

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Ekstraksi dan Uji Fitokimia

Ekstrak cair sebanyak 51,49 gram diperoleh dari 300 gram serbuk halus biji jintan hitam yang dimaserasi menggunakan 900 mL pelarut etanol 80%. Pelarut yang digunakan disesuaikan dengan kemampuannya menarik konstituen yang diinginkan dan keamanannya sehubungan dengan pemberiannya kepada makhluk hidup yaitu tikus. Hasil ekstrak yang diperoleh sesuai dengan literatur yang menjadi acuan ekstraksi yaitu penelitian yang dilakukan Andaloussi *et al.* (2011) yang menghasilkan ekstrak dengan dua fase yang tidak saling bercampur, fase minyak dan fase padatan dengan perbandingan 30% : 70%. Ekstrak tersebut berwarna coklat pekat kehitaman dan terbagi menjadi dua fase, bagian atas lebih tipis dan berwarna coklat bening sedangkan bagian bawah lebih tebal dengan warna coklat tua dan keruh namun tidak memenuhi perbandingan yang sama dengan literatur karena lapisan minyak tipis dan tidak mencapai 30% dari total ekstrak.

Dari hasil uji fitokimia, ekstrak etanol biji jintan hitam positif mengandung minyak atsiri, alkaloid, dan saponin. Hal ini sesuai dengan pemaparan Gali-Muhtasib *et al.* (2006) bahwa biji jintan hitam memang memiliki kandungan minyak atsiri, alkaloid (seperti *nigellidine*, *nigellimine*, dan *nigellicine*), dan saponin yang menunjukkan bahwa ekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 80% dapat menarik konstituen-konstituen yang ada dalam biji jintan hitam terutama minyak atsiri. Selain itu, uji fitokimia membantu

pemastian bahwa serbuk yang diekstraksi merupakan biji jintan hitam sesuai studi hasil uji terhadap literatur. Uji kualitatif menggunakan reagen atau perlakuan sederhana seperti ini seharusnya tidak dijadikan dasar satu-satunya namun karena tidak tersedianya standar TQ maka tidak dapat dilakukan uji kualitatif lain menggunakan TLC. Uji kualitatif dan kuantitatif menggunakan GC-MS merupakan pilihan paling tepat untuk minyak atsiri yang mudah menguap namun tidak dapat dilakukan karena ekstraksi dilakukan menggunakan etanol, bukan n-heksan seperti ketentuan pada alat.

Kandungan *fixed oil* adalah 30% sedangkan minyak menguap sebesar 0,5-1,5%. Sementara itu, komposisi minyak menguap mengandung 54% TQ (Gali-Muhtasib *et al.*, 2006). Jika dihitung, perkiraan rentang minyak atsiri dalam ekstrak adalah 0,26-7,72 gram dengan kadar TQ dalam ekstrak sebesar 0,14-4,17 gram.

6.2 Berat Badan Tikus

Sebelum memulai perlakuan, prosedur-prosedur yang dilakukan sudah memperoleh keterangan kelaikan etik yang dikeluarkan oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan nomor 198/EC/KEPK-S1-FARM/03/2014. Pada penelitian ini, BB tikus meningkat selama pemberian pakan tinggi kalori. Menurut penelitian Uemura dan Norika tahun 2006, usia tikus di atas 10 bulan yang digunakan sebagai subyek penelitian menunjukkan peningkatan berat badan yang signifikan dengan pemberian pakan tinggi kalori (50% komposisi berasal dari minyak babi). Sementara itu, tikus dengan usia di bawah 10 bulan yaitu sekitar tiga bulan tidak menunjukkan peningkatan berat badan yang signifikan. Hasil tersebut didukung

juga oleh penelitian Wang *et al.* tahun 2007 yang menggunakan tikus berusia 3 bulan dengan lama induksi satu bulan tanpa peningkatan BB yang signifikan.

Peningkatan berat badan tikus mungkin disebabkan oleh deposisi lemak jenuh yang berasal dari lemak babi pada jaringan adiposa. Penambahan glukosa pada pakan juga memungkinkan ambilan glukosa ke dalam organ-organ penyimpanan meningkat. Peningkatan BB selama induksi pakan berbanding terbalik dengan penurunannya setelah injeksi STZ dan pada akhir terapi yaitu minggu ke-12. Penurunan BB pada tikus DM karena proses katabolisme glikogen, lemak, dan protein justru meningkat akibat glukosa tidak dapat masuk ke dalam otot untuk dimetabolisme menghasilkan energi. Terkait pakan tinggi kalori sebagai induksi DM, tingginya kadar TG dalam darah memungkinkan peningkatan oksidasi asam lemak sehingga mengganggu kerja insulin pada reseptornya (Srinivasan *et al.*, 2005).

6.3 Korelasi Pakan Tinggi Kalori dan STZ Terhadap GDP

GDP tikus sebelum memperoleh injeksi tunggal STZ dan rutin diberikan pakan tinggi kalori selama 2 bulan tidak menunjukkan tercapainya kondisi DM. Rerata GDP tikus pada percobaan ini hanya berkisar antara 80-92 mg/dL, masih di dalam rentang normal. Sementara itu, Rentang normal glukosa darah tikus adalah 52-105 mg/dL (Qamar *et al.*, 2011). Hanya beberapa tikus yang sempat mengalami kenaikan glukosa darah sedikit di atas batas normal namun kembali memasuki rentang normal pada pengukuran berikutnya.

Dari penjelasan tersebut, bukan berarti kondisi ini menunjukkan bahwa induksi pakan tidak berhasil karena tujuan dari pemberian pakan tinggi kalori adalah untuk menciptakan suatu resistensi insulin. Menurut Wang *et al.* (2007),

jurnal yang dijadikan rujukan induksi pada penelitian ini, induksi pakan tinggi kalori dengan menambahkan 20% lemak babi dan 10% sukrosa pada pakan standar (total 132,6 kkal/hari) selama satu bulan tidak dapat menimbulkan perubahan yang signifikan terhadap GDP tikus namun secara genetik mampu menginduksi perubahan ekspresi gen yang berhubungan erat dengan metabolisme jaringan. Namun, pada penelitian ini pengujian genetik tersebut tidak dapat dilakukan karena tikus diperlukan dalam kondisi hidup hingga selesai waktu terapi. Penelitian Uemura and Norika (2006) menunjukkan bahwa pemberian pakan tinggi kalori selama lima minggu yang separuh komposisinya merupakan lemak babi menunjukkan adanya peningkatan kadar insulin dan perburukan sensitivitas reseptor yang diukur menggunakan tes supresi insulin namun tidak ada peningkatan yang berarti pada glukosa darahnya.

Dari segi usia, tikus lebih dari 10 bulan lebih mudah mengalami resistensi insulin (Uemura and Norika, 2006). Pada manusia, Karakelides *et al.* (2010) melakukan penelitian mengenai pengaruh usia terhadap resistensi insulin. Dia menyimpulkan bahwa resistensi insulin yang meningkat seiring peningkatan usia lebih disebabkan karena peningkatan jaringan adiposa dibanding oleh usia tersebut sendiri.

Belum ditemukan data tentang adanya induksi pakan tunggal dalam jangka waktu singkat yang berhasil menginduksi DM pada tikus. Pada tahap awal tubuh memiliki kemampuan untuk memodulasi kelainan yang timbul untuk kembali mencapai kesetimbangan. Hal ini kemungkinan yang membuat indikator biokimia seperti GDP tidak menunjukkan adanya abnormalitas pada induksi pakan bahkan sampai dua bulan. Selain itu, rerata persentase pakan yang

dikonsumsi hanya berkisar antara 64-68% (85-90 kkal) per hari selama dua bulan karena tidak memungkinkan untuk membuat pakan habis dimakan setiap hari.

Standar deviasi pada rerata GDP cukup besar yang disebabkan oleh kadar glukosa yang dimiliki beberapa tikus terlalu tinggi dari nilai GDP tikus yang lain ketika diukur. Terdapat kemungkinan peningkatan tersebut disebabkan oleh sebab-sebab di luar variabel terikat, dibuktikan oleh hasil pengukuran berikutnya yang normal kembali. Hal ini dapat disebabkan beberapa faktor yang mempengaruhi kadar glukosa darah tikus seperti stres akibat tindakan rutin yaitu pembersihan kandang, penimbangan BB, injeksi, pengambilan darah, adanya manusia, atau pun pemberian terapi menggunakan sonde lambung. Stres dapat memicu tubuh untuk melepaskan glukosa ke dalam darah (Balcombe *et al.*, 2004). Kemampuan individu memodulasi kelainan dalam tubuh, atau aktivitas yang kurang sebelum pengukuran juga dapat mempengaruhi kadar glukosa darah tikus sehingga hal-hal tersebut dapat menimbulkan bias.

Data rerata GDP tiap kelompok tiap dua minggu diuji korelasi Pearson terhadap rerata kalori pakan tiap kelompok tiap dua minggu. Hasilnya, angka korelasi Pearson yaitu 0,489 dengan $p = 0,013$ dari batas $p > 0,05$ sehingga dapat dikatakan bahwa korelasi antara pakan dengan GDP positif, signifikan namun agak lemah. Hubungan yang positif artinya jika terjadi kenaikan jumlah kalori yang dikonsumsi maka GDP juga mengalami kenaikan. Angka korelasi Pearson 0,489 artinya bahwa 48,9% fluktuasi GDP dipengaruhi oleh besarnya kalori pakan yang dikonsumsi namun 51,1% dipengaruhi oleh faktor lain di luar penelitian seperti timbulnya stres.

Kadar GDP meningkat drastis setelah injeksi STZ karena terjadi kerusakan parsial pada sel β pankreas yang memproduksi insulin sehingga ambilan glukosa dalam darah ke dalam organ perifer terganggu. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Wang *et al.* (2007) peningkatan glukosa darah rerata sangat tinggi (± 500 mg/dL) dan mencapai kondisi DM tipe 2 pada tikus Wistar jantan yang diperkirakan masih muda karena bobotnya yang kecil (rerata 100 gram). Pada penelitian ini, glukosa darah meningkat sangat drastis pada sebagian besar tikus. Hal ini kemungkinan karena tikus yang digunakan sebagai subyek penelitian memiliki usia 12 bulan dengan BB besar sehingga lebih rentan terhadap kerusakan organ. Penelitian yang dilakukan oleh Kim (1991) menunjukkan bahwa pada manusia yang mulai mengalami penuaan maka proses sintesis protein juga terhambat pada berbagai jaringan maupun organ termasuk pankreas maka kemampuannya untuk melakukan perbaikan juga menurun.

Penurunan glukosa darah terbesar berturut-turut P1, Pp, P3, P2, Pn. Penurunan glukosa darah setelah memperoleh terapi tidak dapat digunakan untuk menarik kesimpulan sebab jumlah sampel minimal tiap kelompok tidak terpenuhi dikarenakan jumlah tikus yang mati lebih dari 50%. Pola yang diperoleh belum tentu mewakili hasil penelitian sebab tikus yang mati tidak dapat diramalkan bahwa hasil pengukurannya akan seragam atau justru tidak seragam. Namun, pada data Pn yang mengalami penurunan tanpa diterapi kemungkinan disebabkan oleh respon individu yang berbeda untuk memodulasi kelainan dalam tubuhnya.

6.4 Kadar MDA Ginjal Tikus

Kerusakan jaringan ginjal merupakan hal yang sering terjadi pada penyakit DM akibat stres oksidatif. Pada penyakit diabetes dengan kadar glukosa tidak terkontrol maka peningkatan ROS tidak sebanding dengan kapasitas enzim antioksidan sehingga tercipta kondisi stres oksidatif. Enzim GSH-Px merupakan enzim antioksidan endogen yang meniadakan ROS O^- dan H_2O_2 sehingga menekan reaksi peroksidasi lipid. O^- dan H_2O_2 merupakan substrat endogen untuk enzim antioksidan (Mansour *et al.*, 2002). Ekstrak biji jintan hitam yang mengandung TQ mampu mengikat ROS sehingga reaksi peroksidasi lipid diminimalisasi dan MDA yang terdeteksi semakin rendah. TQ diedarkan dalam tubuh tidak hanya sebagai zat asal namun juga direduksi oleh enzim sitosol menjadi *dihydroquinone* sedangkan elektron yang dilepaskan tidak akan membentuk radikal bebas. Metabolit tersebut bersama TQ dapat memberikan efek antioksidan namun *dihydroquinone* lebih tidak toksik, dapat dikonjugasi, dan diekskresi. Pada penelitian tersebut juga dikatakan bahwa kedua zat tersebut dapat bekerja pada ginjal dengan bukti adanya pengaruh signifikan terhadap biomarker yang diteliti (Mansour *et al.*, 2002).

Pemanenan organ ginjal setelah 1 bulan terapi menunjukkan bahwa berturut-turut kadar MDA terendah diperoleh dari P2, P1, Pn, P3, dan Pp. Artinya, kelompok tikus yang diberi terapi ekstrak dosis 48 mg/kgBB menunjukkan hasil paling baik dengan kadar MDA paling rendah meskipun menurut uji beda, perbedaan yang ditimbulkan tidak signifikan. Kelompok Pp menunjukkan hasil paling tinggi pada pengukuran MDA padahal metformin dikatakan mampu menurunkan kadar MDA ginjal tikus DM yang diinduksi STZ secara signifikan meskipun bukan melalui aktivitas antioksidan secara langsung

melainkan kemampuannya sebagai agen hipoglikemik (Erejuwa *et al.*, 2011). Kemampuan metformin dalam menurunkan kadar MDA didukung oleh suatu penelitian Jatwa dan Anand (2010) yang menggunakan dosis metformin 250 mg/kgBB dengan terapi selama dua minggu.

Di sisi lain, Kombinasi metformin 120 mg/kgBB dan glimepiride 1 mg/kgBB selama enam minggu tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap MDA ginjal tikus (Pedolla *et al.*, 2014). Hasil tersebut menjadi tidak sejalan jika dibandingkan dengan beberapa hasil penelitian lain yang telah disebutkan. Perbedaan hasil tersebut kemungkinan disebabkan oleh perlakuan yang diberikan, galur yang digunakan, dosis ekstrak untuk terapi, lama terapi dalam penelitian, dan kemurnian zat yang berbeda-beda sehingga hasilnya saling bertolak belakang. Selain itu, pada penelitian ini, metformin tidak dapat larut dengan baik dalam tween 80 10% sehingga kemungkinan dosis yang diberikan tidak sesuai dengan perhitungan. Penelitian efek antioksidan sebaiknya menggunakan glibenklamid sebagai kontrol positif sebab glibenklamid memiliki efek antioksidan baik secara langsung melalui kemampuan mengkhelat oksidan maupun tidak langsung yaitu melalui efek hipoglikemik (Ahmadi *et al.*, 2013).

Standar deviasi pada beberapa kelompok termasuk tinggi, hal ini dapat disebabkan oleh berbagai hal lain yang menimbulkan bias seperti rusaknya MDA ketika penyimpanan organ, metode pencucian yang kurang tepat sehingga masih ada komponen dalam darah seperti zat besi (kofaktor peroksidasi lipid) yang mengganggu hasil pengukuran, dan rusaknya kandungan TQ akibat penyimpanan yang kurang tepat. Hal-hal tersebut yang mungkin menyebabkan bias dalam penelitian.

6.5 Kematian Tikus Pada Penelitian

Setelah injeksi STZ dan tikus mengalami DM maka jumlah tikus mati semakin bertambah. Kadar glukosa darah yang tidak terkontrol akan menimbulkan stres oksidatif secara besar-besaran. Stres oksidatif yang menimbulkan kerusakan parah pada berbagai organ dapat memicu kematian dan disfungsi organ-organ sehingga terjadi kematian. Kematian setelah injeksi STZ tidak sedikit dan setelah dilakukan pembedahan terdapat banyak gas dalam saluran pencernaan dan tikus terlihat menggelembung.

Distensi abdomen atau ileus merupakan salah satu kejadian yang dapat muncul sebagai komplikasi DM jika sebelumnya terdapat kondisi diabetes ketoasidosis (DKA). DKA sendiri merupakan salah satu komplikasi akut pada DM yang membutuhkan penanganan serius (Kitabchi *et al.*, 2001). Patofisiologinya kompleks sehingga menimbulkan ketidakteraturan aktivitas elektrik dan distensi abdomen. Pada akhirnya kondisi tersebut menyebabkan akumulasi air, gas, dan feses pada saluran pencernaan (Cagir, 2013).

AbuKhader (2013) mengatakan bahwa pada pemberian TQ dosis 300 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB dapat menimbulkan toksisitas berupa distensi abdomen yang biasa disebabkan oleh golongan quinon. Dosis tersebut sangat jauh jika dibandingkan dengan dosis yang diberikan pada penelitian ini namun ternyata juga terdapat kejadian distensi abdomen. Kandungan TQ dalam ekstrak adalah sekitar 0,14-4,17 gram, kadar pada masing-masing dosis masih jauh di bawah LD₅₀ TQ yang diberikan melalui rute oral yaitu 1 gram/kgBB yang diketahui dalam suatu penelitian. Pada penelitian yang sama, TQ tidak menimbulkan toksisitas (masih memiliki LD₀ pada dosis 100 mg/kgBB) dan baru

menimbulkan kematian pada 10% tikus pada pemberian dosis 500 mg/kg (Al-Ali *et al.*, 2008). Namun, terdapat kemungkinan bahwa tikus termasuk golongan *poor metabolizer* yaitu pemilik kemampuan metabolisme yang sangat lambat terhadap suatu zat atau obat sehingga meningkatkan risiko toksisitas.

Kemungkinan penyebab distensi abdomen lainnya adalah neuropati saluran pencernaan sehingga motilitasnya terganggu padahal aktivitas sensorik, motorik, dan sekretorik dimodulasi oleh interaksi antara kedua sistem saraf otonom dan enterik. Neuropati akibat diabetes merupakan penyebab umum kelainan motilitas pada saluran pencernaan. Hiperglikemia akut, dalam hal ini diinduksi oleh efek STZ, dapat memperlambat pengosongan lambung sedangkan adanya insulin akan mempercepat pengosongannya (Tsfaye *et al.*, 2010). Sementara itu, Sigadou-Roussel *et al.* (2007) menyatakan bahwa tanda-tanda neuropati pada tikus baru timbul pada bulan ke 8-12 selama tikus mengalami diabetes. Tikus yang mati dengan saluran pencernaan menggelembung kemungkinan memang mengalami komplikasi DM berupa distensi abdomen namun penyebab dari distensi abdomen tersebut tidak dapat dipastikan karena tidak dilakukan pengujian seperti kerusakan saraf, pH darah, atau pun kadar TQ dalam darah.

6.6 Keterbatasan Penelitian

1. Penelitian ini tidak melakukan uji kualitatif dan kuantitatif lanjutan untuk memastikan kandungan TQ dalam ekstrak yang digunakan sehingga tidak dapat mengetahui dengan pasti kadarnya.
2. Lokasi yang digunakan kurang kondusif untuk meminimalisasi stres pada subyek percobaan akibat terlalu banyak kehadiran manusia, suhu terlalu tinggi, kurangnya ventilasi, dan keterbatasan luas kandang.

3. Usia tikus yang sudah tua awalnya dimaksudkan agar mirip dengan onset DM pada manusia namun ketika pelaksanaan tidak dapat diatur adanya variasi dalam hal genetik yang dapat menyebabkan variasi respon terhadap terapi.
4. Dosis STZ yang digunakan merupakan dosis rendah yang sudah diteliti dapat menginduksi DM pada tikus usia muda. Ketika dosis yang sama diterapkan pada usia yang lebih tua efeknya mungkin berbeda sehingga timbul banyak komplikasi yang tidak diinginkan hingga kematian. Sementara itu, data dosis yang sesuai untuk tiap usia yang berbeda belum dapat ditemukan.
5. Komplikasi yang terjadi pada DM tipe 2 terutama diperantarai oleh radikal bebas sehingga dibutuhkan terapi untuk kontrol positif yang mampu memberikan efek secara langsung sebagai antioksidan. Ini dimaksudkan agar hasilnya sesuai untuk dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak biji jintan hitam dengan mekanisme kerja yang diteliti yaitu sebagai antioksidan.