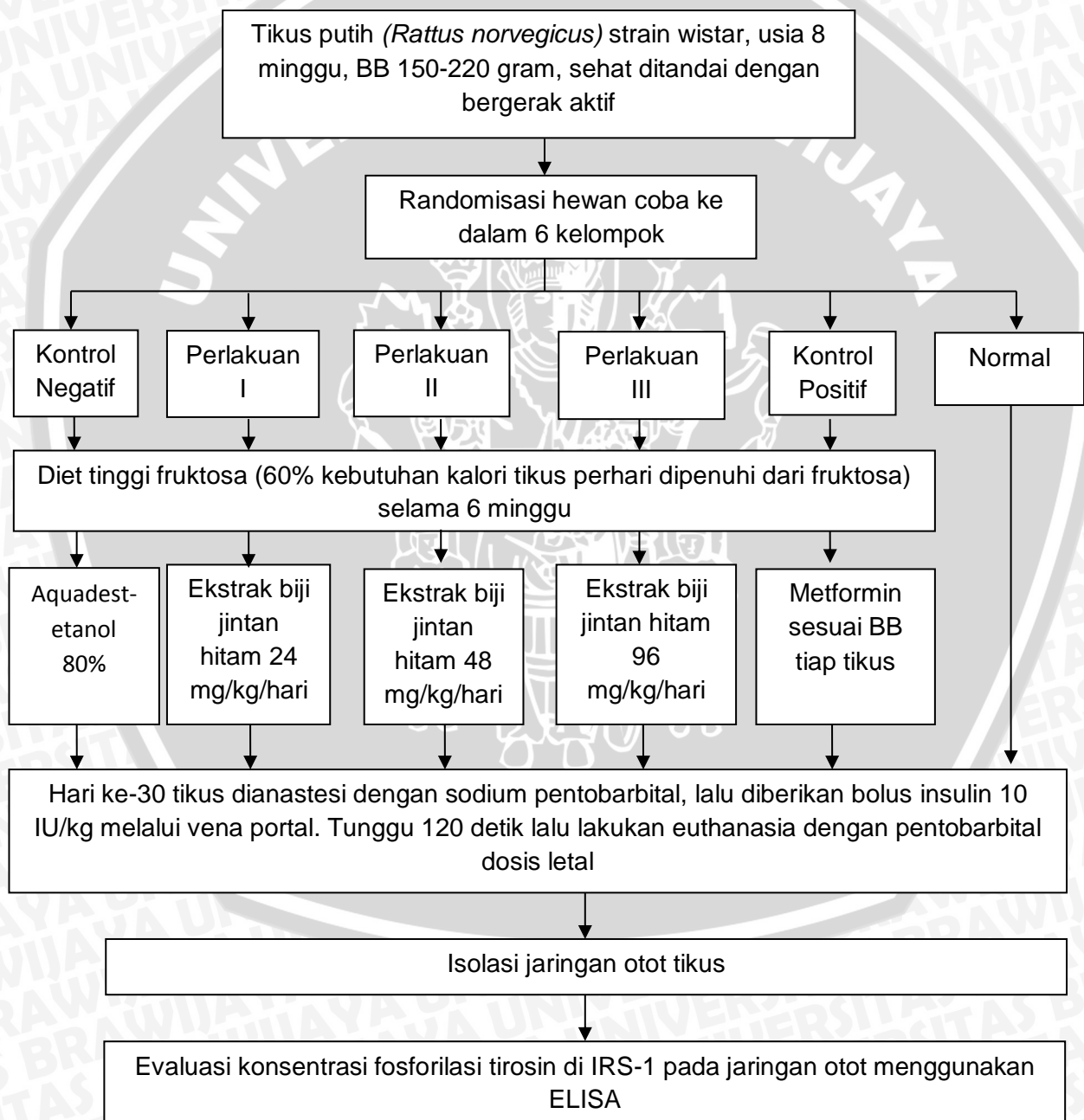
Selama proses penelitian, perlakuan yang diberikan kepada tikus adalah sebagai berikut:

- a) 24 ekor tikus yang memenuhi kriteria inklusi diadaptasi di laboratorium selama 7 hari.
- b) Tikus diberi diet tinggi fruktosa selama 6 minggu untuk mendapatkan kondisi resistensi insulin. Masing-masing tikus menggunakan satu kandang karena perlu dilakukan kontrol terhadap pakan tikus.

- c) Tikus dikelompokkan ke dalam 6 kelompok perlakuan melalui metode *lotree*, dengan pembagian kelompok:
- P_n (kontrol negatif), terdiri dari 4 ekor tikus. Tidak mendapatkan ekstrak biji jintan hitam selama 30 hari.
 - P_1 (Perlakuan ke-1), terdiri dari 4 ekor tikus diberikan ekstrak biji jintan hitam sejumlah 24 mg/kg/hari selama 30 hari.
 - P_2 (Perlakuan ke-2), terdiri dari 4 ekor tikus diberikan ekstrak biji jintan hitam sejumlah 48 mg/kg/hari selama 30 hari.
 - P_3 (Perlakuan ke-3), terdiri dari 4 ekor tikus diberikan ekstrak biji jintan hitam sejumlah 96 mg/kg/hari selama 30 hari.
 - P_p (kontrol positif), terdiri dari 4 ekor tikus mendapatkan metformin dengan dosis sesuai dengan berat badan masing-masing tikus.
 - Kelompok normal (P_0) 4 ekor tikus wistar model DM 2, tidak diinduksi DM 2 dan tidak mendapatkan perlakuan.
- d) Makanan yang diberikan selama perlakuan adalah diet normal, yang terdiri dari *comfeed* PAR-S dan tepung terigu dengan perbandingan 2:1.
- e) Kelompok P_1, P_2, P_3 selain diberi diet normal juga mendapatkan ekstrak biji jintan hitam melalui sonde selama 30 hari.

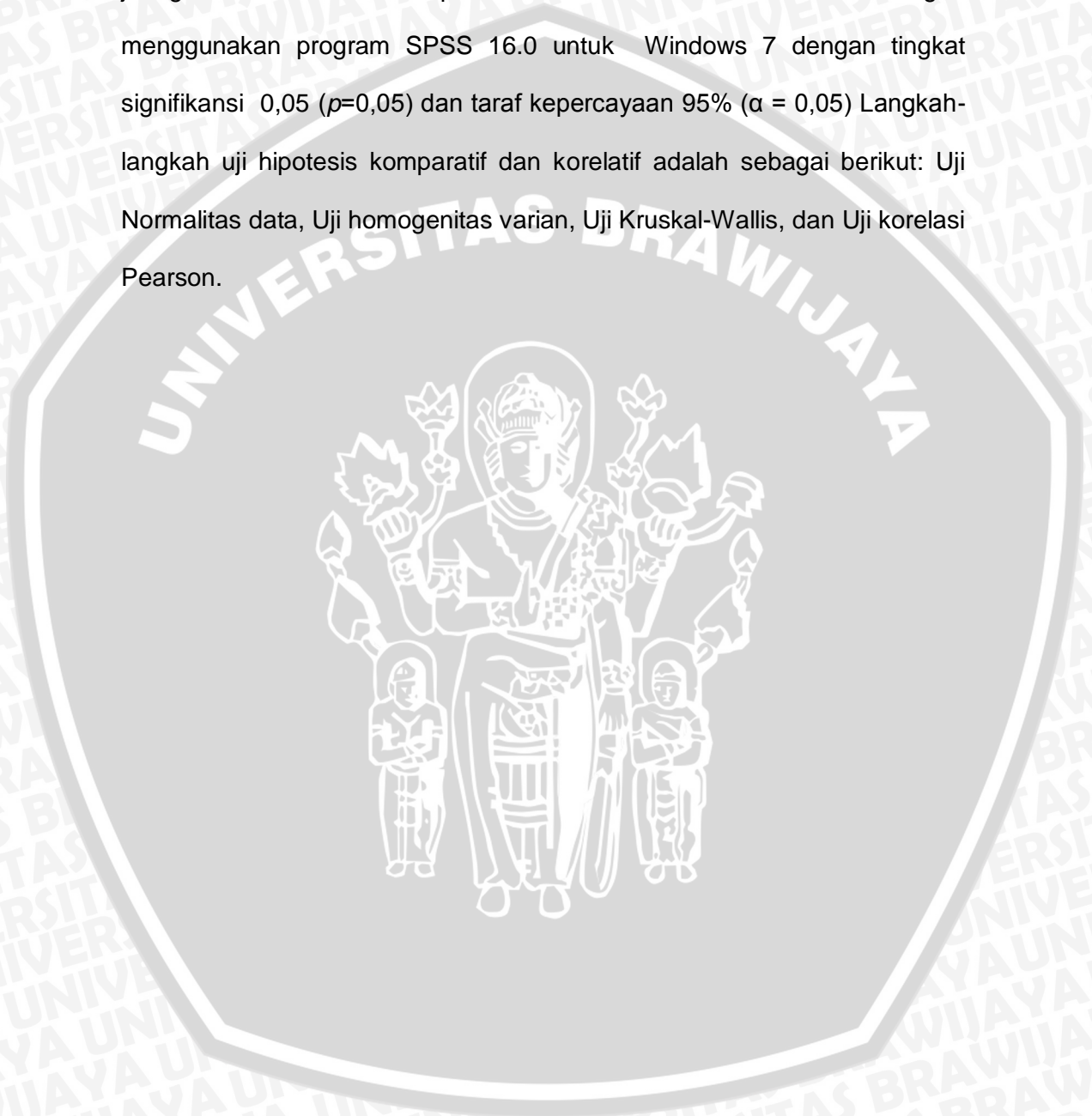
- f) Pada hari ke-30 tikus dibedah untuk diambil jaringan ototnya dan dilakukan pengukuran konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1.

4.8 Kerangka Operasional



4.9 Analisis Data

Hasil pengukuran konsentrasi tirosin terfosforilasi pada IRS-1 dari jaringan otot kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS 16.0 untuk Windows 7 dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut: Uji Normalitas data, Uji homogenitas varian, Uji Kruskal-Wallis, dan Uji korelasi Pearson.



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Pengelompokkan, Pengkondisian, dan Induksi DM Hewan Coba

Pada penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah *Rattus norvegicus* strain Wistar, kelamin jantan, berat 150-220 gram, kondisi sehat yang ditandai dengan bergerak aktif. Hewan coba dibagi ke dalam 6 kelompok dan masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus dan 1 tikus sebagai cadangan. Kelompok pertama sampai keenam berturut-turut adalah Pn, Pp, P₀, P₁, P₂, P₃. Pengkondisian hewan coba dilakukan dengan menempatkan tikus per kelompok dalam satu kandang dan diberi pakan *comfeed* dan tepung terigu dengan perbandingan 2:1. Selain itu, air minum dengan aturan pakai *ad libitum*. Kandang tikus diberi sekam dan penyemprotan dengan alkohol 70%. Pengkondisian hewan coba dilakukan selama satu minggu.

Selama pengkondisian terdapat beberapa tikus yang mati sehingga jumlah tikus akhir yang digunakan hingga metode *euthanasia* terdapat pada tabel 5.1.

Penginduksian DM 2 dilakukan dengan pemberian diet tinggi fruktosa melalui penyondean dengan larutan fruktosa maupun dari campuran pakan tikus selama 6 minggu. Kemudian kadar



glukosa darah puasa tikus diukur, jika nilai lebih dari 250 mg/dL (Singh *et al.*, 2007), maka tikus dapat dikatakan mengalami diabetes.

Tabel 5.1 Kelompok Perlakuan dan Jumlah Tikus

Kelompok	Jumlah Tikus	Jumlah Tikus yang Mati Sebelum Perlakuan	Jumlah Tikus yang Mati Setelah Perlakuan	Jumlah Sampel yang Didapatkan
Pn (aquadest)	4	1	0	3
Pp (metformin)	4	1	0	3
P0 (tanpa induksi DM)	4	0	0	4
P1 (ekstrak dosis 24 mg/kgBB)	4	0	1	3
P2 (ekstrak dosis 48 mg/kgBB)	4	0	0	4
P3 (ekstrak dosis 96 mg/kgBB)	4	1	0	3

5.1.2 Hasil Ekstraksi dan Uji Fitokimia Biji Jintan Hitam

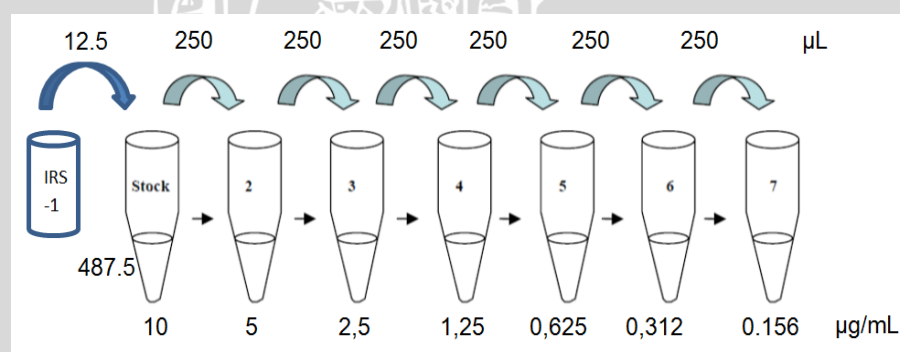
Ekstraksi dan uji fitokimia biji jintan hitam dilakukan sesuai dengan prosedur penelitian yang telah dijelaskan pada bab 4. Sejumlah 200 gram serbuk biji jintan hitam dimaserasi menggunakan pelarut etanol 80% dengan perbandingan 1:5 (b/v). Hasil ekstraksi didapatkan ekstrak kental sejumlah 33 gram. Uji fitokimia dilakukan secara kualitatif sehingga yang diketahui adalah senyawa apa yang terkandung dalam ekstrak biji jintan hitam. Jenis uji yang dipilih didasarkan pada landasan teori mengenai kandungan ekstrak biji jintan hitam. Hasil uji fitokimia kualitatif terdapat pada tabel 5.2.

Tabel 5.2 Hasil Uji Fitokimia Kualitatif

Jenis Uji	Metode	Hasil	Keterangan
Saponin	Pengocokan	Tidak berbusa	-
Minyak Atsiri	Sudan III	Warna merah	+
Protein	Nitrit Acid Meyer (<i>Potassium Mercuric Iodide</i>)	Warna kuning	+
Alkaloid	Wagner (<i>Iodin dalam kalium iodida</i>)	Endapan putih	+
		Endapan coklat muda	+

5.1.3 Hasil Pembuatan Larutan Standar dan Kurva Baku

Larutan baku dibuat dari larutan stok dengan konsentrasi 10 µg/ml dengan volume 500 µl, sehingga volume yang didapatkan untuk konsentrasi antibodi 400 µg/ml adalah 12,5 µl. Antibodi sebanyak 12,5 µl dimasukkan ke dalam larutan stok sebanyak 487,5 µl dikocok hingga homogen. Kemudian diberi label standar 1, lalu diencerkan dengan konsentrasi dan volume sebagai berikut.



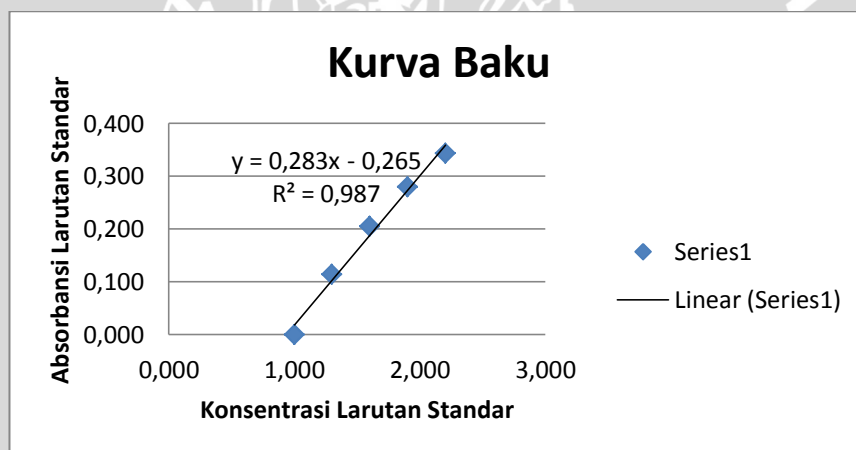
Gambar 5.1 Pengenceran Larutan Standar

Setelah itu, hasil pengenceran diukur absorbansinya dengan spektrometri pada panjang gelombang 450 nm. Hasil absorbansi larutan standar yang didapatkan adalah sebagai berikut.

Tabel 5.3 Hasil Absorbansi Larutan Standar

	conc $\mu\text{g/ml}$	Abs1	Abs2	Abs rata2	log conc	log abs
std1	2,5	0,092	0,098	0,095	0,398	-0,400
std2	5	0,062	0,082	0,072	0,699	-0,156
std3	10	0,026	0,031	0,029	1,000	0,000
std4	20	0,036	0,034	0,035	1,301	0,114
std5	40	0,029	0,028	0,029	1,602	0,205
std6	80	0,031	0,030	0,031	1,903	0,279
std7	160	0,030	0,029	0,030	2,204	0,343

Setelah mendapatkan log konsentrasi dan log absorbansi dari larutan standar, dibuat grafik log absorbansi larutan standar (y) dan log konsentrasi larutan standar (x) seperti di bawah ini.



Kemudian didapatkan persamaan garis regresi, yaitu $y=0,283x-0,265$ dengan nilai $R^2 = 0,987$.

5.1.4 Hasil Pengukuran Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1 dengan ELISA

Pengukuran konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 dilakukan dengan metode ELISA dan tidak dilakukan pengukuran kadar protein sebelumnya karena berat sampel sudah ditimbang sejumlah yang

sama sebelumnya dan dilakukan homogenasi sehingga jumlah protein yang terekstraksi rata-rata berjumlah sama. Konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 diperoleh dengan memasukkan nilai absorbansi sampel ke dalam persamaan kurva baku log rata-rata konsentrasi larutan baku (x) terhadap log absorbansi larutan baku (y). Hasil kurva baku tersebut didapatkan $R^2=0,987$ dan persamaan $y=0,283x-0,265$. Kurva baku didapatkan dari pengukuran ELISA menggunakan larutan baku. Hasil konsentrasi yang didapatkan ditampilkan pada tabel 5.4 dan kurva baku dapat dilihat pada gambar 5.1.

Hasil uji normalitas data konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 menggunakan SPSS didapatkan nilai $p>0,05$ untuk lima kelompok perlakuan (lampiran 5) dengan satu kelompok, yaitu Pn dengan nilai $p<0,05$ sehingga distribusi konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 adalah tidak normal. Transformasi dengan menggunakan \sqrt{x} dan $1/\sqrt{x}$ didapatkan nilai p pada kelompok Pn tetap $<0,05$, yaitu 0,00. Hasil uji homogenitas data konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 didapatkan nilai $p=0,063$ untuk seluruh kelompok (Lampiran 5) dimana $p>0,05$ menunjukkan data konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 adalah homogen. Langkah selanjutnya adalah uji non parametrik Kruskal Wallis. Hasil uji non parametrik Kruskal Wallis didapatkan $p=0,151$, nilai $p>0,05$ dimana tidak terdapat perbedaan yang signifikan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 antar kelompok perlakuan.

Tabel 5.4 Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1

Kelompok Perlakuan	Nomor Tikus	Nilai Absorbansi	Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1 ($\mu\text{g/mL}$)
Kontrol Positif	1	0,106	0,006
	2	0,117	0,009
	3	0,180	0,063
Kontrol Negatif	4	0,123	0,014
	5	0,100	0,005
	6	0,130	0,014
Perlakuan 1	7	0,146	0,020
	8	0,183	0,043
	9	0,165	0,029
Perlakuan 2	10	0,169	0,047
	11	0,143	0,023
	12	0,151	0,024
	13	0,181	0,053
Perlakuan 3	14	0,153	0,026
	15	0,183	0,052
	16	0,222	0,113
Normal	17	0,148	0,020
	18	0,138	0,018
	19	0,173	0,036
	20	0,218	0,079

Secara deskriptif terdapat perbedaan rata-rata konsentrasi fosforilasi IRS-1 terjadi. Urutan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 mulai dari terendah adalah sebagai berikut.

$$P_n < P_p < P_1 < P_2 < P_0 < P_3$$

Secara berurutan nilai rerata konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 adalah Mean \pm SD 0,011 \pm 0,005; 0,026 \pm 0,032; 0,031 \pm 0,011; 0,037 \pm 0,016; 0,038 \pm 0,028; 0,064 \pm 0,045 ($\mu\text{g/dL}$). Data urutan di atas menunjukkan bahwa konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 paling rendah pada kelompok P_n, yaitu kelompok model DM 2 dan diberikan etanol dicampur dengan aquades sebagai kontrol negatif, sedangkan

konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 paling tinggi didapatkan pada kelompok P₃, yaitu kelompok model DM 2 dan diberikan ekstrak biji jintan hitam dengan dosis 96 mg/kgBB. Data di atas didapatkan dari penghitungan rata-rata konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 per kelompok perlakuan.

5.1.5 Hasil Delta Glukosa Darah Puasa

Uji normalitas delta glukosa darah puasa tikus didapatkan nilai $p > 0,05$ pada tiap kelompok perlakuan sehingga perubahan glukosa darah puasa dalam penelitian ini adalah normal. Uji homogenitas delta glukosa darah puasa tikus didapatkan nilai $p = 0,004$, dimana nilai p tersebut $< 0,05$ sehingga data delta glukosa darah puasa tikus tidak homogen. Kemudian dilakukan uji non parametrik Kruskal-Wallis didapatkan $p = 0,420$, dimana nilai p tersebut $> 0,05$ sehingga tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari data glukosa darah puasa tikus antar kelompok perlakuan.

Hasil uji korelasi Pearson delta glukosa darah puasa dengan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 untuk semua kelompok didapatkan tabel yang terdiri atas kekuatan korelasi (r), nilai p , dan jumlah subjek (n) sebagai berikut.

a. Hasil analisis korelasi Pearson kelompok Pp

Tabel 5.5 Hasil Analisis Korelasi Pearson Kelompok Pp

		IRS-1 Pp
Delta Pp	r	-1,000
	p	>0,05
	n	3

Pada kelompok Pp didapatkan nilai $r=-1,000$ yang berarti kekuatan korelasi antara delta glukosa darah puasa dan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 adalah sangat kuat dengan arah negatif (-), yaitu berlawanan arah dimana semakin besar nilai delta glukosa puasa, maka semakin kecil nilai konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1, dan sebaliknya. Nilai $p>0,05$ berarti tidak terdapat korelasi yang signifikan antar kedua variabel.

b. Hasil analisis korelasi Pearson kelompok Pn

Tabel 5.6 Hasil Analisis Korelasi Pearson Kelompok Pn

		IRS-1 Pn
Delta Pn	r	-0,541
	p	>0,05
	n	3

Pada kelompok Pp didapatkan nilai $r=-0,541$ yang berarti kekuatan korelasi antara delta glukosa darah puasa dan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 adalah cukup kuat dengan arah negatif (-), yaitu berlawanan arah dimana semakin besar nilai delta glukosa puasa, maka semakin kecil nilai konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1, dan sebaliknya. Nilai $p>0,05$ berarti tidak terdapat korelasi yang signifikan antar kedua variabel.

- c. Hasil analisis korelasi Pearson kelompok P₁

Tabel 5.7 Hasil Analisis Korelasi Pearson Kelompok P₁

		IRS-1 P ₁
Delta P ₁	r	0,573
	p	>0,05
	n	3

Pada kelompok P_p didapatkan nilai $r=0,573$ yang berarti kekuatan korelasi antara delta glukosa darah puasa dan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 adalah sedang dengan arah positif (+), yaitu searah dimana semakin besar nilai delta glukosa puasa, maka semakin besar pula nilai konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1, dan sebaliknya. Nilai $p>0,05$ berarti terdapat korelasi yang signifikan antar kedua variabel.

- d. Hasil analisis korelasi Pearson kelompok P₂

Tabel 5.8 Hasil Analisis Korelasi Pearson Kelompok P₂

		IRS-1 P ₂
Delta P ₂	r	0,128
	p	>0,05
	n	4

Pada kelompok P_p didapatkan nilai $r=0,128$ yang berarti kekuatan korelasi antara delta glukosa darah puasa dan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 adalah sangat lemah dengan arah positif (+), yaitu searah dimana semakin besar nilai delta glukosa puasa, maka semakin besar pula nilai konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1, dan sebaliknya. Nilai

$p > 0,05$ berarti terdapat korelasi yang signifikan antar kedua variabel.

- b. Hasil analisis korelasi Pearson kelompok P_3

Tabel 5.9 Hasil Analisis Korelasi Pearson Kelompok P_3

		IRS-1 P_3
Delta P_3	r	0,994
	p	$>0,05$
	n	3

Pada kelompok P_p didapatkan nilai $r=0,994$ yang berarti kekuatan korelasi antara delta glukosa darah puasa dan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 adalah sangat kuat dengan arah positif (+), yaitu searah dimana semakin besar nilai delta glukosa puasa, maka semakin besar pula nilai konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1, dan sebaliknya. Nilai $p > 0,05$ berarti terdapat korelasi yang signifikan antar kedua variabel.

Interpretasi koefisien korelasi memberikan hipotesis mengenai tingkat hubungan yang terjadi antara delta glukosa dan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1. Interpretasi kekuatan korelasi nilai r dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.10 Interpretasi Koefisien Korelasi Nilai r

Interval Koefisien	Tingkat Hubungan
0,800 – 1,000	Sangat Kuat
0,600 – 0,799	Kuat
0,400 – 0,599	Sedang
0,200 – 0,399	Lemah
0,000 – 0,199	Sangat Lemah

Sumber: Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan Edisi 5

Delta glukosa darah puasa didapatkan dari pengurangan hasil glukosa darah puasa per tanggal 02/05/2013 dengan hasil glukosa darah puasa per tanggal 02/06/2013. Hasil glukosa darah puasa per tanggal 02/05/2013 merupakan hasil glukosa darah puasa sebelum dilakukan perlakuan, yaitu pemberian ekstrak biji jintan hitam, sedangkan tanggal 02/06/2013 merupakan hasil glukosa darah puasa setelah diberikan ekstrak biji jintan hitam. Pengukuran glukosa darah puasa tikus sebelum perlakuan dilakukan setelah induksi fruktosa selama 6 minggu berdasarkan buku *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assay* karangan Vogel HG (2002) dalam jurnal Nade *et al.*, 2012 menyatakan bahwa pemberian larutan fruktosa sebanyak 66% dari total pemberian pakan per harinya selama 6 minggu dapat mencapai kondisi DM 2 dan gangguan metabolik lainnya. Hasil perubahan glukosa darah tikus sebelum dan setelah mendapatkan perlakuan dapat dilihat pada tabel 5.11.

Tabel 5.11 Hasil Perubahan Glukosa Darah Puasa Sebelum dan Setelah Perlakuan

Kelompok Perlakuan	Nomor Tikus	Hasil Pengukuran Glukosa Darah Puasa (mg/dL)		Delta Glukosa
		02/05/2013	02/06/2013	
Kontrol Positif (Pp)	1	112	101	11
	2	109	101	8
	3	62	89	-27
Kontrol Negatif (Pn)	4	88	73	15
	5	116	98	18
	6	68	106	-38
Perlakuan 1 (P₁)	7	137	101	36
	8	108	83	25
	9	112	62	50
Perlakuan 2 (P₂)	10	103	83	20
	11	121	68	53
	12	108	103	5
	13	121	87	34
Perlakuan 3 (P₃)	14	82	76	6
	15	59	106	-47
	16	88	93	-5

5.1.6 Hasil Pengukuran Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1 dan Delta Glukosa Darah Puasa

Hasil pengukuran konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 dan delta glukosa darah puasa per kelompok perlakuan secara deskriptif adalah sebagai berikut.

Tabel 5.12 Hasil Pengukuran Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1 dan Delta Glukosa Darah Puasa Kelompok Pp

Variabel	Deskripsi
Delta GDP (Pp)	-2,667±21,127
Konst. Fosfo Tir IRS-1 (Pp)	0,009 (0,006-0,063)

Tabel 5.13 Hasil Pengukuran Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1 dan Delta Glukosa Darah Puasa Kelompok P_n

Variabel	Deskripsi
Delta GDP (P _n)	-1,667±31,501
Konst. Fosfo Tir IRS-1 (P _n)	0,014 (0,005-0,14)

Tabel 5.14 Hasil Pengukuran Konsentrasi Tirosin terfosforilasi IRS-1 dan Delta Glukosa Darah Puasa Kelompok P₁

Variabel	Deskripsi
Delta GDP (P ₁)	37±12,530
Konst. Fosfo Tir IRS-1 (P ₁)	0,029 (0,020-0,043)

Tabel 5.15 Hasil Pengukuran Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1 dan Delta Glukosa Darah Puasa Kelompok P₂

Variabel	Deskripsi
Delta GDP (P ₂)	28±20,445
Konst. Fosfo Tir IRS-1 (P ₂)	0,036 (0,023-0,053)

Tabel 5.16 Hasil Pengukuran Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1 dan Delta Glukosa Darah Puasa Kelompok P₃

Variabel	Deskripsi
Delta GDP (P ₃)	-15,333±27,970
Konst. Fosfo Tir IRS-1 (P ₃)	0,052 (0,026-0,113)

5.1.7 Hasil Pembuatan Homogenat Jaringan Otot

Pembuatan homogenat jaringan otot dibuat dengan prosedur yang sesuai dengan bab sebelumnya. Jaringan otot yang diambil berada pada bagian paha tikus.



Gambar 5.2 Homogenat Jaringan Otot

Setelah tikus dibedah dan diambil jaringan ototnya, terdapat jaringan lemak yang ikut terambil pada saat pembedahan. Tekstur dari jaringan otot adalah keras sehingga dibutuhkan pencacahan sebelum digerus. Jaringan lemak yang ikut terambil juga memiliki tekstur yang keras sehingga sulit untuk digerus sehingga setelah dilakukan sentrifugasi, pengambilan supernatan dilakukan dengan hati-hati.

BAB 6

PEMBAHASAN

Hasil dari penelitian ini secara statistik didapatkan bahwa tidak terdapat perbedaan delta glukosa darah dan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 yang dapat menggambarkan efek biji jantan hitam, terutama kandungan thymoquinon sebagai penurun glukosa darah puasa tikus yang berdampak pada peningkatan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1.

Pada penelitian-penelitian sebelumnya dinyatakan bahwa ekstrak biji jantan hitam dengan kandungan thymoquinon memiliki potensi sebagai terapi antidiabetes dengan salah satu mekanismenya, yaitu penurunan glukoneogenesis. Thymoquinon memiliki sifat sedikit larut dalam air, mudah larut dalam alkohol, eter, kloroform dan benzene (Sethi, 2003) sehingga pada penelitian ini digunakan pelarut etanol 80% untuk proses ekstraksi. Etanol 80% disiapkan dengan menggunakan perbandingan relatif etanol dan air (mL) dari Farmakope Indonesia III (hal.1154), yaitu 45,5:9,5 (mL).

Pengelompokkan tikus dilakukan untuk melihat efek jantan hitam terhadap peningkatan konsentrasi tirosin terfosforilasi di IRS-1 pada berbagai dosis dan untuk mempermudah pemberian pakan berdasarkan kondisi yang diinginkan. perbedaan jumlah tikus pada tiap kelompok berbeda karena terdapat tikus yang mati pada saat pengkondisian berlangsung. Pengkondisian dilakukan untuk mengadaptasi tikus terhadap lingkungan laboratorium untuk mencegah kondisi stress pada tikus yang dapat mengakibatkan tikus cepat mati.

Kematian pada hewan coba pada saat pengkondisian dapat disebabkan salah satunya, yaitu gigitan dari tikus lain yang kemudian menjadi luka. Luka tersebut kemungkinan menjadi semakin buruk akibat induksi fruktosa yang menyebabkan luka sulit sembuh. Selain itu, tikus gagal beradaptasi terhadap lingkungan laboratorium sehingga stress mulai meningkat ditandai dengan konsumsi pakan dan minum yang kurang dan tikus yang tidak bergerak aktif. Untuk melihat konsumsi pakan per harinya dari tiap tikus, maka dilakukan penimbangan sisa pakan tikus per harinya. Hasil yang didapatkan sangatlah bervariasi.

Model DM 2 dicapai dengan menginduksi tikus dengan fruktosa selama 30 hari. Fruktosa memiliki kelarutan 1:0,3 (b/v) pada suhu 20°C dalam air dengan beberapa fungsinya pada bidang farmasi, yaitu *dissolution enhancer*, pemanis, dan *tablet diluent*. Fruktosa memiliki formula empiris, yaitu $C_6H_{12}O_6$. Qin *et al.*, (2004) menyatakan bahwa pemberian produk dengan kandungan *high-fructose diet* dapat mengubah tahapan awal transduksi sinyal insulin yang memiliki peran penting dalam penginduksian resistensi insulin sehingga diharapkan dari pemberian fruktosa selama 6 minggu pada tikus dapat memberikan kondisi DM 2. Kelebihan konsumsi fruktosa dapat mengakibatkan resistensi insulin hepatic, penurunan oksidasi lipid, dan peningkatan trigliserida. Peningkatan trigliserida hepatic (lipid hepatic) dapat menginduksi resistensi insulin hepatic, kemungkinan melalui peningkatan kadar intrahepatik dari *diacylglycerol*, yang mengaktivasi novel-PKC. Novel-PKC menurunkan konsentrasi tirosin terfosforilasi dari IRS-1, menyebabkan penurunan sensitivitas insulin, peningkatan produksi glukosa hepatic, dan peningkatan glukosa puasa dan konsentrasi insulin, serta gangguan toleransi glukosa (Stanhope & Havel, 2010).

Pada awal penelitian, fruktosa sebanyak 16 gram dilarutkan dalam air sebanyak 3 mL. Air yang digunakan sebanyak 3 mL karena kapasitas lambung tikus berkisar 0.4-3.4 mL untuk sekali sonde (Mc Connel *et al.*, 2008). Pelarutan tersebut dibantu dengan pemanasan dan pengadukan dengan *stirrer* dan dihasilkan larutan air dan fruktosa dengan volume ± 6 mL atau dengan kata lain berlebih dari hasil yang diharapkan, yaitu 3 mL. Untuk mengatasi kelebihan volume tersebut, maka induksi fruktosa pada tikus dilakukan dengan dua cara, yaitu intragastrik (penyondean) dan pencampuran dengan makanan. Larutan sonde dibuat dengan melarutkan 3 gram fruktosa dan 13 gram sisanya dicampurkan dengan comfeed sebagai pakan tikus. Namun, pakan yang dihasilkan sangat lengket dan kemungkinan terlalu manis sehingga pakan tidak dimakan sama sekali oleh tikus. Untuk mencegah tikus mati, maka jumlah fruktosa disesuaikan, yaitu 7.5 gram per hari. Jumlah kebutuhan energi tikus tetap tercapai karena menyesuaikan dengan jumlah comfeed dan tepung yang dicampur dengan fruktosa pada pembuatan pakan.

Ekstraksi biji jintan hitam dilakukan dengan metode maserasi, yaitu merendam simplisia pada pelarut selama 24 jam disertai dengan pengadukan. prinsip metode maserasi, yaitu kontak antara ekstrak dan pelarut di dalam wadah untuk beberapa periode dengan beberapa kali pengadukan hingga kandungan ekstrak melarut (Tiwari *et al.*, 2005). Perbandingan yang digunakan pada awal maserasi adalah 1:10 (Benhaddou-Andaloussi, 2011) dan menghasilkan ekstrak yang terlalu encer dan dibutuhkan waktu yang sangat lama saat dievaporasi sehingga dilakukan penyesuaian 1:5 (b/v). Berdasarkan prinsipnya, metode ini menggunakan proses pengadukan, maka pada penelitian ini dilakukan pengadukan menggunakan *stirrer* dengan kecepatan pengadukan 510 rpm

selama 1 jam dengan kecepatan konstan. Menurut Benhaddou-Andalousi (2011), maserasi yang dilakukan selama 24 jam belum cukup untuk memperoleh zat-zat penting yang terkandung dalam simplia sehingga dilakukan remaserasi untuk mengambil zat-zat yang mungkin tersisa. Pada saat maserasi, konsentrasi etanol yang digunakan tidak terlalu tinggi untuk mencegah penguapan zat-zat penting pada simplisia akibat konsentrasi etanol yang sangat tinggi. Etanol kemudian dievaporasi dengan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C dan kecepatan putar *rotary evaporator* 40 rpm (tidak menghasilkan *bumping*) hingga terbentuk ekstrak yang pekat.

Hasil evaporasi kemudian di oven pada suhu 40°C *overnight*, tetapi konsistensi ekstrak tidak terlalu pekat sehingga dipindahkan pada oven dengan suhu 37°C selama 3 hari, tetapi ekstrak yang didapatkan juga belum terlalu pekat. Oleh karena itu, ekstrak kemudian dievaporasi kembali, tetapi hasil yang didapatkan terlalu kental sehingga menempel pada labu alas bulat. Hasil evaporasi yang didapatkan dari 200 gram serbuk biji jintan hitam adalah 33 gram.

Setelah mendapatkan ekstrak biji jintan hitam, uji fitokimia dilakukan untuk melihat kandungan dari ekstrak tersebut, terutama kandungan thymoquinon ekstrak. Uji ini bersifat kualitatif karena hanya melihat kandungan apa saja yang terdapat pada tanaman. Pada penelitian ini uji fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi minyak atsiri, saponin, protein, dan alkaloid. Hasil positif kandungan didapatkan pada minyak atsiri, protein, dan alkaloid. Hasil ini juga didukung dengan pernyataan dalam jurnal El-Tahir *et al.*, 2006, tetapi hasil negatif didapatkan pada saponin yang pada jurnal yang sama menyatakan bahwa terdapat kandungan saponin pada ekstrak biji jintan hitam sejumlah 0,013% (w/w). Hasil negatif ini dimungkinkan karena metode identifikasi terhadap

saponin yang dilakukan dalam penelitian ini dengan metode pengocokan tidak optimal dibandingkan dengan metode kuantitatif seperti HPLC-UV (Avula *et al.*, 2010). Selain itu, metode ekstraksi yang belum memaksimalkan pengeluaran kandungan simplisia sehingga pada saat pendeteksian kandungan simplisia tersebut bernilai negatif.

Identifikasi minyak atsiri dilakukan dengan menambahkan sudan III pada ekstrak dan memberikan hasil positif dengan timbulnya warna merah. Thymoquinon merupakan salah satu kandungan minyak atsiri yang bersifat volatil pada ekstrak biji jintan hitam dengan kadar 27,8-57,0% (w/w) (Al-Attar, 2010). Pada penelitian ini tidak dilakukan standarisasi ekstrak karena keterbatasan sarana. Standarisasi ekstrak perlu dilakukan untuk mengetahui kuantitas dari kandungan thymoquinon atau kandungan aktif lain yang berfungsi terapeutik dari ekstrak tersebut.

Anestesi hewan coba menggunakan Ketamin HCL secara intravena 0,2 mL di *ad* 0,5 mL dengan *water for injection* untuk semua tikus, kemudian dilakukan pembedahan di daerah peritoneal, lalu diinjeksikan insulin *rapid acting* sehingga segera terjadi fosforilasi tirosin di IRS-1 dengan aktivasi insulin reseptor (Hennige *et al.*, 2005) dan lokasi injeksi adalah pada vena porta hepatica karena merupakan vena yang paling mudah untuk dilakukan injeksi. Proses distribusi insulin ke seluruh tubuh membutuhkan waktu sehingga diberi waktu 120 detik sebelum di *euthanasia* dengan menyuntikkan *syringe* berisi udara ke daerah batang otak tikus melalui bagian bawah tempurung kepala tikus yang akan menyebabkan kerusakan batang otak dan selanjutnya kematian.

Pengukuran konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 dapat dilakukan dengan melakukan metode pembedahan sederhana pada jaringan otot hewan coba (Hotamisligil *et al.*, 1994) dan IRS-1 merupakan IRS terbesar yang ada pada otot rangka (Wilcox, 2005). Pada penelitian ini yang diambil adalah jaringan otot pada bagian paha hewan coba berdasarkan teori tersebut. Penyimpanan jaringan otot di dalam wadah (*sentrifuge tube*) pada suhu 4°C untuk menghambat terjadinya proses enzimatik yang dapat mendenaturasikan protein dalam otot yang akan diekstraksi dalam proses pembuatan homogenasi ini. Tekstur yang keras dari jaringan otot dan ikutnya lemak pada homogenat mengharuskan homogenat harus dicacah untuk mempermudah penggerusan. Penggerusan jaringan otot di atas mortir dingin dan waktu yang konstan untuk tiap sampel dilakukan untuk mencegah terjadinya pengrusakan pada protein yang diisolasi dan penggerusan yang tidak seragam. Hasil penggerusan tidak halus dan masih memiliki jaringan lemak yang menempel. Hasil penggerusan dimasukkan ke wadah (*sentrifuge tube*) sampel, lalu di vortex sebentar dengan vortex mixer agar *buffer lysis* benar-benar tercampur dengan homogenat yang sudah digerus. Inkubasi selama 30 menit pada suhu 4°C untuk mereaksikan *buffer lysis* dengan jaringan otot. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Hasil dari sentrifugasi berupa supernatan (protein terlarut) dan pelet (zat-zat lain). Sentrifugasi dilakukan sebanyak dua kali untuk memisahkan jaringan lemak yang masih terbawa pada pengambilan supernatan.

Penambahan *buffer lysis* sebelum penggerusan dimaksudkan agar protein yang ada dalam sel dapat keluar dan terlarut dalam *buffer lysis*. *Buffer lysis* terbuat dari campuran berbagai komposisi dengan fungsinya masing-masing yang telah dijelaskan pada definisi operasional. Homogenat yang didapatkan

tidak menjalani proses pemurnian (purifikasi) karena metode yang digunakan adalah ELISA *sandwich*. Thompson (2010) dalam *Immunoanalysis-Part 2: Basic Principles of ELISA* mengemukakan bahwa ELISA *sandwich* memiliki keuntungan dibandingkan jenis ELISA lainnya, yaitu tidak dibutuhkan purifikasi karena memiliki sensitivitas ikatan antigen-antibodi yang tinggi. Pemisahan supernatan dan pelet dilakukan agar tidak terjadi bias pada saat pembacaan ELISA yang menggunakan nilai absorbansi untuk pembacaan. Kerugian dari metode ini, yaitu dibutuhkan antibodi yang saling berpasangan sehingga tidak semua antibodi dapat digunakan (Thompson, 2010).

ELISA atau *enzym linked immunosorbent assay* merupakan salah satu metode yang dapat menentukan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 dengan menggunakan enzim untuk mendeteksi ikatan antigen dan antibodi. Pada hari pertama pengujian ELISA dilakukan coating plate dengan antibodi sebagai lapisan awal dan kemudian di inkubasi selama 1 malam pada suhu 4°C. Hal ini dilakukan agar *coating* pada *plate* berjalan lebih maksimal. Hari kedua hasil inkubasi dicuci dengan PBS-Tween yang berfungsi sebagai *wash buffer* untuk menghilangkan antibodi (tirosin terfosforilasi IRS-1) dan antigen (anti tirosin terfosforilasi IRS-1) yang dapat berikatan secara tidak spesifik. Lalu dilakukan *blocking buffer* (BSA-PBS) untuk memaksimalkan penurunan ikatan yang tidak spesifik antara antibodi dan antigen, serta stabilisasi protein. Penambahan enzim SAHRP berguna untuk menandai ikatan antigen dan antibodi (di ruang gelap) sehingga pada saat well ditambahkan dengan enzim ini akan berubah warna dari bening menjadi kuning. Tahap akhir *coating*, yaitu dengan penambahan *stop solution* dengan H₂SO₄ 2N sebanyak 50 µl untuk menghentikan reaksi perubahan warna dari enzim SAHRP. Prinsip utama ELISA adalah antigen yang

dikenali dengan spesifisitas yang tinggi oleh antibodi, dimana antibodi tersebut merupakan protein-protein yang diproduksi oleh sistem imun. Sistem imun hewan memproduksi antibodi sebagai respon kehadiran antigen. Antibodi ini bisa mengenali dan mengikat ke antigen, ikatan yang terbentuk kemudian akan ditandai sebagai cara pendeteksian (Thompson, 2010).

Pada uji non parametrik Kruskal wallis didapatkan nilai $p > 0,05$ (0,151) sehingga dapat dikatakan bahwa tidak terdapat perbedaan nyata konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 di tiap kelompok. Pada perhitungan rerata konsentrasi tirosin terfosforilasi tiap kelompok secara sederhana didapatkan hasil sebagai berikut.

$$P_n < P_p < P_2 < P_1 < P_0 < P_3$$

Data tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 di tiap kelompok dari nilai terendah hingga tertinggi, tetapi tidak signifikan. Griffin *et al.*, (1999) mengemukakan bahwa penurunan ambilan glukosa dalam darah (hiperglikemi) memiliki hubungan erat dengan penurunan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 sehingga pada penelitian ini kemungkinan proses ambilan glukosa dalam darah pada tikus masih berlangsung normal. Proses ambilan glukosa dalam darah pada tikus masih berlangsung normal kemungkinan disebabkan konsentrasi glukosa dalam darah belum mencapai kondisi hiperglikemi yang dipengaruhi oleh induksi fruktosa pada tikus yang tidak maksimal, pengambilan glukosa darah puasa pada saat yang tidak bersamaan, dan tikus yang bergerak aktif. Faktor-faktor tersebut akan dijelaskan pada topik selanjutnya.

Secara umum diketahui bahwa tingkat glukosa darah dipengaruhi oleh tingkat aktivitas, konsumsi makanan yang tidak seimbang, dan tingkat stress (diabetes.co.uk). Pada penelitian ini, ketiga hal tersebut memiliki peran penting dalam menentukan tingkat glukosa darah tikus dimana konsumsi makanan yang tidak seimbang diwakili dengan induksi fruktosa yang berlebih pada tikus. Peningkatan konsentrasi pada glukosa darah puasa tikus terjadi pada tikus (b), tetapi peningkatan tersebut masih dalam rentang normoglikemik, yaitu 85-132 mg/dL. Penurunan konsentrasi pada glukosa darah puasa tikus setelah perlakuan terjadi pada tikus (c). Hasil yang tidak merata ini kemungkinan disebabkan pengukuran insulin yang tidak bersamaan sehingga waktu puasa tikus satu dengan yang lain tidak sama yang diperburuk dengan jumlah sisa makanan yang cukup banyak. Poretzky (ed. 2010) dinyatakan bahwa ketika waktu puasa diperpanjang, proporsi dari proses glukoneogenesis akan meningkat dan setelah puasa *overnight*, tidak ada simpanan glukosa dan semua glukosa telah dipakai oleh jaringan untuk dioksidasi sempurna atau dikonversi menjadi laktat, yang secara sederhana dapat dinyatakan bahwa glukosa dalam darah akan menurun dengan dilakukannya puasa.

Selain itu, aktivitas dari tikus yang cukup aktif (salah satu penanda tikus sehat) kemungkinan menjadi penyebab penurunan glukosa darah puasa tikus. ADA (*American Diabetes Association*) menyatakan bahwa aktivitas dapat mempengaruhi penurunan glukosa darah melalui peningkatan sensitivitas insulin, sehingga sel dapat menggunakan insulin dengan lebih baik untuk ambilan glukosa selama dan setelah aktivitas untuk menghasilkan energi. Hal lain yang dapat menyebabkan fluktuasi dari glukosa darah puasa tikus setelah induksi fruktosa adalah konsumsi makanan yang berbeda pada tiap tikus sehingga

fruktosa yang masuk ke dalam tubuh tikus tidak mencapai 16 gram seperti yang telah direncanakan semula. Padahal tujuan awal dari induksi fruktosa, yaitu memberikan efek peningkatan glukosa yang berlebih atau hiperglikemi sehingga sensitivitas insulin menurun. Sensitivitas insulin yang seharusnya dihambat oleh pemberian fruktosa secara berlebih tidak tercapai karena konsumsi fruktosa per harinya tidak mencapai 16 gram sehingga dalam penelitian ini insulin masih bekerja dengan baik dan berdampak pada penurunan glukosa darah puasa setelah pemberian induksi fruktosa selama 6 minggu. Hal ini diperburuk dengan perlakuan pemberian ekstrak biji jintan hitam yang memiliki fungsi salah satunya sebagai terapi antidiabetes dengan salah satu mekanismenya, yaitu penurunan glukoneogenesis oleh zat thymoquinon yang terkandung dalam ekstrak biji jintan hitam. Selain itu, zat thymoquinon juga terbukti meningkatkan ambilan glukosa di jaringan perifer.

Fluktuasi data glukosa darah puasa juga dapat disebabkan gangguan yang terjadi pada alat pengukur glukosa darah tikus yang dalam penelitian ini digunakan glukosemeter digital. Beberapa faktor yang mungkin dapat mempengaruhi hasil dari pengukuran glukosa menggunakan *glucometer* pada penelitian ini menurut AADE (*American Association of Diabetes Educators*) tahun 2013, yaitu kualitas strip yang menurun yang berhubungan dengan masa kadaluarsa atau kualitas produksi dari strip tersebut, pengguna alat tidak mencuci tangan terlebih dahulu sebelum menggunakan alat, kadar hematokrit yang dipengaruhi oleh kondisi dehidrasi atau anemia, pengaruh temperatur dan kelembapan, penyimpanan dan perawatan alat yang tidak benar, dan alat yang tidak dikalibrasi dengan baik. Kalibrasi alat dengan larutan kontrol dilakukan

sesuai dengan petunjuk yang ada pada alat untuk memastikan keakuratan alat pengukuran.

Secara normal, tubuh akan memberikan respon terhadap peningkatan glukosa darah dengan meningkatkan sekresi insulin. Sekresi insulin ini akan menstimulasi ambilan glukosa dan sintesis glikogen, serta inhibisi glikogenolisis dan glukoneogenesis, sehingga dicapai kondisi normoglikemi. Pada penelitian ini, induksi fruktosa digunakan untuk meningkatkan glukosa darah tikus untuk mencapai model DM 2, yaitu resistensi insulin dan menggunakan ekstrak biji jintan hitam untuk menghambat proses resistensi insulin tersebut yang ditandai dengan peningkatan tirosin terfosforilasi IRS-1 pada jaringan otot tikus. Induksi fruktosa pada tikus yang tidak mencapai 16 gram dan pemberian ekstrak biji jintan hitam serta faktor lainnya seperti telah dijelaskan sebelumnya, membuat kondisi resistensi insulin belum terjadi dan insulin bekerja secara normal pada tubuh tikus. Hal ini mengakibatkan fluktuasi data baik dari data glukosa darah setelah induksi fruktosa maupun data konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1.

Pada umumnya, diketahui bahwa pemberian ekstrak biji jintan hitam akan menurunkan glukosa darah puasa dan kemudian akan meningkatkan konsentrasi tirosin terfosforilasi sebagai respon untuk meningkatkan sensitivitas insulin. Hasil perhitungan rata-rata konsentrasi tirosin terfosforilasi didapatkan dari yang terendah hingga tertinggi adalah sebagai berikut.

$$P_n < P_p < P_2 < P_1 < P_0 < P_3$$

Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa biji jintan hitam dosis 96 mg/kgBB memiliki efek meningkatkan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS. Peningkatan konsentrasi tirosin terfosforilasi tertinggi pada tikus 16 (0,716 $\mu\text{g/dL}$) jika

dibandingkan dengan kelompok normal yang berkisar 0,197-0,591 $\mu\text{g/dL}$. Namun, pada nilai delta glukosa darah puasa tikus memberikan data minus pada tikus 15 dan 16. Data delta glukosa yang bervariasi ini dipengaruhi oleh berbagai faktor yang telah dijelaskan sebelumnya.

Uji korelasi Pearson kemudian dilakukan untuk melihat tingkat korelasi yang terjadi pada data delta glukosa darah puasa dengan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 per perlakuan. Hasil analisis korelasi Pearson yang berupa tabel yang terdiri atas koefisien korelasi (r), nilai p , dan jumlah subjek (n) dapat memberikan informasi mengenai ada atau tidaknya korelasi antar variabel (nilai p), kekuatan korelasi antar variabel (r), dan arah korelasi antar variabel (nilai r yang + dan -). Contoh, tabel hasil analisis korelasi Pearson Kelompok Pp didapatkan nilai $r=-1,000$ yang berarti kekuatan korelasi yang terjadi antara delta glukosa dengan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 adalah sangat kuat dengan arah korelasi positif (-), yaitu berlawanan arah yang berarti semakin besar nilai delta glukosa, semakin kecil nilai konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1, dan sebaliknya semakin besar nilai konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1, semakin kecil nilai delta glukosa. Nilai p yang didapatkan adalah $<0,05$ sehingga terdapat korelasi yang signifikan antara delta glukosa dan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1.

Hasil pada kelompok Pp tentunya tidak sesuai dengan yang diharapkan dari penelitian ini, yaitu semakin besar nilai delta glukosa, semakin besar pula nilai konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1. Namun, pada kelompok P1, P2, dan P3 memberikan interpretasi yang berbeda yang sesuai dengan harapan pada penelitian ini, yaitu semakin besar nilai delta glukosa, semakin besar pula nilai konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 dengan melihat dari arah korelasi positif (+)

yang didapatkan dengan kekuatan korelasi dan signifikansi korelasi yang berbeda pada tiap kelompok perlakuan. Hasil statistik yang berbeda ini memiliki alasan yang berdasar pada nilai yang bervariasi dari glukosa darah puasa dan konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1.



BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Setelah dilakukan penelitian tentang uji aktivitas peningkatan sensitivitas insulin melalui pengukuran konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 pada tikus model DM 2 dapat disimpulkan bahwa:

1. ekstrak biji jintan hitam secara statistik tidak memiliki efek peningkatan sensitivitas insulin melalui peningkatan konsentrasi tirosin terfosforilasi pada IRS-1 yang berbeda pada tiap perlakuan dengan nilai $p > 0,05$ (0,151).
2. Terdapat kekuatan dan signifikansi korelasi yang bervariasi pada tiap kelompok perlakuan.

Kedua hasil tersebut kemungkinan disebabkan kegagalan induksi fruktosa untuk mengkondisikan tikus menjadi tikus model DM 2.

7.2 Saran

Hendaknya dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek pemberian biji jintan hitam terhadap konsentrasi tirosin terfosforilasi IRS-1 dengan induksi DM 2 melalui diet tinggi fruktosa. Metode lain diperlukan untuk mengetahui efektivitas metode meliputi biaya serta waktu yang digunakan untuk menjalankan penelitian. Pemberian diet tinggi fruktosa untuk induksi DM 2 hendaknya dioptimasi meliputi cara pemberian, dosis, dan lama waktu yang diperlukan untuk mencapai kondisi DM 2.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Attar, AM & Al-Taisan WA 2010, 'Preventive Effects of Black Seed (*Nigella sativa*) Extract on Sprague Dawley Rats Exposed to Diazinon,' *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, vol. 4 no. 5, pp. 957-968.
- Al-Awadi FM, Khattar, MA & Gumaa KA 1985, 'On the mechanism of the hypoglycemic effect of a plant extract. *Diabetologia*, vol. 28, no. 7, pp. 432-434.
- Al-Awadi, F, Fatania, H & Shamte U 1991, 'The effect of a plant's mixture extract on liver gluconeogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats,' *Diabetes Res*, no. 18, pp. 163-168.
- Al-Awadi, FM & Gumaa KA 1987, 'Studies on the activity of individual plants of an antidiabetic plant mixture,' *Acta Diabetol*, vol. 24, no. 1, pp.7-41.
- Alessi, DR & Cohen P 1998, 'Mechanism of activation and function of protein kinase B,' *Curr Opin Genet Dev*, no. 8, pp. 55-62.
- Al-Hader, AA, Aqel, MB & Hasan ZA 1993, 'Hypoglycemic effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds,' *Int J Pharmacogn*, no. 31, pp. 96-100.
- American Association of Diabetes Educators 2013, *Practice Advisory Blood Glucose Meter Accuracy*, diakses 24 Februari 2014, <http://www.diabeteseducator.org/export/sites/aade/resources/pdf/research/Practice_Advisory_BGM_FINAL.pdf>
- American Diabetes Association 2013, *Blood Glucose Control and Exercise*, Vatican, diakses 12 Februari 2014, <<http://www.diabetes.org/food-and-fitness/fitness/get-started-safely/blood-glucose-control-and-exercise.html>>
- Anggaraeni, MM, Suthiati, E & Indra MR 2009, 'Pemberian Quersetin Terhadap Perubahan Kadar TNF-Alpha Pada Serum Tikus Wistar Dengan Diet Tinggi Karbohidrat,' *Jurnal Kesehatan*, vol. 7, no. 2, pp. 67-73.
- Avula, B, Wang, YH & Ali Z 2010, 'Quantitative Determination of Chemical Constituents from Seeds of *Nigella sativa* L. Using HPLC-UV and Identification by LC-ESI-TOF,' *Journal of AOAC international*, vol. 93, no. 6, pp. 1778-1787.
- Azadi, HG & Farzaneh N 2010, 'Comparison of Two Regimens of *Nigella sativa* Extract for Treatment of Subclinical Mastitis Caused by *Staphylococcus aureus*,' *American Journal of Applied Sciences*, vol. 7, no. 9, pp. 1210-1214.

Bamosa, AP, Kaatabi, H, Lebda, FM, Elo, AMA & Al-Sultan A 2010, 'Effect of Nigella sativa Seeds on The Glycemic Control of Patients With Type 2 Diabetes Mellitus,' *Indian J Physiol Pharmacol*, vol. 54, no. 4, pp. 344–354.

Benhadou-Andaloussi, A, Martineau, L, Vuong, T, Meddah, B, Madiraju, P, Settaf, A & Haddad PS 2011, 'The In Vivo Antidiabetic Activity of Nigella sativa is Mediated Throug Activation of The AMPK Pathway and Icreased Muscle Glut4 Content,' *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 538671: 9 pages.

Bilal, A 2008, 'Effects of Different Preparations of Nigella sativa (NS) on Glucose and Lipid Metabolism in Type II Diabetic Patients,' Department of Food Technology Faculty of Crop and Food Sciences Pir Mehr Ali Shah Arid Agricultur University Rawalpindi, Pakistan.

Boseila, AAH & Messalam, AAH 2011, 'Immunostimulant Effect of Different Fractions of Nigella sativa L. Seeds against Rabies Vaccine,' *Nature and Science*, vol. 9, no. 2, pp. 90-96.

Buren, J, Liu, HX, Lauritz, J & Eriksson JW 2003, 'High Glucose and Insulin in Combination Cause Insulin Receptor Substrate-1 and -2 Depletion and Protein Kinase B Desensitisation in Primary Cultured Rat Adipocytes: Possible Implications for Insulin Resistance in Type 2 Diabetes,' *European Journal of Endocrinology*, vol. 148, pp. 157–167.

Cinti, S, Mitchell, G, Barbatelli, G, Murano, I, Ceresi, E, Faloia, E, Wang, S, Greenberg, AS & Obin MS 2005, 'Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans,' *J Lipid Res*, vol. 46, pp. 2347-2355.

Dipiro, JT, Talbert, RL, Yee, GC, Matzke, GR, Wells, BG, Posey, LM 2008, *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, 7th edn, The McGraw-Hill Companies, USA.

El-Dakhkhny, M, Lambert, MN & Ammon HP, 2002, 'The Hypoglycemic Effect of *Nigella sativa* Oil is Mediated by Extra Pancreatic Action,' *Planta Med*, vol. 68, pp. 465- 466.

El-Tahir, KEH & Bakeet DM 2006, 'The Black Seed Nigella sativa Linnaeus-A Mine for Multi Cures: A Plea for Urgent Clinical Evaluation of Its Volatile Oil,' *J T U Med Sc*, vol. 1, no. 1, pp. 1-19.

Fararh, KM, Atoji, Y, Shimizu, Y & Takewaki T 2002, 'Isulintropic properties of *Nigella sativa* oil in Streptozotocin plus Nicotinamide diabetic hamster,' *Res. Vet. Sci*, vol. 73, no. 3, pp. 279-282.

Fararh, KM, Atoji, Y, Shimizu, Y, Shiina, T, Nikami, H and Takewaki T 2004, 'Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of

Nigella sativa L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters,' *Res. Vet. Sci*, vol. 77, no. 2, pp. 123-129.

Fararh, KM, Shimizu, Y, Shiina, T, Nikami, H, Ghanem, MM & Takewaki, T 2005, 'Thymoquinone Reduces Hepatic Glucose Production in Diabetic Hamsters,' *Research in Veterinary Science*, pp. 219–223.

Federer, WT 1991. *Statistics and society: data collection and interpretation*, 2nd edn, Marcel Dekker, Inc., New York.

Gali-Muhtasib, H, El-Najjar, N & Schneider-Stock, R 2006, 'The Medicinal Potential of Black Seed (*Nigella sativa*) and its Components,' *Elsevier*, vol. Lead Molecules from Natural products, pp. 133-153.

Gilani, AH, Jabeen, Q & Khan MAU 2004, 'A Review of Medicinal Uses and Pharmacological Activities of *Nigella sativa*,' *Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol. 7, no. 4, pp. 441-451.

Griffin, ME, Marcucci, MJ, Cline, GW, Bell, K, Barucci, N, Lee, D, Goodyear, LJ, Kraegen, EW, White, MF & Shulman GI 1999, 'Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade,' *Diabetes*, vol. 48, pp. 1270-1274.

Hadzadeh, MAR, Pilavarian, AA, Hydari, K & Rassouli FB 2008, 'The Effect of Aqueous Extract of *Nigella sativa* L. Seeds in Streptozocin Induced Diabetic Rat,' *Pharmacologyonline*, vol. 3, pp. 986-991.

Han, YK, Jung, HW & Park, YK 2012, 'The Roots of *Atractylodes japonica* Koidzumi Promote Adipogenic Differentiation Via Activation of The Insulin Signaling Pathway in 3T3-L1 Cells,' *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 12, pp. 154

Hennige, AM, Lehmann, R, Weigert, C, Moeschel, K, Schauble, M, Metzinger, E, Lammers, R & Haring HU 2005, 'Insulin Glulisine. Insulin Receptor Signaling Characteristics In Vivo,' *Diabetes*, vol. 54, pp. 361–366.

Hotamisligil, GS, Budavari, A, Murray, D & Spiegelman, BM 1994, 'Reduced Tyrosine Kinase Activity of The Insulin Receptor in Obesity-Diabetes: Central Role of Tumor Necrosis Factor- α ,' *J.Clin. Invest.* Vol. 1994, pp. 1543-1549.

Houcher, Z, Boudiaf, K, Banboubetra, M & Houcher B 2007, 'Effects of Methanolic Extract and Commercial Oil of *Nigella sativa* L. on Blood Glucose and Antioxidant Capacity in Alloxan-Induced Diabetic Rats,' *Pteridines*, vol. 18, pp. 8-18.

Hyakukoku, M, Higashiura, K, Ura, N, Murakami, H, Yamaguchi, K, Wang, L, Furuhashi, M, Togashi, N & Shimamoto K 2003, 'Tissue-Specific Impairment of Insulin Signaling in Vasculature and Skeletal Muscle of Fructose-Fed Rats,' *Hypertens Res*, vol. 26, pp. 169–176.

International Diabetes Federation, The Global Burden, Diabetes atlas 5th edition, diakses tanggal 25 November 2012 <<http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/the-global-burden>>.

Javia, S, Manjula SN, Chakravarthy, KNP, Raghav, MM, Basirian, M & Mruthunjaya K 2011, 'Animal Models for Type-2 Diabetes Mellitus: A Review,' *IJPRD*, vol. 3, no. 12, pp. 23-33.

Kaleem, M, Karmani, D, Asif, M, Ahmed, Q & Bano B 2006, 'Biochemical effects of *Nigella sativa* L seeds in diabetic rats,' *Indian J Exp Biol*, vol. 44, pp. 745–748.

Kanter, M, Coskun, O, Korkmaz, A & Oter S 2004, 'Effects of *Nigella sativa* on Oxidative Stress and β -Cell Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats,' *The Anatomical Record Part A*, vol. 279A, pp. 685–691.

Kanter, M, Meral, I, Yener, Z, Ozbek, H & Demir H 2003, 'Partial regeneration/proliferation of the beta-cells in the islets of Langerhans by *Nigella sativa* L. in streptozotocin-induced diabetic rats,' *Tohoku J Exp Med*, vol. 201, pp. 213–219.

Khasanah, N 2009, *Pengaruh Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (Nigella sativa) Terhadap Respon Proliferasi limfosit Limpa Mencit BALB/C yang Diinfeksi Salmonella typhimurium*, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.

Kotani, K, Ogawa, W, Matsumoto, M, Kitamura, T, Sakaue, H, Hino, Y, Miyake, K, Sano, W, Akimoto, K, Ohno, S & Kasuga M 1998, 'Requirement of atypical protein kinase clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes,' *Mol Cell Biol*, vol. 18, pp. 6971-6982.

Kubota, N, Tobe, K, Terauchi, Y, Eto, K, Yamauchi, T, Suzuki, R, Tsubamoto, Y, Komeda, K, Nakano, R, Miki, H, Satoh, S, Sekihara, H, Sciacchitano, S, Lesniak, M, Aizawa, S, Nagai, R, Kimura, S, Akanuma, Y, Taylor, SI & Kadowaki T 2000, 'Disruption of Insulin Receptor Substrate 2 Causes Type 2 Diabetes Because of Liver Insulin Resistance and Lack of Compensatory β -Cell Hyperplasia,' *Diabetes*, vol. 49, pp. 1880–1889.

Kumar, N & Dey CS 2002, 'Metformin Enhances Insulin Signalling in Insulin-Dependent and -Independent Pathways in Insulin Resistant Muscle Cells,' *British Journal of Pharmacology*, vol. 137, pp. 329-336.

- Labhal, A, Settaf, A, Zalagh, F, Cherrah, Y, Hassar, M & Slaoui A 1999, 'Propri etes anti-diab etiques des graines de *Nigella sativa* chez le m erione shawi ob ese et diab etique,' *Esp erance M edicale*, vol. 47, pp. 72–74.
- Lark, DS 2010, *A single dose of metformin improves whole body insulin sensitivity and alters cellular redox state in skeletal muscle of Zucker fa/fa rats*, The Faculty of the Department of Exercise and Sport Science East Carolina University, USA.
- Laurence, J & Bacharach M 1964, *Analytical Toxicology*, CRC Press: Philadelphia.
- Le, PM, Benhaddou-Andalousi, A, Elimadi, A, Settaf, A, Cherrah, Y & Haddad PS 2004, 'The petroleum ether extract of *Nigella sativa* exerts lipidlowering and insulin-sensitizing actions in the rat,' *J Ethnopharmacol*, vol. 94, pp. 251–259.
- Liu, IM, Tzeng, TF & Liou SS 2011, 'A Chinese Herbal Decoction, Dang Gui Bu Xue Tang, Prepared from Radix Astragali and Radix Angelicae sinensis, Ameliorates Insulin Resistance Induced by A High-Fructose Diet in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 248231, pp. 1-11.
- Ma, HB, Shieh, KJ & Lee SL 2006, 'Study of ELISA Technique. *Nature and Science*, vol. 4, no. 2, pp. 36-37.
- Martindale The Complete Drug Reference* 2009, 36th edn, Pharmaceutical Press, London.
- Mc Connell, EL., Basit, AW., Murdan, S. 2008. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments (Abstrak). *J Pharm Pharmacol*, vol. 60, no. 1, pp. 63-70.
- Meral, I, Yener, Z, Kahraman, T & Mert N 2001, 'Effect of *Nigella sativa* on Glucose Concentration, Lipid Peroxidation, Antioxidant Defence System and Liver Damage in Experimentally Induced Diabetic Rabbits. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, vol. 48, no. 10, pp. 593-599.
- Mertens, I, Verrijken, A, Michiels, JJ, Van der Planken, M, Ruige, JB & Van Gaal LF 2006, 'Among inflammation and coagulation markers, PAI-1 is a true component of the metabolic syndrome,' *Int J Obes (Lond)*, vol. 30, pp. 1308-1314.
- Olokoba, A, Obateru, OA & Olokoba LB 2012, 'Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends,' *Oman Medical Journal*, vol. 27, no. 4, pp. 269-273.

- Paarakh, PM 2010, 'Nigella sativa Linn.-A Comprehensive Review,' *Indian Journal of Natural Products and Resources*, vol. 1, no.4, pp. 409-429.
- Poretzky, L (ed.) 2010, *Principles of Diabetes Mellitus*, Springer Science+Business Media, LLC.
- Pourghassem-Gargari, B, Ebrahimzadeh-Attary, V, Rafrat, M & Gorbani A 2009, 'Effect of dietary supplementation with *Nigella sativa* L. on serum lipid profile, lipid peroxidation and antioxidant defense system in hyperlipidemic rabbits,' *Journal of Medicinal plants Research*, vol. 3, no. 10, pp. 815-821.
- Qi, Q, Bray, GA, Smith, SR, Hu, FB, Sacks, FM & Qi L 2011, 'Insulin Receptor Substrate 1 Gene Variation Modifies Insulin Resistance Response to Weight-Loss Diets in a 2-Year Randomized Trial: The Preventing Overweight Using Novel Dietary Strategies (POUNDS LOST) Trial,' *Circulation*, vol. 124, pp. 563-571.
- Qin, B, Nagasaki, M, Ren, M, Bajotto, G, Oshida, Y & Sato Y 2004, 'Cinnamon Extract Prevents The Insulin Resistance Induced by a High-Fructose Diet,' *Horm Metab Res*, vol. 36, pp. 119-125.
- Rchid, H, Chevassus, H, Nmila, R, Guiral, C, Petit, P, Chokairi, M & Sauvaire Y 2004, '*N. sativa* seed extracts enhance glucose-induced insulin release from rat-isolated Langerhans islets,' *Fundam. Clin. Pharmacol*, vol. 18, no. 5, pp. 525-529.
- Roberfroid, MB 1999, Caloric Veneu of Inulin and Oligofructose (Abstrak), *Journal of Nutrition*, vol. 129, no. 7.
- Rocha, RL, Hilsenbeck, SG, Jackson, JG, Van den Berg, CL, Wenig, C, Lee, AV & Yee D 1997, 'Insulin-like growth factor binding protein-3 and insulin receptor substrate-1 in breast cancer: correlation with clinical parameters and disease-free survival', *Clin. Cancer Res*, vol. 3, pp. 103-109.
- Saini, V 2010, 'Molecular Mechanism of Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus,' *World J Diabetes*, vol. 1, no. 3, pp. 68-75.
- Savage, JA, Paspaliaris, B, Silvestrini, R, Davies, D, Nikoloutsopoulos, T, Sturgess, A, Neil, J, Pollock, W, Dunster, K & Hendle M 1998, 'A review of immunofluorescent patterns associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and their differentiation from other antibodies,' *J Clin Pathol*, vol. 51, pp. 568-575.
- Sethi, A 2003, '*Systemic Lab Experiments in Organic Chemistry*, New Age International (P) Limited Publisher, New York.
- Shoelson, SE, Herrero, L & Naaz A 2007, 'Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance,' *Gastroenterology*, vol. 132, no. 6, pp. 2171.

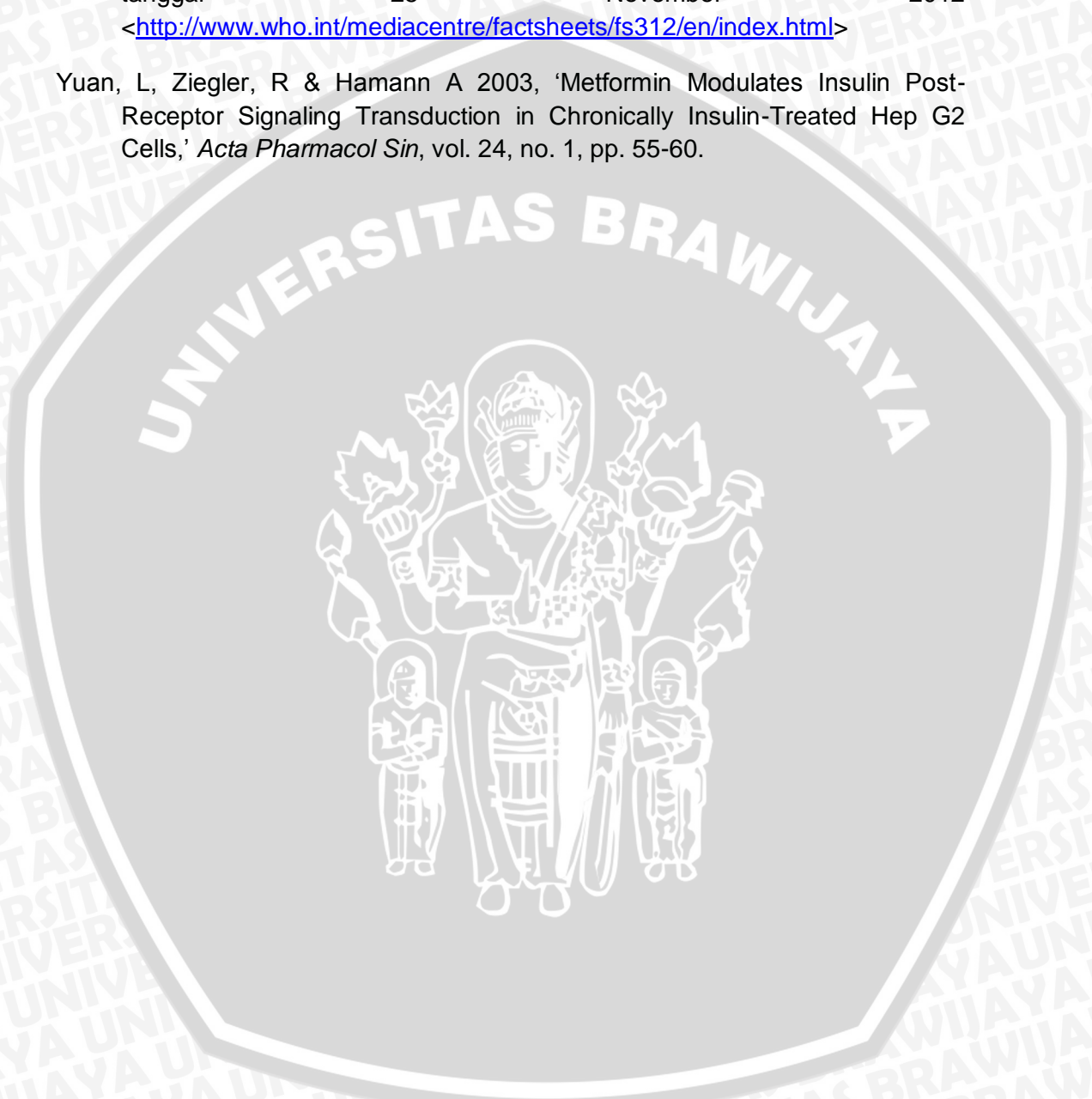
- Shoelson, SE, Lee, JS & Goldfine AB 2006, 'Inflammation and Insulin Resistance,' *J. Clin. Invest*, vol. 116, pp. 1793–1801.
- Singla, P, Bardoloi, A & Parkash AA 2010, 'Metabolic Effects of Obesity: A Review,' *World J Diabetes*, vol. 1, no. 3, pp. 76-88.
- Spranger, J, Kroke, A, Mohlig, M, Hoffmann, K, Bergmann, MM, Ristow, M, Boeing, H & Pfeiffer AFH 2003, 'Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study,' *Diabetes*, vol. 52, pp. 812–817.
- Stanhope, KL & Havel PJ 2010, 'Fructose Consumption: Recent Results and Their Potential Implications,' *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1190, pp. 15–24.
- Stefan, N, Vozarova, B, Funahashi, T, Matsuzawa, Y, Weyer, C, Lindsay, RS, Youngren, JF, Havel, PJ, Pratley, RE, Bogardus, C & Tataranni PA 2002, 'Plasma Adiponectin Concentration is Associated With Skeletal Muscle Insulin Receptor Tyrosine Phosphorylation, and Low Plasma Concentration Precedes a Decrease in Whole-Body Insulin Sensitivity in Humans,' *Diabetes*, vol. 50, pp. 1884–1888
- Tanaka, Y, Iwamoto, H, Onuma, T & Kawamori R 1997, 'Inhibitory effect of metformin on formation of advanced glycation end products,' *Curr Ther Res*, vol. 58, pp. 693–697.
- Thompson, M 2010, 'Immunoanalysis-Part 2: Basic Principles of ELISA. *AMCTB*, no. 45, pp. 1-2.
- Tilg, H & Moschen AR 2008, 'Inflammatory Mechanism in The Regulation of Insulin Resistance,' *MOLMED*, vol. 14, no. 3-4, pp. 222-231.
- Tiwari, P, Kumar B, Kaur, M, Kaur, G & Kaur H 2011, 'Phytochemical Screening and Extraction: A Review,' *Internationale Pharmaceutica Scientia*, vol.01, pp. 98-106.
- Ura, K, Soyano, K, Omoto, N, Adachi, S & Yamauchi K 1996, 'Localization of Na⁺/K⁺-ATPase in tissues of rabbit and teleosts using an antiserum directed against a partial sequence of the α -subunit. *Zool. Sci*, vol. 13, pp. 219–227.
- White, MF, Shoelson, SE, Keutmann, H & Kahn CR 1988, 'A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor,' *J Biol Chem*, vol. 263, pp. 2969-2980.
- Widad, S, Khettal, B, Belmouhoub, M, atmani, D, Duez, P & Benboubetra M 2011, 'Hepatotoxicity and Langerhans Islets Regenerative Effects of Polar and Neutral Lipids of *Nigella sativa* L. in Nicotinamide/streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Pteridines*, vol. 22, pp. 97-104.

repository.ub.ac.id

Wilcox, G 2005, 'Insulin and Insulin Resistance,' *Clin Biochem Rev*, vol. 26, no. 2, pp. 19–39.

World Health Organization 2012. Diabetes fact and sheet No. 132, diakses tanggal 25 November 2012
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>>

Yuan, L, Ziegler, R & Hamann A 2003, 'Metformin Modulates Insulin Post-Receptor Signaling Transduction in Chronically Insulin-Treated Hep G2 Cells,' *Acta Pharmacol Sin*, vol. 24, no. 1, pp. 55-60.



Lampiran 1

Alokasi Waktu Penelitian

Kegiatan	2013																								2014			
	Januari				Februari				Maret				April				Mei				Juni				Maret			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Seminar proposal																												
Pengurusan ijin etik																												
Pengurusan administrasi Lab																												
Pemesanan tikus																												
Pengkondisian hewan coba																												
Pembelian biji jintan hitam																												
Ekstraksi biji jintan hitam																												
Uji Fitokimia																												
Induksi diabetes mellitus																												
Pemberian ekstrak biji jintan hitam																												
Pembedahan dan pengujian																												
Pengumpulan dan Tabulasi Data																												
Analisa data dan Penyelesaian Tugas Akhir																												
Ujian Sidang Tugas Akhir																												

Lampiran 2

Alokasi Biaya Penelitian

No	Deskripsi	Jumlah	Harga Satuan (Rupiah)	Total (Rupiah)
Penyediaan dan perawatan hewan coba				
1	Tikus strain wistar	24 ekor	35.000,00	840.000,00
2	Sewa kandang	24 buah	20.000,00	480.000,00
3	Pakan tikus	24 ekor	10.000,00	240.000,00
Ekstraksi biji jintan hitam				
1	Biji jintan hitam serbuk	1 kg	75.000,00	75.000,00
2	Ethanol 80%	1 lt	361.000,00/ltr	361.000,00
Uji Fitokimia				
1	Reagen Sudan III	10 ml	10.000,00	10.000,00
2	Reagen Meyer	10 ml	10.000,00	10.000,00
3	Reagen Wagner	10 ml	10.000,00	10.000,00
4	Reagen Dragendroff	10 ml	10.000,00	10.000,00
5	Konsentrat nitrat	10 ml	10.000,00	10.000,00
Induksi DM tipe 2				
1	Fruktosa	500 g	1.750.000,00/500 g	1.750.000,00
2	Glucose stick	24 stick	8.000,00/stick	192.000,00
Antibodi				
1	Anti Rabbit IgG Biotin	7 ml	13.090,00	91.630,00
2	Rabbit Anti-phospho-irs1 (tyr1222) polyclonal antibody	100 µl	2.100.000,00	2.100.000,00
Pengukuran Konsentrasi Fosforilasi Tirosin IRS-1				
1	Penelitian Biomedik Umum	1 orang	509.717,00	509.717,00
Jumlah				6.689.347,00

Lampiran 3

Perhitungan Dosis Metformin untuk Tiap Tikus

Dosis lazim metformin pada manusia adalah 2×750 mg atau 1500 mg/hari.

Dosis metformin untuk tikus 200 gram adalah sebesar 27 mg dengan nilai konversi dosis manusia ke tikus adalah sebesar 0,018.

Tikus yang digunakan memiliki berat badan sebesar 150-220 gram, maka dosis metformin yang dibutuhkan untuk tiap tikus adalah sebagai berikut.

No.	Berat Badan Tikus (gram)	Dosis Metformin (mg)
1.	150	20,25
2.	160	21,60
3.	170	22,95
4.	180	24,30
5.	190	25,65
6.	200	27,00
7.	210	28,35
8.	220	29,70

Lampiran 4

Tabel Konversi Dosis Hewan dengan Manusia

	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmut 400 g	Kelinci 1,2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	12,25	27,8	64,1	124,2	387,2
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	9,2	17,8	56,0
Marmut 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,2 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	2,4	4,5	14,2
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,0031	0,07	0,16	0,32	1,0

Sumber: Laurence and
Bacharach, 1964



Lampiran 5

HASIL UJI STATISTIK SPSS

1. Uji Normalitas Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1

Tests of Normality

NO.PE RLAKU AN	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
KONSENTRASI.IRS 1	.369	3	.	.789	3	.089
2	.385	3	.	.750	3	.000
3	.224	3	.	.984	3	.762
4	.295	4	.	.829	4	.165
5	.270	3	.	.949	3	.564
6	.282	4	.	.825	4	.156

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

NO.PERLAKUAN			Statistic	Std. Error
KONSENTRASI.IRS	1	Mean	.02600	.018520
		95% Confidence Interval for Mean		
		Lower Bound	-.05369	
		Upper Bound	.10569	
		5% Trimmed Mean	.	
		Median	.00900	
		Variance	.001	
		Std. Deviation	.032078	
		Minimum	.006	
		Maximum	.063	
		Range	.057	
		Interquartile Range	.	
		Skewness	1.715	1.225

	Kurtosis		.	.
2	Mean		.01100	.003000
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-.00191	
		Upper Bound	.02391	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		.01400	
	Variance		.000	
	Std. Deviation		.005196	
	Minimum		.005	
	Maximum		.014	
	Range		.009	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		-1.732	1.225
	Kurtosis		.	.
3	Mean		.03067	.006692
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.00187	
		Upper Bound	.05946	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		.02900	
	Variance		.000	
	Std. Deviation		.011590	
	Minimum		.020	
	Maximum		.043	
	Range		.023	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		.634	1.225
	Kurtosis		.	.
4	Mean		.03675	.007750
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.01209	
		Upper Bound	.06141	



	5% Trimmed Mean		.03661	
	Median		.03550	
	Variance		.000	
	Std. Deviation		.015500	
	Minimum		.023	
	Maximum		.053	
	Range		.030	
	Interquartile Range		.028	
	Skewness		.125	1.014
	Kurtosis		-5.245	2.619
5	Mean		.06367	.025783
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-.04727	
		Upper Bound	.17460	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		.05200	
	Variance		.002	
	Std. Deviation		.044658	
	Minimum		.026	
	Maximum		.113	
	Range		.087	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		1.095	1.225
	Kurtosis		.	.
6	Mean		.03825	.014168
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-.00684	
		Upper Bound	.08334	
	5% Trimmed Mean		.03711	
	Median		.02800	
	Variance		.001	
	Std. Deviation		.028336	

Minimum	.018	
Maximum	.079	
Range	.061	
Interquartile Range	.050	
Skewness	1.561	1.014
Kurtosis	2.201	2.619



2. Uji Normalitas Transformasi \sqrt{x} Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1

Tests of Normality

NO.PE RLAKU AN	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
squareIRS 1	.352	3	.	.824	3	.174
2	.385	3	.	.750	3	.000
3	.200	3	.	.995	3	.863
4	.293	4	.	.822	4	.148
5	.229	3	.	.982	3	.741
6	.248	4	.	.866	4	.281

a. Lilliefors Significance Correction

3. Uji Normalitas Transformasi $1/\sqrt{x}$ Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1

Tests of Normality

NO.PE RLAKU AN	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
sepersquareIRS 1	.285	3	.	.932	3	.495
2	.385	3	.	.750	3	.000
3	.184	3	.	.999	3	.927
4	.289	4	.	.811	4	.124
5	.200	3	.	.995	3	.862
6	.254	4	.	.918	4	.527

a. Lilliefors Significance Correction



4. Uji Homogenitas Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1

Test of Homogeneity of Variances

KONSENTRASI.IRS

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.735	5	14	.063

5. Uji Non Parametrik Kruskal Wallis Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1

Ranks			
	NO.PE RLAKU AN	N	Mean Rank
KONSENTRASI.IRS	1	3	7.67
	2	3	3.33
	3	3	11.17
	4	4	12.75
	5	3	15.67
	6	4	11.38
	Total	20	

Test Statistics ^{a,b}	
	KONSENTRASI. IRS
Chi-Square	8.095
df	5
Asymp. Sig.	.151

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
NO.PERLAKUAN



6. Uji Normalitas Delta Glukosa Darah Puasa

Tests of Normality

NO.PE RLAKU AN	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DELTAGLUKOSA 1	.360	3	.	.809	3	.136
2	.368	3	.	.790	3	.091
3	.184	3	.	.999	3	.927
4	.287	4	.	.872	4	.306
5	.315	3	.	.890	3	.356

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

NO.PERLAKUAN			Statistic	Std. Error
DELTAGLUKOSA 1	Mean		-2.66667	1.219745E1
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-5.51481E1	
		Upper Bound	4.98147E1	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		8.00000	
	Variance		446.333	
	Std. Deviation		2.112660E	
	Minimum		-27.000	
	Maximum		11.000	
	Range		38.000	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		-1.693	1.225
	Kurtosis		.	
2	Mean		-1.66667	1.818730E1
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-7.99203E1	





	Mean	Upper Bound	7.65870E1	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		1.50000E1	
	Variance		992.333	
	Std. Deviation		3.150132E1	
	Minimum		-38.000	
	Maximum		18.000	
	Range		56.000	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		-1.714	1.225
	Kurtosis		.	.
3	Mean		3.53333E1	8.666667
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-1.95632	
		Upper Bound	7.26230E1	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		3.60000E1	
	Variance		225.333	
	Std. Deviation		1.501111E1	
	Minimum		20.000	
	Maximum		50.000	
	Range		30.000	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		-.199	1.225
	Kurtosis		.	.
4	Mean		2.45000E1	1.163687E1
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-1.25337E1	
		Upper Bound	6.15337E1	
	5% Trimmed Mean		2.40000E1	
	Median		2.00000E1	

	Variance		541.667	
	Std. Deviation		2.327373E1	
			1	
	Minimum		5.000	
	Maximum		53.000	
	Range		48.000	
	Interquartile Range		43.000	
	Skewness		.543	1.014
	Kurtosis		-2.939	2.619
5	Mean		3.83333E1	6.546585E1
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-2.43343E2	
		Upper Bound	3.20010E2	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		-5.00000	
	Variance		1.286E4	
	Std. Deviation		1.133902E2	
			2	
	Minimum		-47.000	
	Maximum		167.000	
	Range		214.000	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		1.469	1.225
	Kurtosis		.	

7. Uji Homogenitas Delta Glukosa Darah Puasa

Test of Homogeneity of Variances

DELTAGLUKOSA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7.479	4	11	.004

8. Uji Kruskal Wallis Delta Glukosa Darah Puasa

Ranks

	NO.PE RLAKU AN	N	Mean Rank
DELTAGLUKOSA	1	3	6.00
	2	3	7.00
	3	3	12.67
	4	4	9.50
	5	3	7.00
	Total	16	

Test Statistics^{a,b}

	DELTAGLUKOS A
Chi-Square	3.897
df	4
Asymp. Sig.	.420

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

NO.PERLAKUAN

9. Uji Korelasi Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1 dan Delta Glukosa Darah Puasa Kelompok Pp

Correlations			
		DELTA1	IRS1
DELTA1	Pearson Correlation	1	-1.000*
	Sig. (2-tailed)		.015
	N	3	3
IRS1	Pearson Correlation	-1.000*	1
	Sig. (2-tailed)	.015	
	N	3	3

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

10. Uji Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1 dan Delta Glukosa Darah Puasa Kelompok Pn

Correlations			
		DELTA2	IRS2
DELTA2	Pearson Correlation	1	-.541
	Sig. (2-tailed)		.636
	N	3	3
IRS2	Pearson Correlation	-.541	1
	Sig. (2-tailed)	.636	
	N	3	3



11. Uji Korelasi Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1 dan Delta Glukosa Darah Puasa Kelompok P₁

		Correlations	
		DELTA3	IRS3
DELTA3	Pearson Correlation	1	.573
	Sig. (2-tailed)		.612
	N	3	3
IRS3	Pearson Correlation	.573	1
	Sig. (2-tailed)	.612	
	N	3	3

12. Uji Korelasi Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1 dan Delta Glukosa Darah Puasa Kelompok P₂

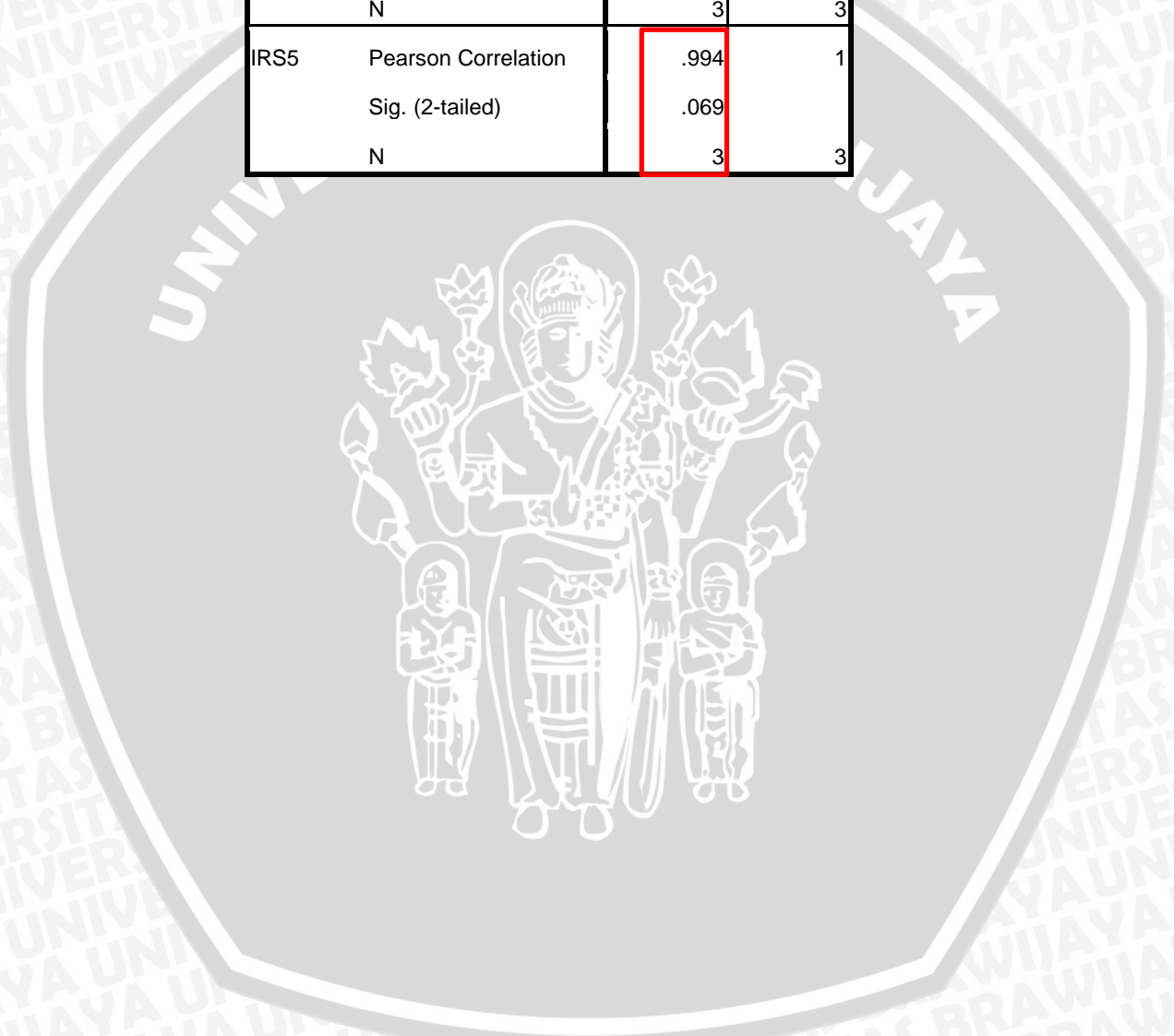
		Correlations	
		DELTA4	IRS4
DELTA4	Pearson Correlation	1	.128
	Sig. (2-tailed)		.872
	N	4	4
IRS4	Pearson Correlation	.128	1
	Sig. (2-tailed)	.872	
	N	4	4



13. Uji Korelasi Konsentrasi Tirosin Terfosforilasi IRS-1 dan Delta Glukosa Darah Puasa Kelompok P₃

Correlations

		DELTA5	IRS5
DELTA5	Pearson Correlation	1	.994
	Sig. (2-tailed)		.069
	N	3	3
IRS5	Pearson Correlation	.994	1
	Sig. (2-tailed)	.069	
	N	3	3



Lampiran 6

Sisa Pakan Tikus Induksi

Tanggal	Pn1 (1)		Pn2		Pn3 (2)		Pn4 (3)		Pn5 (4)	
	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa
28/03/2013	Sisa Pakan Tidak Dihitung									
29/03/2013										
30/03/2013										
31/03/2013										
01/04/2013										
02/04/2013										
03/04/2013	17	11,43	17	9,65	17	11,43	17	12,44	17	8,09
04/04/2013	17	8,48	17	10,08	17	4,83	17	5,3	17	10,78
05/04/2013	17	14,88	17	7,05	17	2,97	17	5,88	17	13,28
06/04/2013	17	16,31	17	12,05	17	4,42	17	9,8	17	14,66
07/04/2013	17	11,92	17	8,56	17	3,5	17	6,43	17	10,27
08/04/2013	19,5	8,97	19,5	7,25	19,5	3,59	19,5	5,47	19,5	8,23
09/04/2013	19,4	6,76	19,4	9,51	19,4	2,93	19,4	10,03	19,4	10,07
10/04/2013	19,5	5,03	19,5	3,51	19,5	0	19,5	3,79	19,5	5,9
11/04/2013	19,5	8,29	19,5	4,9	19,5	3,8	19,5	1,7	19,5	9,93
12/04/2013	19,5	10,03	19,5	8,75	19,5	3,96	19,5	9,07	19,5	10,13
13/04/2013	21	7,59	RIP	RIP	21	4,2	21	6,75	21	10,94
14/04/2013	17	3,84	RIP	RIP	17	0,93	17	1,88	17	7,4
15/04/2013	19,5	6,91	RIP	RIP	19,5	0	19,5	1,42	19,5	9,52
16/04/2013	19,5	11,48	RIP	RIP	19,5	9,01	19,5	4,6	19,5	10,78
17/04/2013	19,5	3,46	RIP	RIP	19,5	0	19,5	1,23	19,5	4,9
18/04/2013	19,5	6,66	RIP	RIP	19,5	0,33	19,5	6,57	19,5	11,41
19/04/2013	19,5	12,13	RIP	RIP	19,5	7,64	19,5	11,1	19,5	16,2
20/04/2013	19,5	4,76	0	0	19,5	0	19,5	0,53	19,5	6,48
21/04/2013	19,5	5,99	19,5	2,87	19,5	0	19,5	6,75	19,5	11,66
22/04/2013	19,5	2,72	RIP	RIP	19,5	1,6	19,5	2,27	19,5	6,16
23/04/2013	19,5	5,14	RIP	RIP	19,5	4,53	19,5	2,94	19,5	9,18
24/04/2013	19,5	1,17	RIP	RIP	19,5	3,82	19,5	1,48	19,5	6,65
25/04/2013	19,5	8,91	RIP	RIP	19,5	5,89	19,5	2,53	19,5	12,15
26/04/2013	19,5	4,21	RIP	RIP	19,5	4,56	19,5	2,29	19,5	10,6
27/04/2013	19,5	5,56	RIP	RIP	19,5	8,63	19,5	2,61	19,5	6,68
28/04/2013	19,5	2,71	RIP	RIP	19,5	8,17	19,5	3,03	19,5	9,34
29/04/2013	19,5	7,55	RIP	RIP	19,5	1,53	19,5	9,07	19,5	8,63
30/04/2013	19,5	6,44	RIP	RIP	19,5	8,38	19,5	6,13	19,5	11,13
01/05/2013	19,5	8,58	RIP	RIP	19,5	4,92	19,5	3,52	19,5	11,53
02/05/2013	22	6,14	RIP	RIP	22	8,32	22	6,2	22	8,25



Tanggal	Pp1 (5)		Pp2 (6)		Pp3 (7)		Pp4 (8)		Pp5 (9)	
	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa
28/03/2013	Sisa Pakan Tidak Dihitung									
29/03/2013										
30/03/2013										
31/03/2013										
01/04/2013										
02/04/2013										
03/04/2013	17	12,2	17	12,71	17	8,44	17	11,75	17	14,33
04/04/2013	17	11,18	17	11,35	17	12,7	17	4,79	17	17
05/04/2013	17	15,43	17	11,31	17	9,09	17	10,48	17	8,16
06/04/2013	17	10,3	17	12,53	17	10,78	17	5,14	17	6,91
07/04/2013	17	7,11	17	9,96	17	8,9	17	4,46	17	7,28
08/04/2013	19,5	6,04	19,5	4,24	19,5	5,22	19,5	2,28	19,5	7,66
09/04/2013	19,4	7,38	19,4	7,4	19,4	5,46	19,4	6,22	19,4	10,13
10/04/2013	19,5	2,43	19,5	4,47	19,5	6,01	19,5	7,4	19,5	5,59
11/04/2013	19,5	4,9	19,5	7,96	19,5	6,43	19,5	1,39	19,5	7,94
12/04/2013	19,5	7,8	19,5	8,83	19,5	11,01	19,5	4,08	19,5	8,43
13/04/2013	21	2,99	21	2,36	21	8,03	21	6,49	21	9,14
14/04/2013	17	1,09	17	9,25	17	4,09	17	4,17	17	5,41
15/04/2013	19,5	1,19	19,5	5,87	19,5	5,87	19,5	6,81	19,5	10,66
16/04/2013	19,5	1,66	19,5	10,5	19,5	7,97	19,5	6,92	19,5	7,19
17/04/2013	19,5	0,24	19,5	2,81	19,5	0	19,5	1,23	19,5	6,74
18/04/2013	19,5	3,77	19,5	8,57	19,5	7,54	19,5	2,91	19,5	8,8
19/04/2013	19,5	10,44	19,5	11,38	19,5	11,2	19,5	7,86	19,5	9,4
20/04/2013	19,5	0,18	19,5	2,38	19,5	0	19,5	0	19,5	4,11
21/04/2013	19,5	4,95	19,5	9,01	19,5	3,87	19,5	0	19,5	6,89
22/04/2013	19,5	1,2	19,5	5,33	19,5	4,39	19,5	2,58	19,5	7,66
23/04/2013	19,5	6,91	19,5	8,47	19,5	8,09	19,5	6,68	19,5	9,6
24/04/2013	19,5	0,54	19,5	6,18	19,5	4,69	19,5	2,46	19,5	6,85
25/04/2013	19,5	1,67	19,5	8,72	19,5	7,44	19,5	8,44	19,5	10,96
26/04/2013	19,5	4,59	19,5	7,34	19,5	5,23	19,5	4,26	19,5	7,03
27/04/2013	19,5	1,72	19,5	5,1	19,5	5,23	19,5	4,99	19,5	7,76
28/04/2013	19,5	0	19,5	8,22	19,5	5,85	19,5	3,27	19,5	8,16
29/04/2013	19,5	3,64	19,5	5,41	19,5	1,61	19,5	13	19,5	7,4
30/04/2013	19,5	4,5	19,5	9,93	19,5	12,13	19,5	9,82	19,5	9,82
01/05/2013	19,5	2,09	19,5	10,31	19,5	10,22	19,5	5,63	19,5	9,67
02/05/2013	22	8,75	22	9,22	22	8,85	22	6,3	22	10,4



Tanggal	Pp1 (5)		Pp2 (6)		Pp3 (7)		Pp4 (8)		Pp5 (9)	
	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa
28/03/2013	Sisa Pakan Tidak Dihitung									
29/03/2013										
30/03/2013										
31/03/2013										
01/04/2013										
02/04/2013										
03/04/2013	17	12,2	17	12,71	17	8,44	17	11,75	17	14,33
04/04/2013	17	11,18	17	11,35	17	12,7	17	4,79	17	17
05/04/2013	17	15,43	17	11,31	17	9,09	17	10,48	17	8,16
06/04/2013	17	10,3	17	12,53	17	10,78	17	5,14	17	6,91
07/04/2013	17	7,11	17	9,96	17	8,9	17	4,46	17	7,28
08/04/2013	19,5	6,04	19,5	4,24	19,5	5,22	19,5	2,28	19,5	7,66
09/04/2013	19,4	7,38	19,4	7,4	19,4	5,46	19,4	6,22	19,4	10,13
10/04/2013	19,5	2,43	19,5	4,47	19,5	6,01	19,5	7,4	19,5	5,59
11/04/2013	19,5	4,9	19,5	7,96	19,5	6,43	19,5	1,39	19,5	7,94
12/04/2013	19,5	7,8	19,5	8,83	19,5	11,01	19,5	4,08	19,5	8,43
13/04/2013	21	2,99	21	2,36	21	8,03	21	6,49	21	9,14
14/04/2013	17	1,09	17	9,25	17	4,09	17	4,17	17	5,41
15/04/2013	19,5	1,19	19,5	5,87	19,5	5,87	19,5	6,81	19,5	10,66
16/04/2013	19,5	1,66	19,5	10,5	19,5	7,97	19,5	6,92	19,5	7,19
17/04/2013	19,5	0,24	19,5	2,81	19,5	0	19,5	1,23	19,5	6,74
18/04/2013	19,5	3,77	19,5	8,57	19,5	7,54	19,5	2,91	19,5	8,8
19/04/2013	19,5	10,44	19,5	11,38	19,5	11,2	19,5	7,86	19,5	9,4
20/04/2013	19,5	0,18	19,5	2,38	19,5	0	19,5	0	19,5	4,11
21/04/2013	19,5	4,95	19,5	9,01	19,5	3,87	19,5	0	19,5	6,89
22/04/2013	19,5	1,2	19,5	5,33	19,5	4,39	19,5	2,58	19,5	7,66
23/04/2013	19,5	6,91	19,5	8,47	19,5	8,09	19,5	6,68	19,5	9,6
24/04/2013	19,5	0,54	19,5	6,18	19,5	4,69	19,5	2,46	19,5	6,85
25/04/2013	19,5	1,67	19,5	8,72	19,5	7,44	19,5	8,44	19,5	10,96
26/04/2013	19,5	4,59	19,5	7,34	19,5	5,23	19,5	4,26	19,5	7,03
27/04/2013	19,5	1,72	19,5	5,1	19,5	5,23	19,5	4,99	19,5	7,76
28/04/2013	19,5	0	19,5	8,22	19,5	5,85	19,5	3,27	19,5	8,16
29/04/2013	19,5	3,64	19,5	5,41	19,5	1,61	19,5	13	19,5	7,4
30/04/2013	19,5	4,5	19,5	9,93	19,5	12,13	19,5	9,82	19,5	9,82
01/05/2013	19,5	2,09	19,5	10,31	19,5	10,22	19,5	5,63	19,5	9,67
02/05/2013	22	8,75	22	9,22	22	8,85	22	6,3	22	10,4



Tanggal	P1-1 (10)		P1-2 (11)		P1-3		P1-4 (12)		P1-5 (13)	
	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa
28/03/2013	Sisa Pakan Tidak Dihitung									
29/03/2013										
30/03/2013										
31/03/2013										
01/04/2013										
02/04/2013										
03/04/2013	17	14,19	17	13,57	RIP	RIP	17	11,75	17	15
04/04/2013	17	2,66	17	10,66	RIP	RIP	17	8,33	17	14,93
05/04/2013	17	5,57	17	10,23	RIP	RIP	17	8,56	17	8,85
06/04/2013	17	7,43	17	8,67	RIP	RIP	17	10,53	17	2,17
07/04/2013	17	2,6	17	9,09	RIP	RIP	17	3,03	17	1,98
08/04/2013	19,5	1,63	19,5	10,33	RIP	RIP	19,5	4,89	19,5	0,42
09/04/2013	19,4	0,23	19,4	6,14	RIP	RIP	19,4	4,17	19,4	0,13
10/04/2013	19,5	0	19,5	6,28	RIP	RIP	19,5	2,76	19,5	0
11/04/2013	19,5	1,05	19,5	6,83	RIP	RIP	19,5	1,6	19,5	0
12/04/2013	19,5	5	19,5	11,81	RIP	RIP	19,5	2,33	19,5	0,83
13/04/2013	21	2,8	21	8,06	RIP	RIP	21	0	21	0
14/04/2013	17	3,66	17	2,83	RIP	RIP	17	0	17	0
15/04/2013	19,5	4,92	19,5	8,16	RIP	RIP	19,5	0	19,5	2,33
16/04/2013	19,5	3,8	19,5	8,63	RIP	RIP	19,5	0	19,5	1,46
17/04/2013	19,5	0,24	19,5	2,81	RIP	RIP	19,5	0	19,5	0,5
18/04/2013	19,5	3,77	19,5	9,69	RIP	RIP	19,5	0,71	19,5	7,91
19/04/2013	19,5	5,51	19,5	4,25	RIP	RIP	19,5	0	19,5	6,49
20/04/2013	19,5	2,74	19,5	0	RIP	RIP	19,5	1,03	19,5	1,44
21/04/2013	19,5	1,25	19,5	2,82	RIP	RIP	19,5	0	19,5	5,52
22/04/2013	19,5	1,5	19,5	5,23	RIP	RIP	19,5	0	19,5	0,48
23/04/2013	19,5	6,54	19,5	8,31	RIP	RIP	19,5	0	19,5	4,47
24/04/2013	19,5	3,38	19,5	4,24	RIP	RIP	19,5	0	19,5	1,8
25/04/2013	19,5	5,04	19,5	10,58	RIP	RIP	19,5	0,64	19,5	0
26/04/2013	19,5	0,35	19,5	3,18	RIP	RIP	19,5	0	19,5	1,81
27/04/2013	19,5	2,57	19,5	8,45	RIP	RIP	19,5	0,14	19,5	1,74
28/04/2013	19,5	0	19,5	8,22	RIP	RIP	19,5	0,25	19,5	0,45
29/04/2013	19,5	4,82	19,5	4,72	RIP	RIP	19,5	6,9	19,5	2,3
30/04/2013	19,5	2,33	19,5	10,31	RIP	RIP	19,5	1,15	19,5	3,06
01/05/2013	19,5	2,17	19,5	7,18	RIP	RIP	19,5	10,44	19,5	6,01
02/05/2013	22	2,75	22	10,56	RIP	RIP	22	0,87	22	7,72

Tanggal	P2-1		P2-2		P2-3 (14)		P2-4		P2-5 (15)	
	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa
28/03/2013	Sisa Pakan Tidak Dihitung									
29/03/2013										
30/03/2013										
31/03/2013										
01/04/2013										
02/04/2013										
03/04/2013	17	8,94	RIP	RIP	17	16,86	17	10,61	17	17,19
04/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	17	10,54	17	6,52	17	14,93
05/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	17	13,65	17	5,98	17	16,54
06/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	17	10,37	17	6,73	17	12,51
07/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	17	9	17	3,48	17	11,39
08/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	8,58	19,5	7,42	19,5	7,5
09/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,4	9,9	19,4	5,61	19,4	12,98
10/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	6,1	19,5	5,1	19,5	6,01
11/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	2,2	RIP	RIP	19,5	7,72
12/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	14,99	RIP	RIP	19,5	15,11
13/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	21	9,98	RIP	RIP	21	6,9
14/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	17	2,73	RIP	RIP	17	7,45
15/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	0	RIP	RIP	19,5	6,9
16/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	15,03	RIP	RIP	19,5	11,41
17/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	5,15	RIP	RIP	19,5	3,59
18/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	8,39	RIP	RIP	19,5	7,91
19/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	9,4	RIP	RIP	19,5	9,43
20/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	1,03	RIP	RIP	19,5	0
21/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	2,04	RIP	RIP	19,5	6,4
22/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	0	RIP	RIP	19,5	4,35
23/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	0	RIP	RIP	19,5	4,47
24/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	0	RIP	RIP	19,5	6,32
25/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	6,98	RIP	RIP	19,5	7,77
26/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	7,25	RIP	RIP	19,5	7,82
27/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	4,68	RIP	RIP	19,5	7,08
28/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	5,76	RIP	RIP	19,5	7,32
29/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	0	RIP	RIP	19,5	8,1
30/04/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	9,89	RIP	RIP	19,5	9,39
01/05/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	10,28	RIP	RIP	19,5	9,78
02/05/2013	RIP	RIP	RIP	RIP	22	0	RIP	RIP	22	8,42

Tanggal	P3-1 (16)		P3-2		P3-3		P3-4 (17)		P3-5	
	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Akhir
28/03/2013	Sisa Pakan Tidak Dihitung									
29/03/2013										
30/03/2013										
31/03/2013										
01/04/2013										
02/04/2013										
03/04/2013	17	17,43	17	8,14	17	15,36	17	10,25	17	11,78
04/04/2013	17	12,29	17	7,74	17	8,13	17	10,88	17	14,43
05/04/2013	17	9,24	17	7,51	17	11,26	17	0	17	13,83
06/04/2013	17	4,35	17	5,39	17	16,97	17	10,58	17	14,66
07/04/2013	17	10,91	17	9,48	RIP	RIP	8,78	17	17	9,24
08/04/2013	19,5	13,05	19,5	6,32	RIP	RIP	19,5	4,2	19,5	12,55
09/04/2013	19,4	12,08	19,4	5,24	RIP	RIP	19,4	7,65	19,4	12,98
10/04/2013	19,5	6,78	19,5	3,46	RIP	RIP	19,5	5,16	19,5	7,04
11/04/2013	19,5	7,85	19,5	1,29	RIP	RIP	19,5	6,31	19,5	8,17
12/04/2013	19,5	10,62	19,5	4,92	RIP	RIP	19,5	8,08	19,5	10,85
13/04/2013	21	9,08	21	1,21	RIP	RIP	21	9,74	21	7,69
14/04/2013	17	6,27	17	2,54	RIP	RIP	17	4,3	17	6,4
15/04/2013	19,5	0	19,5	4,3	RIP	RIP	19,5	5,77	19,5	8,86
16/04/2013	19,5	12,82	19,5	5,86	RIP	RIP	19,5	8,53	19,5	6,63
17/04/2013	19,5	4,29	19,5	1,09	RIP	RIP	19,5	2,73	19,5	13,43
18/04/2013	19,5	8,63	19,5	9,67	RIP	RIP	19,5	6,18	RIP	RIP
19/04/2013	19,5	7,76	19,5	2,29	RIP	RIP	19,5	6,12	RIP	RIP
20/04/2013	19,5	1,34	19,5	0,95	0	0	19,5	0,72	RIP	RIP
21/04/2013	19,5	3,1	19,5	0	19,5	0	19,5	0	RIP	RIP
22/04/2013	19,5	1,13	19,5	4,11	19,5	0	19,5	4,42	RIP	RIP
23/04/2013	19,5	7,42	19,5	8,11	19,5	2,13	19,5	4,96	RIP	RIP
24/04/2013	19,5	6,15	19,5	5,37	19,5	1,76	19,5	5,2	RIP	RIP
25/04/2013	19,5	10,06	19,5	12,67	19,5	4,6	19,5	8,99	RIP	RIP
26/04/2013	19,5	5,08	19,5	13,42	19,5	4,73	19,5	5,63	RIP	RIP
27/04/2013	19,5	16,83	19,5	18,24	RIP	RIP	19,5	3,46	RIP	RIP
28/04/2013	19,5	11,99	19,5	17,84	RIP	RIP	19,5	5,41	RIP	RIP
29/04/2013	19,5	6,06	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	4,71	RIP	RIP
30/04/2013	19,5	12,62	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	4,42	RIP	RIP
01/05/2013	19,5	13,92	RIP	RIP	RIP	RIP	19,5	6,58	RIP	RIP
02/05/2013	22	12,09	RIP	RIP	RIP	RIP	22	5,33	RIP	RIP

Sisa Pakan Tikus Treatment

Tanggal	1		2		3		4		5	
	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa
03/05/2013	22	5,86	22	2,51	22	8,5	22	8,69	22	7,6
04/05/2013	24,5	6,79	24,5	2,51	24,5	8,71	24,5	13,68	24,5	7,07
05/05/2013	25	9,29	25	9,72	25	11,79	25	29,58	25	14,09
06/05/2013	24	8,02	24	4,84	24	12,79	24	13,81	24	7,22
07/05/2013	24	12,16	24	0,63	24	3,7	24	18,63	24	5,4
08/05/2013	21,5	7,68	21,5	5,94	21,5	5,49	21,5	12,99	21,5	5,25
09/05/2013	21,5	10,42	21,5	4,42	21,5	12,15	21,5	15,39	21,5	11,06
10/05/2013	21,5	6,79	21,5	7,85	21,5	5,88	21,5	12,4	21,5	11,7
11/05/2013	21,5	9,39	21,5	6,97	21,5	10,49	21,5	12,77	21,5	8,15
12/05/2013	22	6,17	22	3,92	22	7,76	22	12,29	22	5,52
13/05/2013	21,5	8,71	21,5	6,42	21,5	5,69	21,5	12,52	21,5	5,16
14/05/2013	21,5	8,48	21,5	5,1	21,5	7,21	21,5	12,7	21,5	4,59
15/05/2013	21,5	6,58	21,5	5,2	21,5	0	21,5	10,96	21,5	6,18
16/05/2013	21,5	8,24	21,5	4,86	21,5	14,39	21,5	12,91	21,5	5,44
17/05/2013	21,4	6,84	21,4	6,66	21,4	6,68	21,4	9,9	21,4	5,86
18/05/2013	21,5	7,94	21,5	4,91	21,5	5,13	21,5	13,31	21,5	3,46
19/05/2013	22	3,04	22	4,94	22	4,79	22	11,57	22	4,23
20/05/2013	21,5	0	21,5	9,69	21,5	10,94	21,5	12,7	21,5	1,92
21/05/2013	21,5	13,74	21,5	10,68	21,5	9,55	21,5	11,92	21,5	8,86
22/05/2013	22,32	14,49	22,32	10,53	22,32	5,33	22,32	11,85	22,32	0,39
23/05/2013	21,5	1,94	21,5	5,23	21,5	2,13	21,5	10,48	21,5	1,46
24/05/2013	22	3,41	22	2,77	22	0	22	6,07	22	0,98
25/05/2013	21,5	1,85	21,5	2,28	21,5	0	21,5	8,24	21,5	0
26/05/2013	21,5	0	21,5	4,5	21,5	0	21,5	10,96	21,5	0
27/05/2013	21,5	5,31	21,5	2,89	21,5	6,16	21,5	10,45	21,5	5,67
28/05/2013	22	6,35	22	6,58	22	6,69	22	11,5	22	4,53
29/05/2013	22	1,87	22	1,25	22	0	22	4,68	22	4,33
30/05/2013	22	3,42	22	2,42	22	0	22	9,77	22	0,78
31/05/2013	22,4	2,7	22,4	0	22,4	1,04	22,4	6,92	22,4	1,22



Tanggal	6		7		8		9		10	
	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa
03/05/2013	22	8,49	22	4,64	22	7,78	22	7,09	22	7,95
04/05/2013	24,5	10,33	24,5	10,08	24,5	16,73	24,5	12,09	24,5	4,77
05/05/2013	25	13,33	25	9,55	25	11,45	25	12,78	25	8,65
06/05/2013	24	12,35	24	8,01	24	9,69	24	10,05	24	9,51
07/05/2013	24	3,59	24	3,41	24	6,57	24	9,01	24	2,38
08/05/2013	21,5	11,42	21,5	5,23	21,5	11,06	21,5	8,42	21,5	2,01
09/05/2013	21,5	11,03	21,5	9,38	21,5	8,9	21,5	5,19	21,5	10,56
10/05/2013	21,5	8,92	21,5	7,33	21,5	8,83	21,5	9,63	21,5	10,08
11/05/2013	21,5	6,78	21,5	8,18	21,5	7,13	21,5	9,05	21,5	6,63
12/05/2013	22	10,37	22	10,57	22	10,57	22	10,13	22	7,95
13/05/2013	21,5	8,07	21,5	7,71	21,5	16,42	21,5	9,16	21,5	7,95
14/05/2013	21,5	8,47	21,5	8,26	21,5	13,3	21,5	7,79	21,5	0,49
15/05/2013	21,5	8,19	21,5	5,73	21,5	17,05	21,5	7,62	21,5	2,58
16/05/2013	21,5	7,54	21,5	7,73	21,5	20,3	21,5	9,86	21,5	4,08
17/05/2013	21,4	8,16	21,4	8,71	21,4	21,59	21,4	6,99	21,4	2,66
18/05/2013	21,5	8,46	21,5	9,18	21,5	21,5	21,5	9,12	21,5	16,95
19/05/2013	22	4,82	22	5,16	22	22	22	8,25	22	12,88
20/05/2013	21,5	0	21,5	16,7	RIP	RIP	21,5	8,83	21,5	18,72
21/05/2013	21,5	4,47	21,5	0	RIP	RIP	21,5	5,68	21,5	11,58
22/05/2013	22,32	10,4	22,32	7,99	RIP	RIP	22,32	6,05	22,32	7,62
23/05/2013	21,5	1,69	21,5	5,11	RIP	RIP	21,5	3,85	21,5	1,52
24/05/2013	22	5,83	22	0,01	RIP	RIP	22	0	22	2,4
25/05/2013	21,5	0	21,5	1,88	RIP	RIP	21,5	0	21,5	3,55
26/05/2013	21,5	5,79	21,5	4,49	RIP	RIP	21,5	4,26	21,5	3,95
27/05/2013	21,5	10,56	21,5	7,59	RIP	RIP	21,5	4,56	21,5	3,09
28/05/2013	22	7,86	22	8,3	RIP	RIP	22	0	22	4,11
29/05/2013	22	8,77	22	0	RIP	RIP	22	9,22	22	0
30/05/2013	22	0	22	3,15	RIP	RIP	22	4,98	22	0
31/05/2013	22,4	0	22,4	4,34	RIP	RIP	22,4	5,23	22,4	0

Tanggal	11		12		13		14		15	
	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa	Awal	Sisa
03/05/2013	22	5,36	22	6,33	22	6,03	22	7,36	22	5,92
04/05/2013	24,5	7,19	24,5	2,28	24,5	3,62	24,5	10,37	24,5	13,95
05/05/2013	25	13,78	25	1,23	25	4,97	25	15,84	25	11,28
06/05/2013	24	10,84	24	0,47	24	3,9	24	13,02	24	12,8
07/05/2013	24	10,2	24	0	24	2,88	24	10,83	24	8,86
08/05/2013	21,5	12,63	21,5	0	21,5	1,14	21,5	11,86	21,5	10,98
09/05/2013	21,5	6,66	21,5	3,95	21,5	8,51	21,5	12,4	21,5	11,58
10/05/2013	21,5	13	21,5	1,4	21,5	3,77	21,5	10,57	21,5	10,89
11/05/2013	21,5	12,42	21,5	3,16	21,5	8,47	21,5	11,06	21,5	10,25
12/05/2013	22	10,25	22	3,51	22	12,81	22	8,13	22	11,45
13/05/2013	21,5	10,25	21,5	3,51	21,5	12,81	21,5	8,13	21,5	11,45
14/05/2013	21,5	10,3	21,5	0,34	21,5	4,49	21,5	6,91	21,5	10,3
15/05/2013	21,5	11,05	21,5	0	21,5	1,83	21,5	5,27	21,5	12,05
16/05/2013	21,5	5,98	21,5	0	21,5	7,19	21,5	6,77	21,5	11,72
17/05/2013	21,4	7,22	21,4	0	21,4	0,48	21,4	8,22	21,4	11,47
18/05/2013	21,5	9,9	21,5	0	21,5	0	21,5	7,12	21,5	9,16
19/05/2013	22	1,34	22	0	22	0,53	22	5,95	22	7,47
20/05/2013	21,5	4,09	21,5	0	21,5	0	21,5	5,74	21,5	11,1
21/05/2013	21,5	6,46	21,5	0	21,5	8,08	21,5	7,32	21,5	6,88
22/05/2013	22,32	6,59	22,32	0	22,32	4,53	22,32	2,69	22,32	0,05
23/05/2013	21,5	6,9	21,5	0	21,5	4,29	21,5	0,6	21,5	0
24/05/2013	22	10,39	22	0	22	3,93	22	2,4	22	0
25/05/2013	21,5	1,54	21,5	0	21,5	10,06	21,5	1,41	21,5	0
26/05/2013	21,5	6,08	21,5	0	21,5	4,83	21,5	0	21,5	7,76
27/05/2013	21,5	3,17	21,5	0	21,5	5,15	21,5	1,23	21,5	3,88
28/05/2013	22	7,7	22	0	22	4,54	22	0	22	8,61
29/05/2013	22	3,3	22	0	22	4,25	22	0	22	0
30/05/2013	22	0,59	22	0	22	6,16	22	0	22	0
31/05/2013	22,4	1,96	22,4	0	22,4	6,84	22,4	0	22,4	0

Tanggal	16		17	
	Awal	Sisa	Awal	Sisa
03/05/2013	22	8,97	22	3,24
04/05/2013	24,5	14,2	24,5	8,34
05/05/2013	25	17,24	25	9,49
06/05/2013	24	10,85	24	6,49
07/05/2013	24	11,6	24	6,4
08/05/2013	21,5	10,34	21,5	7,39
09/05/2013	21,5	13,61	21,5	11
10/05/2013	21,5	11,56	21,5	9,34
11/05/2013	21,5	9,62	21,5	8,43
12/05/2013	22	13,55	22	7,56
13/05/2013	21,5	13,55	21,5	7,56
14/05/2013	21,5	8,36	21,5	8,28
15/05/2013	21,5	12,52	21,5	5,36
16/05/2013	21,5	12,07	21,5	7,98
17/05/2013	21,4	8,83	21,4	7,22
18/05/2013	21,5	8,74	21,5	8,1
19/05/2013	22	11,71	22	7,03
20/05/2013	21,5	10,53	21,5	3,67
21/05/2013	21,5	12,15	21,5	9,35
22/05/2013	22,32	8,02	22,32	8,61
23/05/2013	21,5	7,62	21,5	4,41
24/05/2013	22	0	22	3,35
25/05/2013	21,5	3,57	21,5	9,6
26/05/2013	21,5	0	21,5	0
27/05/2013	21,5	12,03	21,5	4,15
28/05/2013	22	10,94	22	4,95
29/05/2013	22	0	22	6,3
30/05/2013	22	0	22	2,18
31/05/2013	22,4	5,21	22,4	4,22

Keterangan:

Tikus yang awalnya telah mati, kemudian terdapat sisa pakan kembali artinya telah dimasukkan tikus baru untuk menggantikan tikus yang telah mati.

Lampiran 7

Berat Badan Tikus dan Perhitungan Dosis

Perlakuan	Nomor	27/04/2013	Dosis per hari (mg)	05/05/2013	Dosis per hari (mg)	12/05/2013	Dosis per hari (mg)
Kontrol Negatif	1	205,59	0	212,66	0	218,81	0
(Aquadest)	2	222,49	0	245,86	0	255,24	0
	3	182,01	0	187,8	0	190,66	0
Kontrol Positif	4	146,81	1,982	147,32	1,989	148,42	2,004
(Metformin 0,0135 mg/gBB)	5	180,87	2,442	183,18	2,473	185,9	2,510
	6	179,23	2,420	179,2	2,419	183,9	2,483
Perlakuan 1	7	173,13	4,155	180,58	4,334	187,4	4,498
(Ekstrak 24 mg/kgBB)	8	209,93	5,038	201,11	4,827	210,75	5,058
	9	157,62	3,783	160	3,840	156,64	3,759
	10	202,1	4,850	203,13	4,875	204,23	4,902
Perlakuan 2	11	188,07	9,027	192,78	9,253	193,55	9,290
(Ekstrak48 mg/kgBB)	12	193,46	9,286	192,43	9,237	199,68	9,585
	13	179,46	8,614	182,92	8,780	187,92	9,020
	14	221,23	10,619	207,44	9,957	210,03	10,081
Perlakuan 3	15	171,4	16,454	171	16,416	174,75	16,776
(Ekstrak 96 mg/kgBB)	16	148,53	14,259	148,21	14,228	150,79	14,476
	17	172,23	16,534	196,96	18,908	210,84	20,241

Berat Badan Tikus dan Perhitungan Dosis

Perlakuan	Nomor	19/05/2013	Dosis per hari (mg)	26/05/2013	Dosis per hari (mg)	02/06/2013	Dosis per hari (mg)
Kontrol Negatif	1	213,39	0	220,58	0	216,78	0
(Aquadest)	2	254,12	0	248,72	0	238,16	0
	3	188,42	0	199,78	0	192,13	0
Kontrol Positif	4	147,52	1,992	138,66	1,872	147,98	0,025
(Metformin 0,0135 mg/gBB)	5	185,04	2,498	193,65	2,614	192,7	0,035
	6	187,4	2,530	192,59	2,600	186,3	0,035
Perlakuan 1	7	191,87	4,605	200,24	4,806	191,7	4,601
(Ekstrak 24 mg/kgBB)	8	177,98	4,272	RIP	0,000	RIP	0,000
	9	168,47	4,043	171,7	4,121	171,02	4,104
	10	209,43	5,026	205,07	4,922	200,5	4,812
Perlakuan 2	11	193,91	9,308	202,04	9,698	200,86	9,641
(Ekstrak48 mg/kgBB)	12	201,33	9,664	212,05	10,178	208,21	9,994
	13	190,53	9,145	190,26	9,132	186,03	8,929
	14	214,39	10,291	221,45	10,630	219,74	10,548
Perlakuan 3	15	166,52	15,986	168,87	16,212	171,8	16,493
(Ekstrak 96 mg/kgBB)	16	157,34	15,105	160,92	15,448	148,5	14,256
	17	204,6	19,642	208,82	20,047	201,6	19,354

Lampiran 8

Perhitungan pengenceran pelarut

Membuat larutan etanol 80%

$$\begin{aligned} M1 \times V1 &= M2 \times V2 \\ 96\% \times V1 &= 80\% \times 2,1 \text{ L} \\ V1 &= 1,75 \text{ L} \end{aligned}$$

Bagan Kerja

Etanol 96% sebanyak 1,75 L (1750 ml)

Masukkan ke dalam erlenmeyer (erlenmeyer sudah ditara hingga 2,1 L

→ beri tanda batas)

Tambahkan aquadest hingga tanda batas

Etanol 80% sebanyak 2,1 L (2100 ml)

Perhitungan pengenceran pelarut

Membuat larutan etanol 50%

$$\begin{aligned} M1 \times V1 &= M2 \times V2 \\ 96\% \times V1 &= 50\% \times 2,16 \text{ L} \\ V1 &= 1,125 \text{ L} \end{aligned}$$

BAGAN KERJA

Etanol 96% sebanyak 547 ml

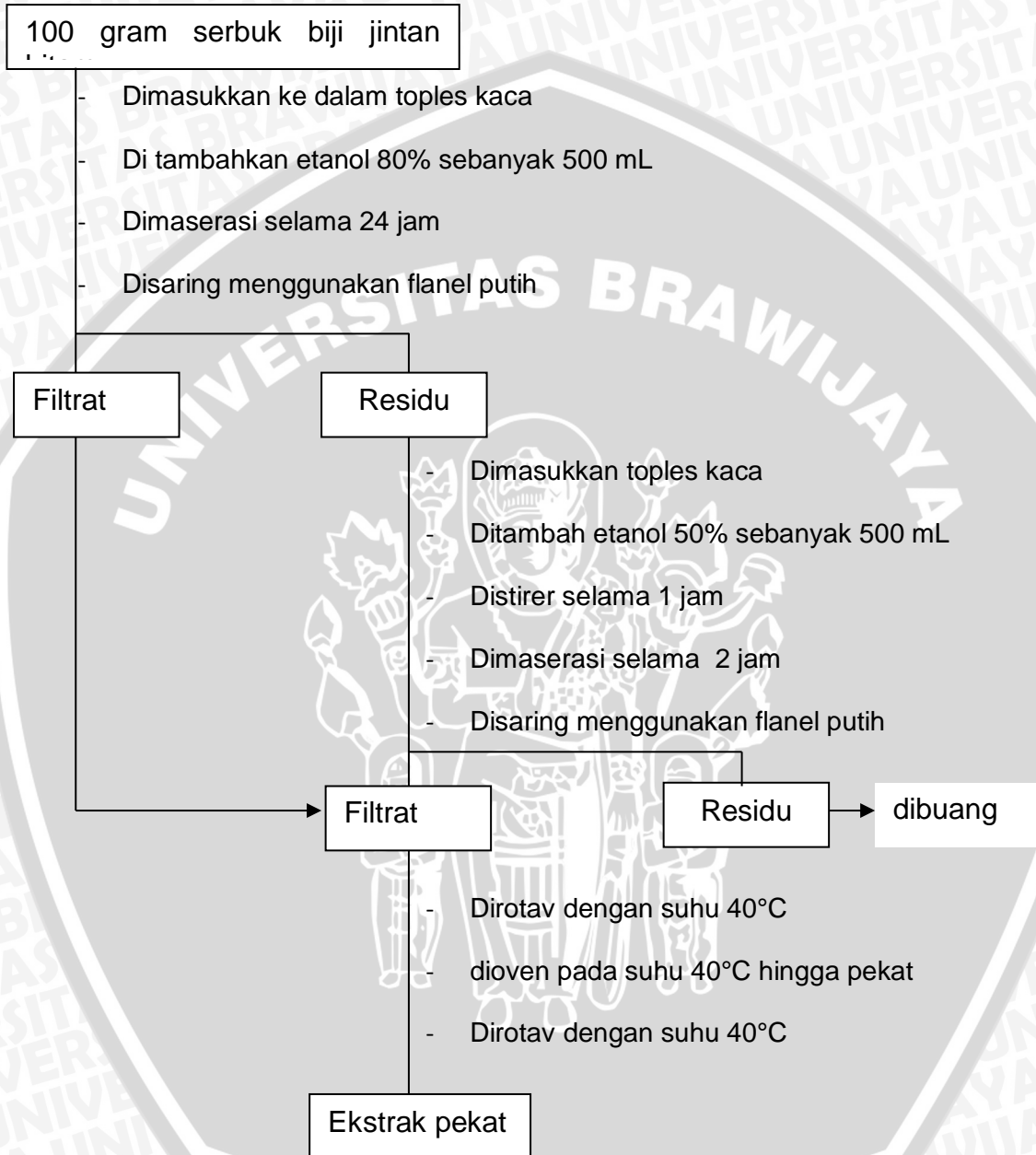
Masukkan ke dalam erlenmeyer (erlenmeyer sudah ditara hingga 1,05 L

→ beri tanda batas)

Tambahkan aquadest hingga tanda batas

Etanol 50% sebanyak 2,05 L (2050 ml)

Bagan Kerja Ekstraksi



Lampiran 9

Perhitungan Dosis Insulin

No	Berat Badan (gram)	Dosis Insulin (IU/kgBB tikus)	Dosis Insulin (IU/gBB tikus)	Dosis (IU/bb tikus)	Injeksi
1	216,78	10	0,01	2,168	2
2	238,16	10	0,01	2,382	2
3	192,13	10	0,01	1,921	2
4	147,98	10	0,01	1,480	1
5	192,7	10	0,01	1,927	2
6	186,3	10	0,01	1,863	2
7	191,7	10	0,01	1,917	2
8	171,02	10	0,01	1,710	2
9	200,5	10	0,01	2,005	2
10	200,86	10	0,01	2,009	2
11	208,21	10	0,01	2,082	2
12	186,03	10	0,01	1,860	2
13	219,74	10	0,01	2,197	2
14	171,8	10	0,01	1,718	2
15	148,5	10	0,01	1,485	1
16	201,6	10	0,01	2,016	2
17	120,08	10	0,01	1,201	1
18	173,5	10	0,01	1,735	2
19	155,3	10	0,01	1,553	2
20	177,63	10	0,01	1,776	2

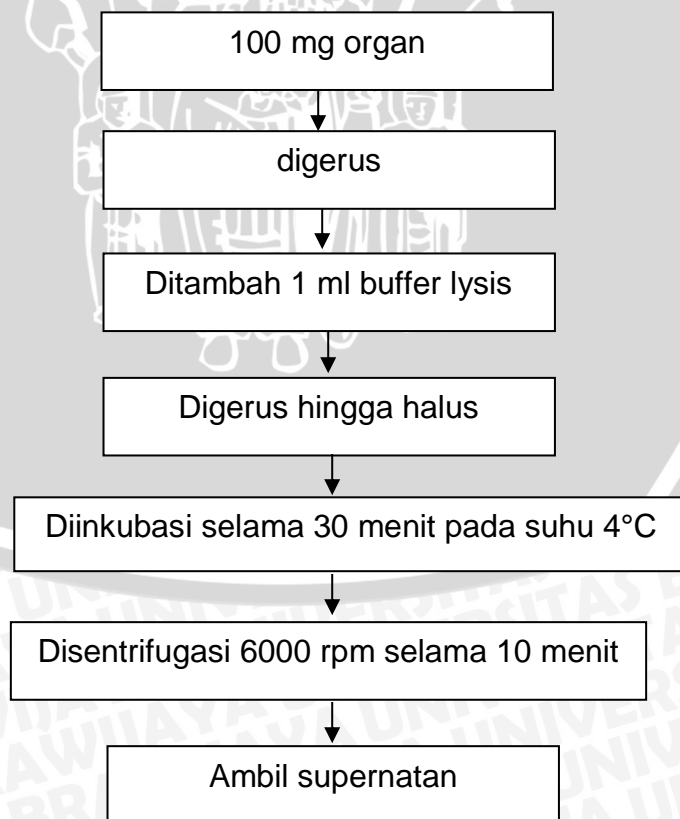
Lampiran 10

Prosedur Pembuatan Homogenasi

Resep Buffer Lysis PMSF

Tris base	0,1211	gram
EDTA	0,0074	gram
NaCl	0,8775	gram
PMSF	0,009	gram
NP 40	0,125	ml
Add dionized water	100	ml
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	50	µl

Prosedur Isolasi Protein



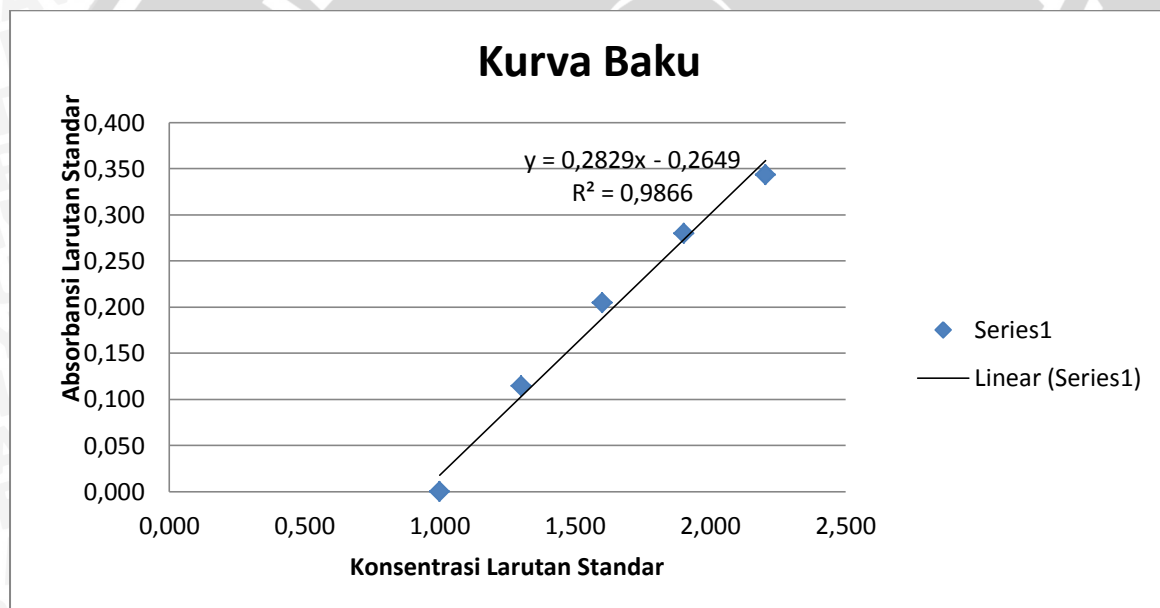
Lampiran 11

Perhitungan Hasil ELISA

Pembuatan Kurva Standar

	conc µg/ml	Abs1	Abs2	Abs rata2	conc µg/ml	Abs rata2	log conc	log abs
std1	2.5	0.092	0.098	0.095	2.5	0.095	0.398	-0.400
std2	5	0.062	0.082	0.072	5	0.072	0.699	-0.156
std3	10	0.026	0.031	0.029	10	0.029	1.000	0.000
std4	20	0.036	0.034	0.035	20	0.035	1.301	0.114
std5	40	0.029	0.028	0.029	40	0.029	1.602	0.205
std6	80	0.031	0.030	0.031	80	0.031	1.903	0.279
std7	160	0.030	0.029	0.030	160	0.030	2.204	0.343

Kurva Standar Log Absorbansi Vs Log Concentration



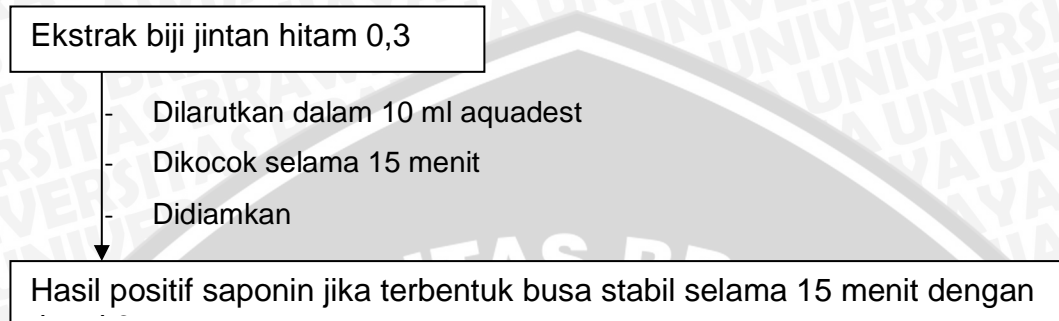
Perhitungan Konsentrasi Sampel

No	Abs	log Abs	log Conc	Conc	conc x FP	No	Abs	log Abs	log Conc	Conc	conc x FP	Kelompok	rata-rata absorbansi	rata2 concxcp
1	0.114	-0.943	-2.396	0.004	0.008	1	0.097	-1.013	-2.644	0.002	0.005	Pp	0.106	0.006
2	0.112	-0.951	-2.423	0.004	0.008	2	0.122	-0.914	-2.292	0.005	0.010		0.117	0.009
3	0.116	-0.936	-2.369	0.004	0.009	3	0.243	-0.614	-1.235	0.058	0.117		0.180	0.063
4	0.155	-0.810	-1.925	0.012	0.024	4	0.091	-1.041	-2.742	0.002	0.004	Pn	0.123	0.014
5	0.112	-0.951	-2.423	0.004	0.008	5	0.088	-1.056	-2.793	0.002	0.003		0.100	0.005
6	0.111	-0.955	-2.437	0.004	0.007	6	0.149	-0.827	-1.985	0.010	0.021		0.130	0.014
7	0.159	-0.799	-1.886	0.013	0.026	7	0.132	-0.879	-2.171	0.007	0.013	P1	0.146	0.020
8	0.176	-0.754	-1.730	0.019	0.037	8	0.189	-0.724	-1.620	0.024	0.048		0.183	0.043
9	0.169	-0.772	-1.792	0.016	0.032	9	0.16	-0.796	-1.876	0.013	0.027		0.165	0.029
10	0.223	-0.652	-1.366	0.043	0.086	10	0.114	-0.943	-2.396	0.004	0.008	P2	0.169	0.047
11	0.178	-0.750	-1.712	0.019	0.039	11	0.107	-0.971	-2.493	0.003	0.006		0.143	0.023
12	0.174	-0.759	-1.747	0.018	0.036	12	0.127	-0.896	-2.230	0.006	0.012		0.151	0.024
13	0.227	-0.644	-1.339	0.046	0.092	13	0.135	-0.870	-2.137	0.007	0.015	P3	0.181	0.053
14	0.126	-0.900	-2.243	0.006	0.011	14	0.18	-0.745	-1.695	0.020	0.040		0.153	0.026
15	0.142	-0.848	-2.059	0.009	0.017	15	0.223	-0.652	-1.366	0.043	0.086		0.183	0.052
16	0.161	-0.793	-1.866	0.014	0.027	16	0.283	-0.548	-1.001	0.100	0.200	P0	0.222	0.113
17	0.151	-0.821	-1.965	0.011	0.022	17	0.145	-0.839	-2.027	0.009	0.019		0.148	0.020
18	0.164	-0.785	-1.838	0.015	0.029	18	0.111	-0.955	-2.437	0.004	0.007		0.138	0.018
19	0.156	-0.807	-1.915	0.012	0.024	19	0.189	-0.724	-1.620	0.024	0.048	P0	0.173	0.036
20	0.217	-0.664	-1.408	0.039	0.078	20	0.218	-0.662	-1.401	0.040	0.079		0.218	0.079

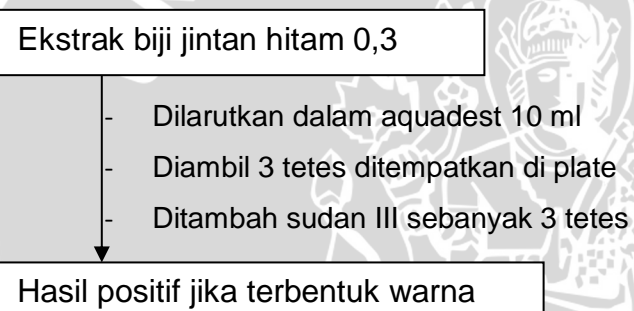
Lampiran 12

Prosedur Uji Fitokimia

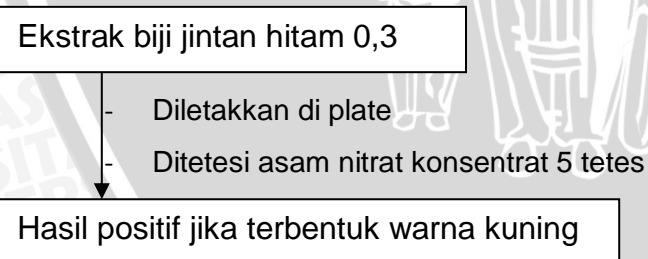
Uji Fitokimia Saponin



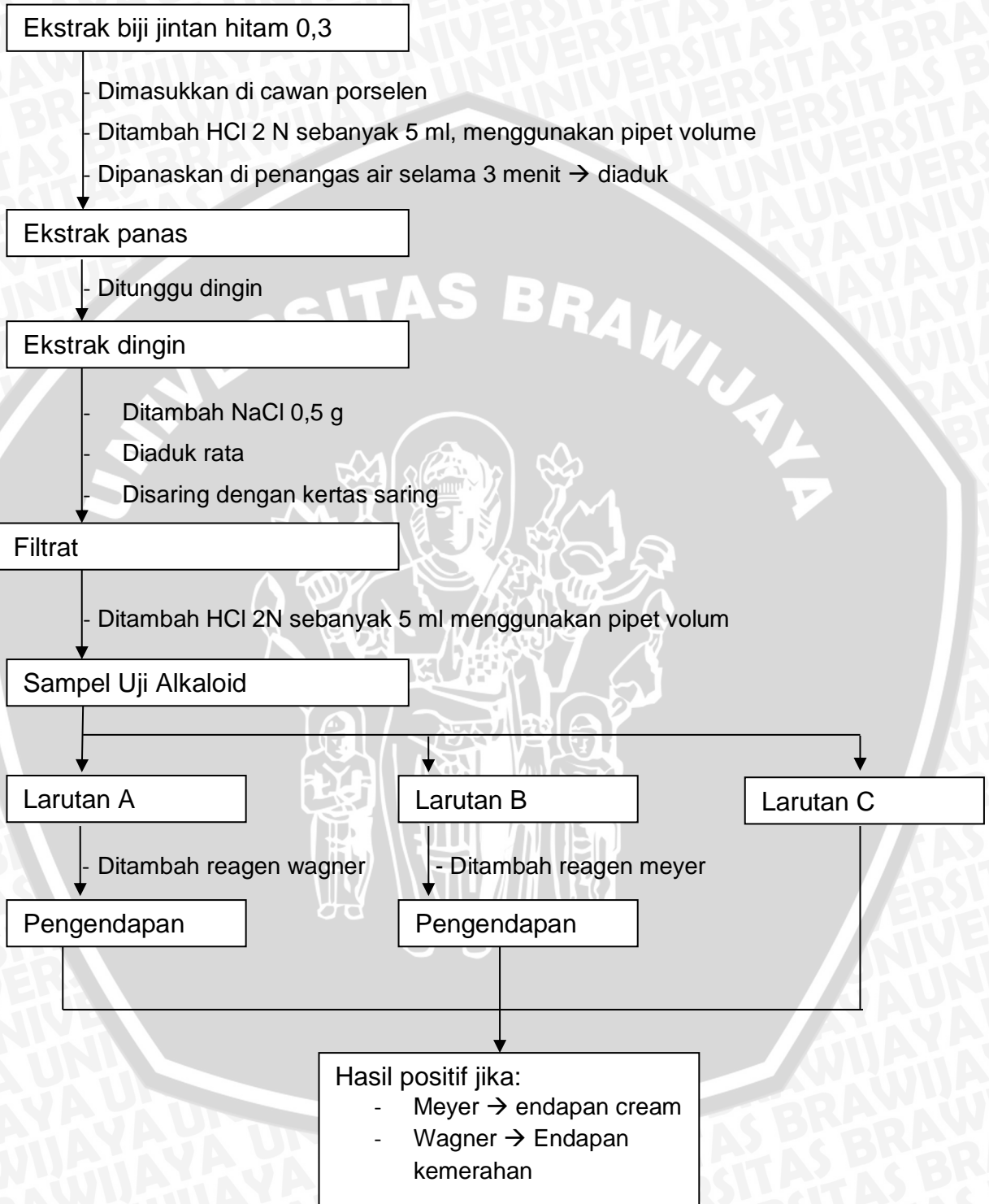
Uji Fitokimia Minyak Atsiri



Uji Fitokimia Protein

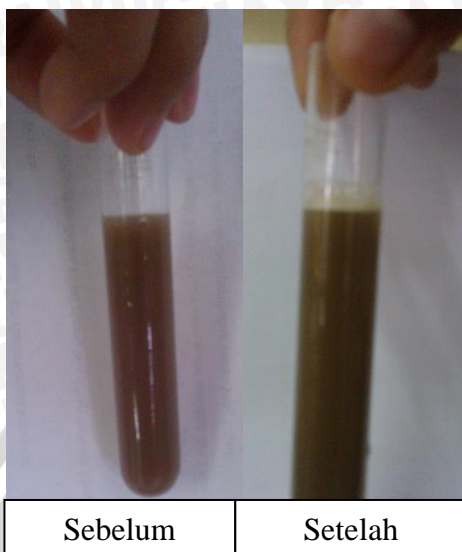


Uji Fitokimia Alkaloid

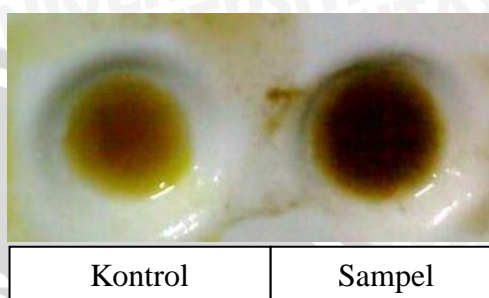


Hasil Uji Fitokimia

Uji Saponin



Uji Protein



Uji Alkaloid



Uji Minyak Atsiri

