BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Ekstraksi Daun Binahong

Pembuatan ekstrak binahong dengan menggunakan metode maserasi karena merupakan cara yang sederhana, maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut. Penggunaan pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat-zat aktif akan larut. Karena ada perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel, maka larutan yang pekat secara otomatis akan keluar (Makalalag *et al.,*2013). Penggunaan alat-alat dan prosedur dalam penelitian dipilih karena dapat dengan mudah dikerjakan meski waktu yang dibutuhkan cukup lama. Dalam Farmakope Indonesia menetapkan bahwa sebagai cairan penyari adalah air, etanol, eatanol-air atau eter. Penggunaan pelarut etanol 70% efektif dalam menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal, dimana bahan penganggu hanya menunjukkan pada skala kecil yang ikut dalam cairan pengekstradi (Voight, 1994). Maserat yang dihasilkan dari proses ini akan di pekatkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu 40^0C. *Rotary* evaporator digunakan untuk memisahkan suatu larutan dari pelarutnya sehingga dihasilkan ekstrak dengan kandungan kimia tertentu sesuai yang diinginkan. Didasarkan pada titik didih pelarut dan adanya tekanan yang menyebabkan uap dari pelarut terkumpul. Pada suhu 40-60^0C proses pemisahan dapat lebih mudah dan cepat dan tidak merusak zat aktif yang

terkandung. Setelah proses penguapan berakhir, didapatkan ekstrak kental binahong.

Untuk mendapat ekstraknya yang kering maka digunakan alat *freeze drying* dengan sebelumnya dimasukan *freezer* -70^{0}C. *Freeze dryng* merupakan metode pengeringan dingin yang memiliki mekanisme pengeringan sublimasi. Untuk menghilangkan apabila ada pelarut yang tersisa. Prinsip utama metode *freeze drying* adalah menghilangkan kandungan air suatu bahan sebanyak ± 98% dengan cara sublimasi. Pada prosedur ini suatu bahan akan mengalami dua fase perubahaan, yaitu membeku dan menyublim. Pada proses pembekuan, produk dalam suatu kemasan yang kedap udara akan dipaparkan pada kondisi yang menyebabkan air dalam produk tersebut membeku, sedangkan pada proses pengeringan akan dialirkan suatu tekanan udara negatif kedalam kemasan prosuk sehingga padatan air mengalami proses sublimasi (Saili, 2008).

6.2 Pembuatan Mikrogel

Pembuatan mikrogel ini diawali dengan pembuatan nanokapsul enzimatik yang terdiri dari glukosa oksidasi yang berasal dari *Aspergillus niger* dan *catalase* yang berasal dari *Bovine*. Pada beberapa tahap dari pembuatan nanokapsul enzimatik yang berubah. Karena ada alat *Amicon Ultra -15 50K* yang tidak masuk dalam barang yang dipesan. Penggunaan enzim glukosa oksidase dapat menghasilkan perubahan respon pH terhadap glukosa. Dan penambahan *catalase* untuk mengembalikan oksigen agar dapat melawan katalisis glukosa dari enzim glukosa oksidase dan menggunakan hidrogen peroksida (H_2O_2) yang tidak diinginkan yang diproduksi oleh glukosa oksidasi. Hidrogen peroksida mungkin dapat menjadi toksik bagi tubuh dan tidak mengaktifkan enzim glukosa oksidase.

Pencampuran glukosa oksidasi dan *catalase* dengan bufer natrium karbonat pH 8,5 0.05 M dan dengan *N-Acryloxysuccinimide* merupakan monomer yang dapat membantu terjadinya polimerasi dan DMSO yang setelah 2 jam diaduk dengan stirer. Lalu dilakukan pembilasan dengan alat tersebut karena tidak ada maka kemudian menggunakan metode dialisis selama 1 jam untuk pembilasan agar beberapa bahan yang tidak diinginkan dapat terbuang seperti. Penggunaan buffer tersebut untuk melarutkan bahan tersebut.Hasil dari dialisis dengan menggunakan PBS pH 7.4 tetap menjadi larutan yang encer dengan warna kuning muda. Penggunaan metode dialisis dengan menggunakan seloform ukuran 12.000-14.000 NMWA ini diharapkan dapat menjadi pengganti dari alat *Amicon Ultra-15 50K* yang dapat memekatkan larutan sesuai dengan ukuran yaitu 50.000 NMWL. *Amicon Ultra-15 50K* merupakan alat yang digunakan untuk penghilangan garam (*desalt)* dan perubahan buffer (*exchange buffers),* mengkonsentrasikan larutan atau protein *pre*-purified dari kolom eluen, pemurnian komponen-komponen makromolekul dari ekstrak jaringan kultur atau sel lisis, dan mengkonsentrasikan sample biologikal yang terdiri dari atibodi, antigen, atau enzim (Millipore,2004). Setelah itu larutan tersebut akan di tambahkan bufer natrium karbonat pH 8.5 0,01M hingga menjadi konsentrasi 1 mg/ml. Apabila sudah terkonsentrasi menjadi 1 mg/ml maka diambil 6 ml dan ditambahkan larutan monomer *acrylamide* 200 mg/ml sebagai monomer *gel-forming*, *N-(3-aminopropyl)-Methacrylamide* dan *crosslinker N-N'-Methylenebisacrylamide* sebagai *cross-linking reagent* (Golova *et al.,* 2012*)* yang diaduk pada stirer yang dimasukan dalam lemari es 4^0C. Penambahan dan perlakuan tersebut dilakukan agar dapat membantu terjadi *cross liknker* karena setelah ditambahkan beberapa bahan dan perlakuan tersebut, larutan menjadi memunculkan serat-serat halus. Lalu ditambahkan *Amonium*

persulfate yang dilarutkan di air 80 mikroliter dan 4 mikroliter *N-N-N'-N' Tetramethylenediamine.* Reaksi polimerisasi antar *acrylamide* melalui reaksi adisi vinil yang diinisiasi oleh adanya radikal bebas yang dihasilkan oleh reaksi reduksi-oksidasi pada *ammonium persulfate* dimana diamina seperti *N-N-N'-N' Tetramethylenediamine* digunakan sebagai katalis tambahan. *Amonium persulfate* digunakan sebagai inisiator yang mengaktifkan *acrylamide* agar bereaksi dengan molekul *acrylamide* yang lainnya membentuk rantai polimer yang panjang. *N-N-N'-N' Tetramethylenediamine* digunakan untuk mengkatalis radikal bebas dari *amonium persulfate.* Selanjutkan akan terjadi polimerasi dan di aliri dengan gas nitrogen. Setelah dinitrogen selama 90 menit, larutan menjadi memunculkan serabut-serabut yang lebih banyak dan memunculkan gelembung. Karena dalam nitrogen juga membantu terjadinya polimerasi.

Setelah itu melarutkan chitosan dengan asam asetat 1 % sehingga menjadi larutan kental seperti gel. Penggunaan asam asetat 1% karena *chitosan* larut dalam asam asetat encer, asam laktat, asam malat, asam format, dan asam suksinat (Alauhdin dkk, 2014). *Chitosan* berasal dari kulit kepiting. *Chitosan* banyak digunakan dalam penelitian, dapat di metabolisme oleh enzim tertentu oleh tubuh khususnya *lysozyme,* dan dapat dipertimbangkan *biodegradable*. *Chitosan* juga *biocompatible, non-immunogenic, non-carsinogen, nontoxic,* dan polimer mukoadhesive, yang membuat komponen sesuai dengan aplikasi biomedikal, seperti mengatur luka, jaringan dan sistem penghantaran obat. *Chitosan* dihasilkan dengan sangat menarik sebagai material *bioadhesive.* Kegunaan mukoadhesive dari *chitosan* dapat diilustrasikan dengan kemampuaannya untuk melekat pada mukosa lambung *porcine in vitro,* dan sebab itu dapat kegunaannya lebih spesifik dalam sistem penghantaran obat (Suresh *et al.,* 2011). Selanjutnya

mencampurkan binahong atau air dan enzimatik nanokapsul dalam larutan *chitosan.* Setelah dicampurkan, kemudian dimasukan ke *syringe* 27 *gauge* sebagai pengganti alat *electrosprying.* Disemprotkan ke larutan TPP 5% yang berada di orbital shaker dengan kecepatan 100 rpm. TPP (*Tripolifosfat)* digunakan sebagai pengikat silang karena TPP memliki banyak muatan negatif sehingga dapat berinteraksi lebih kuat dibandingkan polianion lain seperti sulfat dan sitrat (Zeng *et al., 2010).* Selain itu TPP juga non toksik sehingga diharapkan tidak akan mengubah biokompatibilitas *chitosan* dan sesuai untuk aplikasi biomedis. Maka akan dihasilkan butiran-butiran kecil atau seperti *jelly* karena ada nya reaksi TPP (tripolifosfat) dengan *chitosan.* Reaksi *chitosan* dengan TPP terjadi pembentukkan ikatan silang ionik. Pembentukan ikatan silang ionik anatar *chitosan* dan TPP yaitu ion-ion hidroksil dan TPP akan berkompetisi untuk bereaksi secara ionik dengan gugus -NH_3 pada *chitosan* dalam kondisi basa (Alaudin dkk, 2014). Sehingga membentuk jaring-jaring yang nantinya akan menjerat ekstrak binahong. Setelah jadi semuanya maka akan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 6500 rpm selama 5 menit. Setelah itu larutan TPP diambil dan diganti dengan PBS pH 7,4 1x. Sentrifugasi dilakukan untuk dilakukan pembilasan dengan PBS dan karena PBS memiliki sifat seperti cairan tubuh. Kemudian ditimbang mikrogel plasebo yang diisi air dan mikrogel binahong yang diisi ekstrak binahong dosis 70 mg/kgBB. Setelah didapat berat nya kemudian dimasukkan ke wadah dan disimpan pada lemari es 4^0C.

6.3 Profil Pankreas

Pada penelitian ini akan dilihat pengaruhnya terhadap profil pankreas meliputi peningkatan jumlah sel beta, berat organ pankreas dan perbaikan sel beta

di pulau Langerhans. Pada peningakatan jumlah sel beta pada ketiga perlakuan yaitu diberikan ekstrak binahong 70 mg/kgbb (PA), mikrogel plasebo (PB) dan mikrogel binahong (PC). Berdasarkan penelitian ini sudah ditampilkan ke dalam bentuk grafik. Dari hasil 5 macam lapang pandang yang ditotal dan dijadikan satu. Pada 5 macam lapang pandang tersebut memiliki luas yang beda-beda. Dari perlakuan PA,PB dan PC terlihat PB yang terjadi peningkatan jumlah sel beta daripada PA dan PC. Kemudian dilanjutkan dengan PA yang terjadi peningkatan jumlah sel beta. Kemudian dilanjutkan dengan PC yang mengalami peningkatan jumlah sel beta. Diharapkan pada kelompok perlakuan PC terjadi peningkatan yang lebih dibandingkan PA maupun PB. Hal tersebut tidak terjadi dikarenakan mungkin setiap respon tikus berbeda-beda dalam merespon terapi yang diberikan dan setiap lapang pandang tersebut memiliki jumlah sel beta yang berbeda.

Profil pankreas yang kedua yaitu berat pankreas. Berat pankreas normal rata-rata adalah ± 1 gram pada tikus. Pada kontrol negatif berat pankreas rerata mencapai 1 gram, perlakuan positif berat pankreas rerata yaitu 0,90 gram, kelompok yang diberi terapi ekstrak binahong dosis 70 mg/kgBB rerata berat pankreas yaitu 0,88 gram, kelompok yang diberikan mikrogel plasebo rerata berat pankreas yaitu 0,87 gram dan kelompok yang diterapi mikrogel binahong rerata berat pankreas yaitu 0,84 gram. Berdasarkan beberapa data yang sudah didapat menunjukkan dengan bertambahnya berat badan maka berat organ pankreas dapat bertambah. Pada kelompok PB terlihat signifikan dalam kenaikan berat pankreas tetapi pada kelompok ini sering terjadi kematian tikus. Sehingga yang signifikan dalam bertambahnya berat pankreas adalah PA karena lebih aman dan tidak ada kematian tikus.

Profil pankreas yang ketiga yaitu perbaikan sel beta di pulau *langerhans*. Zubaidah (2014), melaporkan bahwa pulau langerhans dikatakan normal jika adanya keteraturan susunan sel endokrin yang menyebar di pulau langerhans dengan bentuk sel yang seragam, bentuk bulat dan inti sel tampak jelas serta tidak terdapat sel-sel yang mengalami edema (pembengkakan). Hal tersebut dikarenakan jaringan kelompok normal tidak diinduksi oleh streptozotocin sehingga tidak timbul keadaan diabetes yang ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan struktur morfologi pankreas (normal). Pada kelompok perlakuan yang diberikan terapi ekstrak binahong dosis 70 mg/kgBB (PA), diterapi dengan mikrogel binahong (PB) dan diterapi dengan mikrogel binahong dengan dosis 70 mg/kgBB (PC). Pada ketiga perlakuan ini perbaikan sel beta di pulau *langerhans* terlihat terjadi perbaikan sel beta. Karena pada kelompok positif yang diinduksi STZ 35 mg/kgBB dan pakan *High Fat Diet* sel beta hampir tidak nampak atau kelihatan kurang jelas, keberadaannya dalam pulau *langerhans* tidak rata atau menyebar pulau *langerhans*. Sehingga perlakuan terapi pada kelompok PA dan PC mengalami perbaikan sel beta di pulau *langerhans* meskipun tidak terlalu menonjol perbaikan tersebut karena memerlukan waktu untuk melihat hasil yang lebih lanjut. Sedangkan pada perlakuan PB, sel beta masih tidak menyebar dengan rata di pulau *langerhans.* Dikatakan terjadi perbaikan sel beta dipulau langerhans karena terlihat sel beta yang nampak jelas, bentuk bulat meskipun asimetris, hampir menyebar di pulau langerhans

6.4 Analis Uji Urin Kualitatif

Pada keadaan normal biasanya tidak ditemukan glukosa di urine. Pada penelitian ini digunakan uji urin kualitatif dengan menggunakan reagen benedict.

Reagen benedict digunakan untuk tujuan bagaimana menampilkan pengurangan gula (*reducing sugar).* Larutan ini membentuk endapan dengan salah satu warna merah, Uji urin kualitatif dengan reagen benedict digunakan untuk pemeriksaan glukosa di urine yang sering disebut *glycosuria* atau *glucosuria* pada penderita diabetes melitus. Pada penelitian ini menggunakan reagen benedict. Reagen benedict memiliki warna biru terang karena terdiri dari tembaga sulfat (CU_2SO_4). Warna biru terang didapat dari ion tembaga II (CU^{2+}) yang apabila terjadi penggurangan menjadi ion tembaga I (CU^{+}). Ada endapan yaitu merah (CU_2O) pada air yang tidak larut. Warna dari akhir larutan adalah mungkin hampir kelihatan hijau hingga merah bata yang tergantung pada reaksi ion tembaga (CU^{2+}).

Ketika dicampur dan dipanaskan dengan urine yang mengandung glukosa maka elektron pada tembaga yang tersedia akan lepas dan tembaga akan mengalami kekurangan elektron, yang ditunjukkan dengan perubahan warna orange kecoklatan. Selama proses ini, ion tembaga biru akan berkurang dan menjadi ion tembaga merah. Ketika ion tembaga berkurang, maka glukosa akan memberikan elektronnya dan dioksidasi. Karena glukosa dapat mengurai tembaga di reagen benedict. Pada hasil tes urin penelitian ini, untuk keadaan normal hasil warna urin biru gelap tanpa adanya endapan. Untuk keadaannya diabetes melitus didapatkan warna orange, kuning kecoklatan, coklat dengan endapan kuning. Bahkan dikelompok perlakuan juga sering didapatkan warna orange dengan endapan kuning. Sehingga dapat dipastikan kelompok perlakuan ini mengalami glukosuria. Adanya kandungan glukosa pada urine merupakan cara obat ini dalam menurunkan glukosa darah. Sehingga pada profil pankreas yang telah diamati tidak ada perbaikan yang signifikan pada sel beta karena obat ini memiliki jalur untuk menurunkan glukosa melalui urine maka ditemukan glukosa dalam urine.

6.5 Ketahanan Hidup (*Survival)* Tikus dengan *Kaplan-Meier*

Pada penelitian ini ketahanan setiap kelompok berbeda-beda. Terdapat lima macam perlakuan yang digunakan yaitu kontrol negatif, kontrol positif, diberikan terapi ekstrak binahong dosis 70 mg/kgBB, diberikan terapi mikrogel plasebo dan diberikan terapi mikrogel binahong dosis 70 mg/kgBB. Pada ketahanan *survival* kelompok yang diberikan terapi mikrogel plasebo memiliki kesempatann mati yang lebih banyak daripada kelompok terapi yang diberikan ekstrak binahong 70 mg/kgBB dan mikrogel binahong dosis 70 mg/kgBB. Hal ini terjadi karena proses penurunan glukosa darah pada obat ini dipercepat melalui urin sehingga mungkin terjadi hipoglikemia pada tikus yang mati tersebut. Mungkin juga terjadi beberapa reaksi bahan yang tidak diketahui sehingga menimbulkan toksik pada tubuh hewan coba.

6.6 Keterbatasan penelitian

Dalam pembuatan mikrogel ini ada beberapa tahapan yang tidak dilaksanakan. Penggunaan alat Amicon Ultra-15 50K yang tidak digunakan karena tidak dipesan sebelumnya sehingga diganti dengan metode dialisis. Metode ini tidak diketahui efeknya terhadap pembilasan yang harusnya menggunakan alat tersebut. Sehingga hal ini menyebabkan ada beberapa bahan yang tidak diinginkan ikut dalam obat ini. Penggunaan alat electrosprying yang digantikan dengan *syringe 27 gauge* sehingga pembuatan mikrogel ini tidak berjalan dengan sempurna dan tekanan untuk menyemprotkan syringe berbeda karena ada dua orang yang mengerjakan. Kelenjar pankreas yang diberikan ke Laboratorium KESSIMA mengalami ketelatan dalam pengerjaan. Laboratorium yang digunakan berpindah-pindah sehingga mungkin itu faktor yang dapat mempengaruhi apabila

ada ketidaksesuaian pada hasil pewarnaan HE. Untuk pewarnaan HE juga kurang maksimal untuk mendeteksi sel beta di pulau *langerhans* karena di pulau *langerhans* terdapat 4 macam sel. Sehingga diperlukan pewarnaan imunohistokimia untuk mengetahui adanya perbaikan pada sel beta.