

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KOMBINASI
KAYU MANIS (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) DAN
BUNGA BUNGUR (*Lagestroemia speciosa* L) TERHADAP
EKSPRESI NUCLEAR FAKTOR KAPPA BETA (NF- κ B)
DAN TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- α)
PADA GINJAL TIKUS (*Rattus norvegicus*) DENGAN DIET
TINGGI GLUKOSA
SKRIPSI**

Oleh :
PUTRI SUCI RULLIYANI
125130101111073



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

repository.ub.ac.id

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KOMBINASI
KAYU MANIS (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) DAN
BUNGA BUNGUR (*Lagerstroemia speciosa* L) TERHADAP
EKSPRESI NUCLEAR FAKTOR KAPPA BETA (NF- κ B)
DAN TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- α)
PADA GINJAL TIKUS (*Rattus norvegicus*) DENGAN DIET
TINGGI GLUKOSA**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

PUTRI SUCI RULLIYANI

125130101111073



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KOMBINASI KAYU MANIS
(*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) DAN BUNGA BUNGUR (*Lagerstroemia
speciosa* L) TERHADAP EKSPRESI NUCLEAR FAKTOR KAPPA BETA (NF-
k β) DAN TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- α) PADA GINJAL
TIKUS (*Rattus norvegicus*) DENGAN DIET TINGGI GLUKOSA**

Oleh :

Putri Suci Rulliyani

NIM. 125130101111073

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji

Pada tanggal 20 September 2016

Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof.Dr. Aulanni'am, drh., DES.

NIP. 19600903 198802 2 001

Edwin Widodo, S.Si.,M.Sc., Ph.D

NIP. 19810504 200501 1 001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini :

Nama : Putri Suci Rulliyani
NIM : 125130101111073
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Pemberian Ekstrak Kombinasi Kayu Manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) Bi) Dan Bunga Bungur (*Lagerstroemia speciosa* L) Terhadap Ekspresi Nuclear Faktor Kappa Beta (NF- κ B) Dan Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) Pada Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Dengan Diet Tinggi Glukosa

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang tercantum di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 20 September 2016
Yang Menyatakan,

Putri Suci Rulliyani
NIM. 125130101111073

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KOMBINASI KAYU MANIS
(*Cinnamomum burmanii* (NESS) BI) DAN BUNGA BUNGUR (*Lagerstroemia
speciosa* L) TERHADAP EKSPRESI NUCLEAR FAKTOR KAPPA BETA
(NF- κ B) DAN TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- α) PADA
GINJAL TIKUS (*Rattus norvegicus*) DENGAN DIET TINGGI GLUKOSA**

ABSTRAK

Diet tinggi glukosa yang menyebabkan keadaan hiperglukosa merupakan suatu kondisi dimana *impaired fasting glucose* (IFG) dan *impaired glucose tolerance* (IGT) terganggu yang merupakan faktor risiko yang kuat terhadap terjadinya penyakit diabetes mellitus. Kondisi hiperglukosa yang mengarah ke diabetes mellitus ditandai dengan peningkatan ekspresi NF- κ B dan TNF- α pada ginjal. Bahan alami yang dapat membantu mencegah peningkatan tersebut adalah kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciosa* L). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kombinasi kayu manis dan bunga bungur terhadap ekspresi NF- κ B dan TNF- α pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar dengan diet tinggi glukosa. Penelitian ini menggunakan glukosa 10% dan fruktosa 15% yang ditambahkan pada pakan harian tikus sebagai induksi terjadinya keadaan hiperglukosa selama 14 hari berturut-turut. Pemeriksaan dilakukan dengan uji imunohistokimia. Data analisa secara kuantitatif untuk hasil uji imunohistokimia TNF- α dan NF- κ B. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terapi ekstrak kombinasi kayu manis dan bunga bungur secara signifikan ($p < 0,05$) mampu menurunkan ekspresi NF- κ B dan TNF- α . Dosis 18 mg/kgBB merupakan dosis efektif dengan presentasi penurunan NF- κ B sebesar 88,3% dan ekspresi TNF- α sebesar 91,1%. Kesimpulan dari penelitian ini adalah terapi ekstrak kombinasi kayu manis dan bunga bungur dapat digunakan sebagai alternatif terapi hiperglukosa.

Kata kunci: Hiperglukosa, *Cinnamomum burmanii*, *Lagerstroemia speciosa* L, TNF- α , NF- κ B

repository.ub.ac.id

Effect Combination of Cinnamon Extract (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) And Flowers Bungur (*Lagerstroemia speciose L*) Against Expression of NF- κ B and TNF - α Kidney In Rat (*Rattus norvegicus*) with High Glucose Diet

ABSTRACT

High glucose diet can make hyperglucose effect, which is a condition shown with impaired fasting glucose (IFG), and impaired glucose tolerance (IGT), Both are strong risk factors for the occurrence of diabetes mellitus. Hiperglukosa conditions that lead to diabetes mellitus is characterized by the increased expression of NF- κ B and TNF- α in the kidneys. Natural ingredients that can help prevent these improvements are cinnamon (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) and bungur flowers (*Lagerstroemia speciose L*). The purpose of this study was to determine the effect of extract combination of cinnamon (*Cinnamomum burmanii* (NESS) BI) and bungur flowers (*Lagerstroemia speciose L*) on the expression of NF- κ B and TNF- α kidney in male rats (*Rattus norvegicus*) strain Wistar with high glucose diet. This study will use a 10% glucose and 15% fructose added to the daily feeding mice as the induction of the hiperglukose for 14 consecutive days. Experiments will be done by immunohistochemistry method for the quantitative analysis results immunohistochemistry method TNF- α and NF- κ B. The results of this study showed that the combination therapy extract of cinnamon and bungur flowers significantly ($p < 0.05$) decrease the expression of NF- κ B and TNF- α . A dose of 18 mg/body weight is the effective dose to the presentation of a decrease in NF- κ B is by 88.3% and the expression of TNF- α by 91.1%. The conclusion of this study combination therapy extract of cinnamon and bungur flowers can be used as an alternative for hiperglukose therapy.

Keywords: Hiperglukose, *Cinnamomum burmanii*, *Lagerstroemia speciose L*, TNF- α , NF- κ B

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur atas kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan rahmat serta hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Kombinasi Kayu Manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) Dan Bunga Bungur (*Lagerstroemia speciosa* L) Terhadap Ekspresi Nuclear Faktor Kappa Beta (NF- κ B) Dan Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) Pada Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Dengan Diet Tinggi Glukosa”. Penelitian ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Program Kedokteran Hewan, Program Studi Pendidikan Dokter Hewan, Universitas Brawijaya.

Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terima kasih kepada segenap pihak secara langsung maupun tidak langsung yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih terutama kepada :

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES sebagai Pembimbing I dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan atas segala bantuan, bimbingan, kesabaran, nasihat, waktu, dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
2. Bapak Edwin Widodo, S.Si., M.Sc., Ph.D sebagai Pembimbing II atas segala bimbingan dan arahan yang telah diberikan kepada penulis.
3. drh. M Arfan Lesmana, M.Sc dan ibu Dhita Evi Aryani, S.Farm, Apt sebagai dosen penguji yang telah meluangkan waktu serta memberikan masukan dan saran yang membangun.
4. Bapak Wibi Riawan S.Si., M.Sc yang senantiasa membantu dalam proses penelitian penulis.
5. Keluarga penulis, Bapak Hairullah, Ibu Rosidah Hasan, kakak Aji Aditya Putra beserta istri dan kakak penulis Yulida Rachmita Sari beserta suami serta keponakan M. Azzam Farras Putra dan Aisyah Mikayla Rachman yang telah

memberikan dukungan baik moral dan material kepada penulis untuk tetap semangat dalam menyelesaikan skripsi ini.

6. Tim Penelitian “*GLUKOlicious*” yakni Dessy, Tito dan Rafika Redis atas kerjasama selama penelitian.
7. Sahabat tercinta Dessy Dwi Rachmawati yang senantiasa memberikan dukungan moral terhadap penulis.
8. Sahabat “Ubur-ubur crew” atas kesetiiaannya menemani selama masa perkuliahan dan menjadi keluarga terbaik bagi penulis.
9. Seluruh sahabat VENA12, angkatan 2012 PKH UB atas segala perhatian, dorongan, dukungan dan doa yang telah diberikan.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Tuhan membalas segala kebaikan serta ketulusan yang telah diberikan. Semoga Tugas Akhir ini dapat memberikan manfaat dan menambah ilmu pengetahuan bukan hanya untuk penulis namun untuk pembaca yang lain.

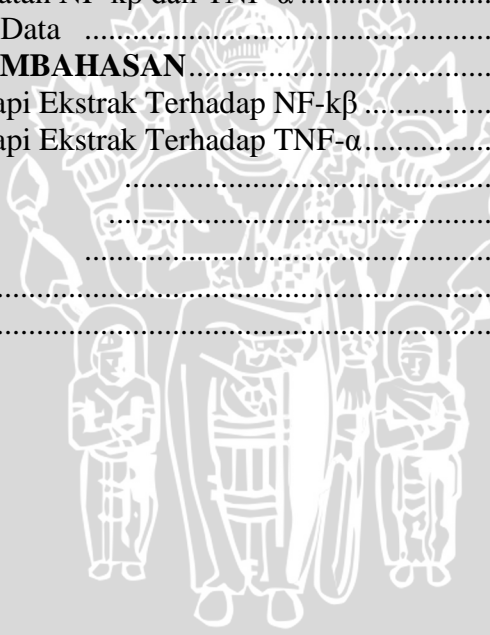
Malang, 20 September 2016

Penulis

DAFTAR ISI

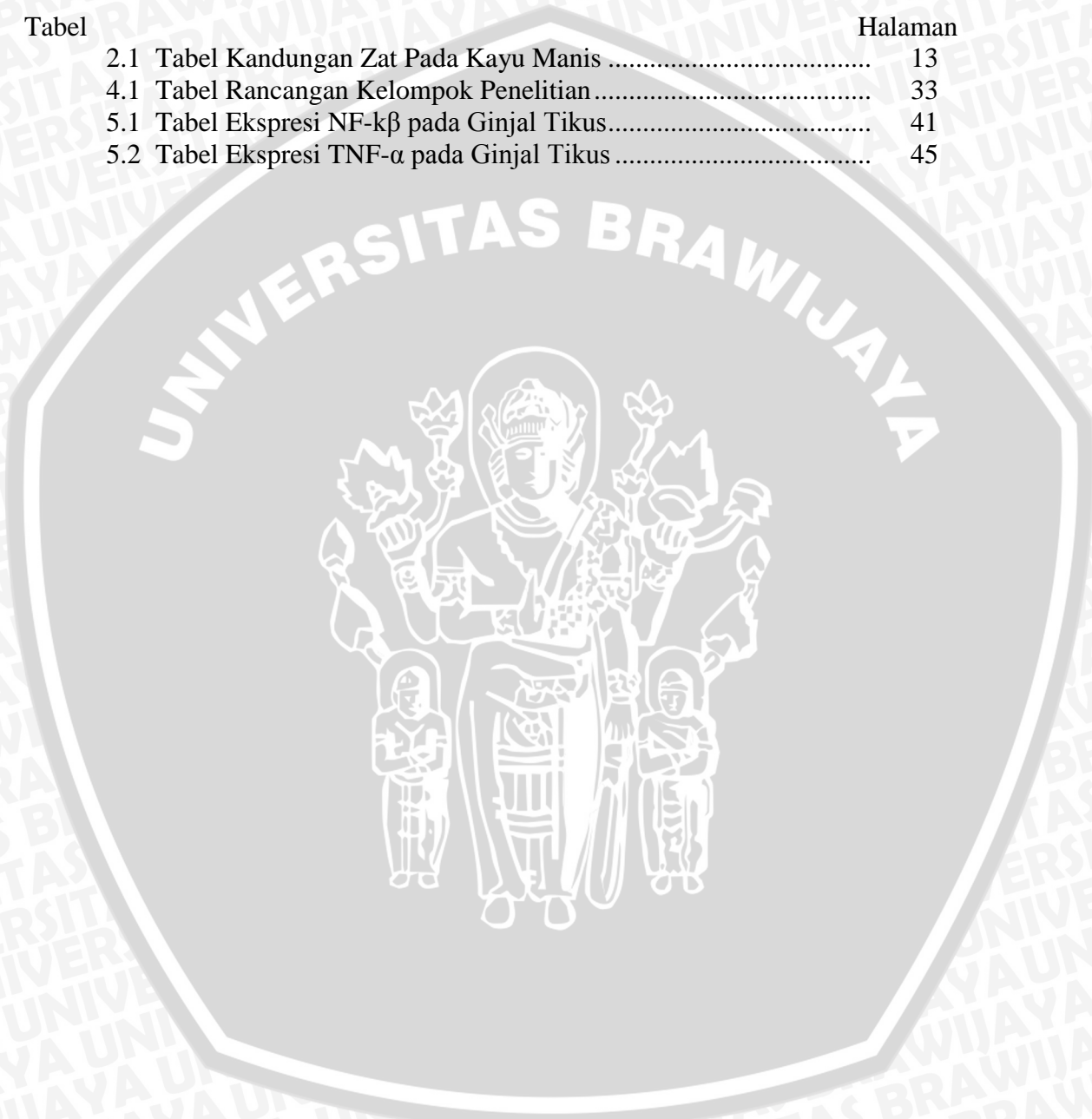
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Batasan Masalah	6
1.4 Tujuan Penelitian	7
1.5 Manfaat Penelitian	7
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Hiperglukosa	8
2.1.1 Patogenesis	9
2.1.2 Diabetes mellitus	10
2.2 Kayu Manis	11
2.2.1 Kandungan Kayu Manis	12
2.2.2 Mekanisme MHCP Kayu Manis	13
2.3 Bunga Bungur	16
2.3.1 Kandungan Bunga Bungur	18
2.4 Glukosa	20
2.4.1 Metabolisme glukosa	20
2.4.2 Metabolisme glukosa jaringan adiposa	20
2.5 Fruktosa	21
2.5.1 Metabolisme fruktosa menginduksi resistensi insulin	21
2.6 Perbedaan glukosa dan fruktosa	22
2.7 Rattus norvegicus	23
2.8 NF- κ B	23
2.8.1 Definisi	24
2.8.2 Jalur NF- κ B	24
2.9 TNF- α	25
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	27
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	27
3.2 Hipotesis Penelitian	30

BAB 4. METODE PENELITIAN.....	31
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	31
4.2 Alat dan Bahan	31
4.2.1 Alat	31
4.2.2 Bahan	31
4.3 Tahapan Penelitian	32
4.4 Prosedur Kerja	35
4.4.1 Rancangan Penelitian Dan Persiapan Hewan Coba	35
4.4.2 Pembuatan dan Penentuan Ekstrak Kombinasi	36
4.4.3 Pemberian Ekstrak Kombinasi	36
4.4.4 Isolasi Organ Ginjal.....	36
4.4.5 Pewarnaan Imunohistokimia NF-k β	36
4.4.6 Pewarnaan Imunohistokimia TNF- α	37
4.4.7 Pengamatan NF-k β dan TNF- α	38
4.4.8 Analisa Data	38
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	39
5.1 Pengaruh Terapi Ekstrak Terhadap NF-k β	39
5.2 Pengaruh Terapi Ekstrak Terhadap TNF- α	44
BAB 6. PENUTUP	49
6.1 Kesimpulan	49
6.2 Saran	49
DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN	54



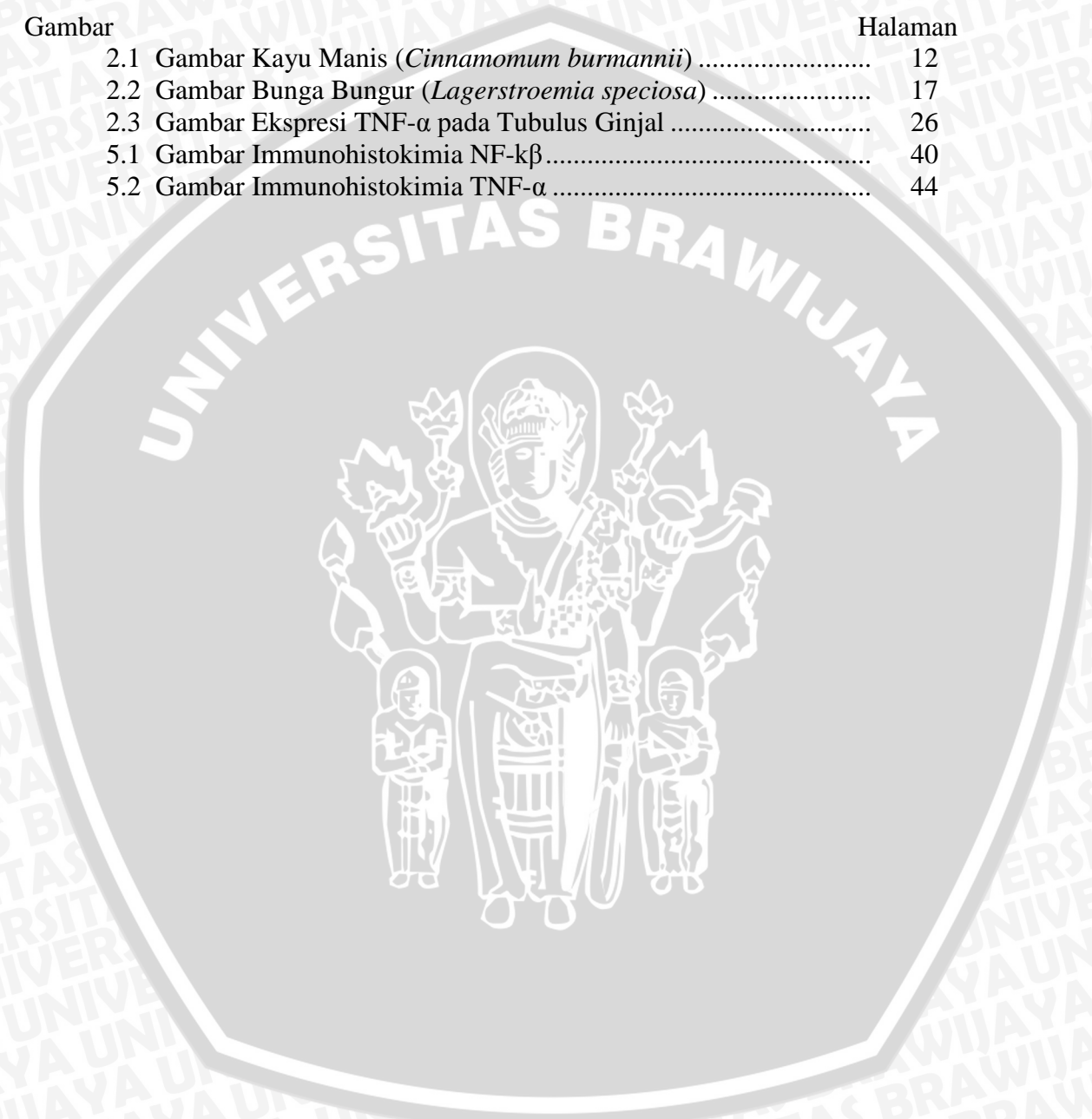
DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
2.1	Tabel Kandungan Zat Pada Kayu Manis	13
4.1	Tabel Rancangan Kelompok Penelitian	33
5.1	Tabel Ekspresi NF- κ B pada Ginjal Tikus.....	41
5.2	Tabel Ekspresi TNF- α pada Ginjal Tikus	45



DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	Gambar Kayu Manis (<i>Cinnamomum burmannii</i>)	12
2.2	Gambar Bunga Bungur (<i>Lagerstroemia speciosa</i>)	17
2.3	Gambar Ekspresi TNF- α pada Tubulus Ginjal	26
5.1	Gambar Immunohistokimia NF- κ B	40
5.2	Gambar Immunohistokimia TNF- α	44



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Sertifikat Layak Etik dari Komisi Penelitian UB	54
Lampiran 2. Sertifikat Ekstrak dari PT. Deka Medika Laboratorium..	55
Lampiran 3. Pembuatan Preparat Ginjal	56
Lampiran 4. Diagram Alir Pembuatan Preparat Imunohistokimia	57
Lampiran 5. Skema Kerja Penelitian	59
Lampiran 6. Perhitungan Dosis Ekstrak.....	60
Lampiran 7. Pemberian dan Pembuatan Pakan Diet Tinggi Glukosa..	62
Lampiran 8. Data Hasil Ekspresi dan Perhitungan NF- κ B.....	63
Lampiran 9. Uji Statistik Ekspresi NF- κ B	64
Lampiran 10. Data Hasil Ekspresi dan Perhitungan TNF- α	68
Lampiran 11. Uji Statistik Ekspresi TNF- α	69
Lampiran 12. Data Hasil Pengukuran Kadar Glukosa Darah	73



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

Singkatan

Keterangan

IFG	<i>impaired fasting glucose</i>
IGT	<i>impaired glucose tolerance</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
NF-k β	<i>Nuclear Factor Kappa Beta</i>
NEFA	<i>Non-Esterifikasi Fat Acid</i>
IDDM	<i>Insulin Dependent Diabetes Mellitus</i>
NIDDM	<i>Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus</i>
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
MHCP	<i>Methyl Hydroxil Chalcone Polymer</i>
DNL	<i>De Novo Lipogenesis</i>
HFSC	<i>High Fructose Corn Syrup</i>
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
SA-HRP	<i>Strep Avidin Horse Radish Peroxidase</i>
IHK	<i>Imunohistokimia</i>
DAB	<i>Diaminobenzidine</i>



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diet tinggi glukosa yang menyebabkan keadaan hiperglukosa merupakan suatu kondisi dimana *impaired fasting glucose* (IFG) atau gula darah puasa terganggu, dan *impaired glucose tolerance* (IGT) atau toleransi glukosa terganggu yang merupakan faktor risiko yang kuat terhadap terjadinya penyakit diabetes mellitus, yang nantinya dapat menyebabkan komplikasi yang kompleks. Pada sebagian besar individu yang mengalami kondisi hiperglukosa ada pula diantaranya telah mengalami kelainan seperti yang ditemukan pada diabetes mellitus yakni kelainan mikrovaskular. Secara global diseluruh dunia diperkirakan terdapat 314 juta orang dengan prediabetes saat ini, dan akan meningkat menjadi 418 juta pada tahun 2025 (Asman, 2012).

Keadaan hiperglukosa terjadi akibat dari peningkatan pengiriman trigliserida atau asam lemak non-esterifikasi (NEFA) yang mengganggu pemanfaatan glukosa sehingga merusak aksi insulin dan menyebabkan tingginya kadar glukosa darah. Hal tersebut mengakibatkan masuknya kalsium secara berlebihan, sehingga asupan kalsium dan oksigen akan semakin meningkat dan selanjutnya akan menimbulkan radikal bebas yang menyebabkan munculnya stress oksidatif. Ketidakseimbangan radikal bebas mengakibatkan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS), akibat pembentukan ROS yang tidak terkendali kemudian menstimulasi aktivasi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- κ B) yang nantinya akan memodulasi ekspresi gen-gen proinflamasi seperti sitokin yang salah satunya adalah *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α).

Hiperglukosa yang disebabkan oleh peningkatan pengiriman trigliserida tersebut memiliki keterlibatan terhadap organ ginjal, kondisi tersebut memperburuk sirkulasi ke sebagian besar organ yang kemudian menyebabkan hipoksia (kondisi kurangnya pasokan oksigen ke jaringan) dan cedera jaringan sehingga merangsang reaksi peradangan yang berperan menimbulkan aterosklerosis (penyempitan pembuluh darah) akibat kejadian tersebut maka proses suplai darah ke ginjal menurun, sehingga terjadi gangguan proses filtrasi di glomerulus yang dapat menyebabkan kerusakan ginjal (Sudoyo, 2007).

Berdasarkan fakta diatas maka dibutuhkan suatu alternatif bahan makanan yang dapat digunakan sebagai pencegah peningkatan trigliserida dan menekan terjadinya resistensi insulin pada kondisi hiperglukosa yang juga sebagai penanda kejadian diabetes mellitus. Produk alami seperti rempah-rempah yang biasanya digunakan sebagai penambahan cita rasa pada makanan kini telah diketahui memiliki manfaat lain yakni berperan dalam metabolisme karbohidrat (Khan *et al.*, 2003). Salah satu bahan alami tersebut adalah kayu manis. Dari 54 spesies kayu manis (*Cinnamomum sp.*) yang dikenal didunia, 12 diantaranya terdapat di Indonesia. Secara keseluruhan, tiga jenis kayu manis yang populer di pasar dunia adalah *Cinnamomum burmanii* (di Indonesia) yang produknya dikenal dengan nama cassiavera, *Cinnamomum zeylanicum* (di Sri Lanka dan Seycelles) dan *Cinnamomum cassia* (di Cina) yang produknya dikenal dengan *Cassia Cina*. Tanaman kayu manis yang banyak dikembangkan di Indonesia adalah *Cinnamomum burmanii* yang merupakan usaha perkebunan rakyat, terutama di Sumatera Barat , Jambi dan

Sumatera Utara. *Cinnamomum burmanii* merupakan ekspor tradisional yang masih dikuasai Indonesia sebagai negara pengekspor utama di dunia (Wangsa, 2006).

Kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) telah beberapa kali diteliti dapat menurunkan kadar glukosa darah, total kolesterol, dan kadar trigliserida (Khan, 2003). Walaupun penelitian tentang pengaruh kayu manis ini telah beberapa kali dilakukan, namun dalam penelitian tersebut bahan yang digunakan adalah ekstrak salah satu komponen yang terdapat dalam kayu manis.

Kayu manis memiliki kandungan *methyl hydroxyl chalcone polymer* (MHCP) dan zat-zat lain yang dapat membantu meningkatkan *uptake* glukosa dan fosforilasi insulin reseptor serta mencegah terjadinya peningkatan trigliserida (Safdar, 2004). Namun dalam beberapa jurnal Diabetes Care tidak disebutkan jumlah dan kandungan spesifik dari tiap zat aktif yang terkandung dalam kayu manis. Jurnal-jurnal tersebut hanya menyatakan perlunya penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh kayu manis (Ziegenfuss, 2006).

Salah satu jenis tanaman yang juga dapat menurunkan kadar gula darah (bersifat hipoglikemik) adalah tanaman bungur (*Lagerstroemia*) (Dalimartha, 2005). Bungur (*Lagerstroemia speciosa* Pers.) adalah salah satu tanaman obat yang tumbuh di Indonesia. Tanaman ini banyak dijumpai sebagai peneduh jalan (Dalimartha, 2003). Senyawa ellagitanin yaitu *lagerstroemia* dan flosin B, dan reginin A yang terdapat pada bunga bungur memiliki sifat yang mirip dengan hormon insulin (*insulin-like compound*). Secara *in vitro*, tiga senyawa tersebut mampu meningkatkan aktifitas transport glukosa ke sel dalam sel adipose. Kemampuan *lagerstroemia* dan flosin B hampir setengah kali kemampuan insulin dalam meningkatkan kecepatan

transport glukosa. Bahkan, reginin A memiliki kemampuan yang hampir sama dengan insulin (Hayashi *et al.*, 2002).

Kemampuan kandungan *methyl hydroxyl chalcone polymer* (MHCP) yang terdapat pada kayu manis (*Cinamomum burmanii*) yang berperan dalam peningkatan *uptake* glukosa dan fosforilasi insulin reseptor serta mencegah terjadinya peningkatan trigliserida yang kemudian didukung oleh kandungan ellagitanin yaitu *lagentroemia* dan flosin B, dan reginin A yang terdapat pada bunga bungur (*Lagerstroemia speciosa*) yang berperan dalam meningkatkan kecepatan aktifitas transport glukosa ke sel dalam sel adipose akan memberikan efek yang signifikan apabila dikombinasikan. Selain kandungan tersebut, kayu manis juga berperan sebagai anti-inflamasi yang digunakan untuk penghambat peningkatan kadar gen-gen proinflamasi yang berperan dalam peradangan sedangkan bunga bungur memiliki kandungan lain yaitu sebagai antioksidan yang berperan dalam melawan kerusakan oksidatif dengan menekan radikal bebas.

Glukosa adalah monosakarida yang paling penting, dimana sel hidup menggunakan komponen ini sebagai sumber energi (Harison, 2008). Glukosa menjadi komponen utama yang membentuk pati, yaitu suatu unit polisakarida dalam gandum, beras, kentang, dan sagu, yang pada umumnya menjadi bahan makanan pokok di berbagai belahan dunia (Sunita, 2001).

Fruktosa merupakan suatu gula sederhana yang banyak digunakan sebagai pemanis dan sering dijumpai dalam komposisi berbagai produk makanan maupun minuman. Secara alami, fruktosa juga banyak terkandung dalam buah-buahan, sayur-sayuran, biji-bijian dan madu. Fruktosa berikatan dengan glukosa membentuk sukrosa

yaitu pemanis yang terdapat dalam bahan alami seperti tebu atau bit dan sering digunakan dalam kehidupan sehari-hari. Fruktosa memiliki rasa yang lebih manis daripada glukosa dengan harga yang relatif murah. Sekitar sepertiga dari fruktosa berasal dari buah-buahan, sayuran, dan sumber alam lainnya, dan dua pertiga ditambahkan ke minuman dan makanan dalam bentuk *High Fructose Corn Syrup* (HFCS) (Prahastuti, 2011).

Berdasarkan latar belakang di atas, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui dan mempelajari potensi kayu manis dan bunga bungur terhadap hiperglukosa. Pemberian ekstrak kombinasi Kayu Manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan Bunga Bungur (*Lagerstroemia speciosa* L) pada penelitian ini digunakan untuk mengetahui ekspresi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- κ B) dan *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) dengan diet tinggi glukosa.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah :

1. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciosa* L) terhadap ekspresi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- κ B) pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) dengan diet tinggi glukosa?
2. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia*

speciose L) terhadap ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) dengan diet tinggi glukosa?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar dengan berat badan 150-200 gram dan umur 8-12 minggu. Hewan model diperoleh dari Peternakan Tikus milik Bapak Purnomo Sumbersekar-Dau. Penggunaan hewan coba dalam penelitian telah mendapatkan sertifikat layak etik dari Komisi Penelitian Universitas Brawijaya No.517-KEP-UB (*Lampiran 1*)
2. Pembuatan keadaan hiperglukosa pada hewan model tikus dengan diet tinggi glukosa menggunakan glukosa dan fruktosa yang didapatkan dari Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya. Pemberian dilakukan dengan mencampurkan perpaduan glukosa 10% dan fruktosa 15% dari jumlah pakan perhari kedalam pakan tikus selama 14 hari.
3. Dosis ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciose L*) yaitu 4,5 mg/kgBB, 9 mg/kgBB, dan 18 mg/kgBB Ekstrak diberikan selama 14 hari. Ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciose L*) diperoleh dari PT. Dexa Medika Laboratorium (*Lampiran 2*).
4. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi NF- κ B dan TNF- α pada ginjal tikus yang dilihat dengan menggunakan metode imunohistokimia (IHK).

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciose* L) terhadap terhadap ekspresi NF- κ B pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) dengan diet tinggi glukosa.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciose* L) terhadap terhadap ekspresi TNF- α pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) dengan diet tinggi glukosa

1.5 Manfaat Penelitian

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh pemberian ekstrak kombinasi Kayu Manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciose* L) terhadap ekspresi Nuclear Faktor Kappa Beta (NF- κ B) dan Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) dengan diet tinggi glukosa.
2. Penelitian ini dapat dijadikan dasar untuk mengolah herbal kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciose* L) yang mudah diambil manfaatnya guna menurunkan ekspresi NF- κ B dan TNF- α pada tikus (*Rattus norvegicus*) dengan diet tinggi glukosa.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diet Tinggi Glukosa (Hiperglukosa)

Diet tinggi glukosa yang menyebabkan keadaan hiperglukosa adalah suatu kondisi dimana kadar gula darah terlalu tinggi untuk dianggap normal, tetapi tidak cukup tinggi untuk dilabelkan sebagai diabetes. Orang-orang dikatakan sebagai hiperglukosa jika kadar gula darah puasa mereka adalah antara 101 mg/dL dan 125 mg/dL atau jika tingkat gula darah mereka 2 jam setelah tes toleransi glukosa adalah antara 140 mg/dL sampai 199 mg/dL. Dengan melakukan identifikasi terhadap orang yang mengalami hiperglukosa sangat penting karena mereka mempunyai resiko yang lebih tinggi untuk menderita penyakit Diabetes Mellitus pada masa depan. Kondisi hiperglukosa tidak hanya beresiko terhadap penyakit diabetes saja melainkan terhadap penyakit kardiovaskuler juga (Merck, 2008).

Hiperglukosa juga merupakan suatu keadaan dimana terjadi kelainan aksi insulin yang berpotensi terhadap terjadinya gangguan pada sekresi insulin atau keduanya. Hal tersebut nantinya dapat menyebabkan gangguan metabolisme karbohidrat, protein, dan lemak. Dimana terjadi penghalang *uptake* dan penggunaan glukosa oleh sebagian besar sel dalam tubuh. Sehingga konsentrasi gula darah meningkat, penggunaan glukosa oleh sel imun menurun, dan penggunaan atau pemecahan protein dan lemak meningkat (Guyton, 2006).

Pada keadaan normal, kadar glukosa darah puasa adalah < 100 mg/dL, dan 2 jam setelah beban atau keadaan kadar gula toleransi yaitu < 140 mg/dL. Sedangkan untuk diabetes, kadar glukosa puasa adalah ≥ 126 mg/dL dan 2 jam setelah beban

atau keadaan kadar gula toleransi yaitu ≥ 200 mg/dL. Maka, hiperglukosa terletak diantara kedua keadaan tersebut yakni puasa 101 – 125 mg/dL *impaired fasting glucose* (IFG) dan 2 jam setelah beban atau keadaan kadar gula toleransi yaitu 140 – 199 mg/dL. Berdasarkan penelitian, risiko *impaired glucose tolerance* (IGT) untuk menjadi diabetes lebih besar dibanding *impaired fasting glucose* (IFG).

Sampai saat ini kriteria diabetes ditetapkan berdasarkan kadar glukosa darah, yang dikaitkan dengan angka kejadian kerusakan pada *end organ*, dalam hal ini retinopati. Untuk puasa, angka tersebut adalah ≥ 126 mg/dL dan untuk post beban adalah ≥ 200 mg/dL karena pada angka tersebut kejadian retinopati mulai meningkat secara tajam. Namun, laporan terakhir mengungkapkan bahwa batas diabetes yang ditetapkan tersebut sebenarnya mungkin sekali lebih rendah dari angka-angka diatas berdasarkan fakta bahwa telah ditemukannya kerusakan *end organ* lebih dini. Atas dasar studi tersebut, label diabetes untuk angka ≥ 126 mg/dL (puasa) dan ≥ 200 mg/dL (setelah beban) tetap digunakan, dan spektrum kadar glukosa darah 100 – 125 (puasa) dan 140 – 199 (post beban) dilabel sebagai prediabetes, dimana komplikasi mikro dan makrovaskuler seperti pada diabetes telah didapatkan dalam tingkat tertentu.

2.1.1 Patogenesis Hiperglukosa

Kejadian Hiperglukosa terjadi akibat tingginya konsumsi gula yang merangsang produksi hepatic trigliserida dengan mempromosikan re-estrikasi dari sirkulasi asam lemak non-esterifikasi (NEFA) dengan merangsang asam lemak *de novo lipogenesis* (DNL). Akibat dari peningkatan pengiriman trigliserida atau asam lemak non-esterifikasi (NEFA) tersebut maka pada sel otot pemanfaatan glukosa

menjadi terganggu, sehingga merusak aksi insulin dan menyebabkan kadar glukosa tinggi yang disebut dengan hiperglukosa (Florensia *et al.*, 2011).

2.1.2 Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus adalah suatu penyakit kronis, yang disebabkan adanya kelainan metabolisme karbohidrat, dimana glukosa darah tidak dapat digunakan dengan baik dan menumpuk dalam pembuluh darah karena pankreas tidak cukup memproduksi insulin untuk metabolisme glukosa darah dan tubuh yang tidak dapat secara efektif menggunakan insulin yang diproduksi tersebut, sehingga menyebabkan keadaan hiperglikemia (Wijaya *et al.*, 2011). Diabetes mellitus ditandai dengan sekumpulan gejala karena gangguan metabolik dengan karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin atau kedua-duanya (Masharani *et al.*, 2004).

Klasifikasi etiologis DM menurut *American Diabetes Association* 2010 (ADA, 2010), dibagi dalam 4 jenis yaitu:

1. Diabetes Melitus Tipe 1 atau *Insulin Dependent Diabetes Mellitus/IDDM*

DM tipe 1 terjadi karena adanya destruksi sel beta pankreas karena sebab autoimun. Pada DM tipe ini terdapat sedikit atau tidak sama sekali sekresi insulin dapat ditentukan dengan level protein c-peptida yang jumlahnya sedikit atau tidak terdeteksi sama sekali. Manifestasi klinik pertama dari penyakit ini adalah ketoasidosis.

2. Diabetes Melitus Tipe 2 atau *Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus/NIDDM*

Pada penderita DM tipe ini terjadi hiperinsulinemia tetapi insulin tidak bisa membawa glukosa masuk ke dalam jaringan karena terjadi resistensi insulin yang

merupakan turunny kemampuan insulin untuk merangsang pengambilan glukosa oleh jaringan perifer dan untuk menghambat produksi glukosa oleh hati. Terjadinya resistensi insulin (reseptor insulin sudah tidak aktif karena dianggap kadarnya masih tinggi dalam darah) akan mengakibatkan terjadinya defisiensi relatif insulin. Hal tersebut yang kemudian dapat mengakibatkan berkurangnya sekresi insulin pada adanya glukosa bersama bahan sekresi insulin lain sehingga sel beta pankreas akan mengalami desensitisasi terhadap adanya glukosa. Adanya resistensi yang terjadi perlahan-lahan akan mengakibatkan sensitivitas reseptor akan glukosa berkurang. DM tipe ini sering terdiagnosis setelah terjadi komplikasi.

3. Diabetes Melitus Tipe Lain

DM tipe ini terjadi karena etiologi lain, misalnya pada defek genetik fungsi sel beta, defek genetik kerja insulin, penyakit eksokrin pankreas, penyakit metabolik endokrin lain, iatrogenik, infeksi virus, penyakit autoimun dan kelainan genetik lain.

4. Diabetes Melitus Gestasional

DM tipe ini terjadi selama masa kehamilan, dimana intoleransi glukosa didapati pertama kali pada masa kehamilan, biasanya pada trimester kedua dan ketiga. DM gestasional berhubungan dengan meningkatnya komplikasi perinatal. Penderita DM gestasional memiliki risiko lebih besar untuk menderita DM yang menetap dalam jangka waktu 5-10 tahun setelah melahirkan.

2.2 Kayu Manis (*Cinnamomum burmanii*)

Klasifikasi tanaman kayu manis menurut (Agustine, 2008) sebagai berikut :

Kingdom : *Plantae* (Tumbuhan)

- Subkingdom : *Tracheobionta* (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi : *Spermatophyta* (Menghasilkan biji)
Divisi : *Magnoliophyta* (Tumbuhan berbunga)
Kelas : *Magnoliopsida* (berkeping dua/ dikotil)
Ordo : *Lurales*
Famili : *Luraceae*
Genus : *Cinnamomum*
Spesies : *Cinnamomum burmanii*



Gambar 2.1 Kayu manis (*Cinnamomum burmanii*)

Kayu manis merupakan rempah-rempah dalam bentuk kulit kayu yang biasa dimanfaatkan masyarakat Indonesia dalam kehidupan sehari-hari. Selain sebagai penambahan cita rasa masakan dan pembuatan kue, sejak dulu ia dikenal punya berbagai khasiat. Tak hanya sampai di situ, kayu manis juga saat ini sudah menjadi bagian dari bahan baku dalam industri jamu dan kecantikan.

2.2.1 Kandungan Kayu manis

Batang kayu manis digunakan sebagai obat anti diare, kejang perut dan untuk mengurangi sekresi pada usus. Buahnya dapat menyembuhkan batuk, sedangkan

kulitnya dapat menyembuhkan sariawan, eksema, encok, tekanan darah tinggi, muntah-muntah dan asma. Untuk pengolahan makanan dan minuman, kayu manis sudah lama dimanfaatkan untuk penambah cita rasa serta aroma.

Tumbuhan ini kulitnya mengandung zat-zat: minyak terbang (*sinanilaldehid*, *feladren*, *terpen-terpen*), lender, pati, *kalsium oksalat*, lemak dan zat samak. Sedangkan akarnya mengandung zat-zat: glisirizin, gula, manit, asparagin, dammar, dan *kalsium oksalat* (Hernani, 2002).

Sifat kimia dari kayu manis ialah hangat, pedas, wangi, dan sedikit manis. Sementara itu, kandungan kimianya antara lain minyak atsiri, *safrole*, *sinamadehid*, *eugenol*, *tanin*, dammar, *kalsium oksalat*, dan zat penyamak (Priyo, 2012). Serta salah satu kandungan senyawanya yaitu *Methyl Hydroxyl Chalcone Polymer* (MHCP) yang berdasarkan penelitian mampu mencegah dan meringankan gejala penyakit diabetes. Selain mengandung *Methyl Hydroxyl Chalcone Polymer* (MHCP) kayu manis juga berperan sebagai anti-inflamasi yang digunakan sebagai penghambat peningkatan kadar gen-gen proinflamasi yang berperan dalam peradangan (Khan, 2003).

Tabel 2.1 Kandungan pada Kayu Manis (Wangsa, 2005)

Air	95 g
Energy	261.3 kkal
Karbohidrat	79.8 g
Protein	3.9 g
Lemak	3.2 g
Vitamin C	26.5 mg
Thiamin (B1)	0.1 mg
Riboflavin (B2)	0.1 mg
Vitamin B6	0.3 mg
Folat	29.0 mcg
Vitamin B12	0.0 mcg
Vitamin E	0.0 mcg
Polifenol	131.24 mg

2.2.2 Mekanisme *Methyl Hydroxyl Chalcone Polymer* (MHCP) yang terkandung dalam Kayu Manis

Methyl Hydroxyl Chalcone Polymer (MHCP) terkandung dalam kayu manis (Mang *et al.*, 2006; Ping *et al.*, 2010). Mekanisme yang dipengaruhi oleh *Methyl Hydroxyl Chalcone Polymer* (MHCP) pada diabetes melingkupi fosforilasi reseptor insulin, *glucose uptake*, sintesis glikogen. Analisis pada insulin reseptor menggambarkan bahwa reseptor tersebut terfosforilasi sejak terpapar oleh *Methyl Hydroxyl Chalcone Polymer* (MHCP) (Jarvill, 2001).

Pada fosforilasi reseptor insulin, *Methyl Hydroxyl Chalcone Polymer* (MHCP) mampu mengaktifasi kinase yang menghasilkan autofosforilasi pada reseptor (Jarvill, et al., 2001). Pada penelitian yang dilakukan oleh Jarvill (2001) *Methyl Hydroxyl Chalcone Polymer* (MHCP) mampu untuk *uptake* glukosa pada jaringan adiposit dan hal tersebut dapat menyebabkan terjadi fase *lag* pada jaringan seluler terhadap MHCP. Dan juga hal tersebut dapat terus menerus terjadi selama 60 menit pertama setelah perlakuan (Jarvill, 2001).

Adiposit dapat berkaitan erat dengan produksi glikogen setelah pemberian *Methyl Hydroxyl Chalcone Polymer* (MHCP) seperti halnya dengan *uptake* glukosa. Inhibisi pada *glycogen synthesis phosphatase* GTP-3, PTP-1 dan aktifitas potensial fosfatase yang lain akan menggambarkan regulasi dari signal *Methyl Hydroxyl Chalcone Polymer* (MHCP) yang meniru sifat dari insulin dan akan mengakibatkan stimulasi produksi glikogen (Jarvill, 2001).

Para peneliti di US Departement of Human Research Pusat Pertanian di Beltsville, Maryland, pernah mempelajari efek berbagai zat makanan termasuk pada kayu manis terhadap gula darah. Dalam penelitiannya, para ahli menemukan bahwa air larut senyawa yang disebut polifenol *Methyl Hydroxyl Chalcone Polymer* (MHCP) yang berlimpah dalam kayu manis bertindak sinergis dengan insulin dan membantu dalam pemanfaatan yang lebih baik dari insulin. Karena itu kayu manis pun direkomendasikan mampu mengendalikan diabetes.

Penelitian lainnya juga pernah dilakukan Dr. Joanna Hlebowicz dkk, 2007 di Amerika. Penemuan yang dipublikasikan dalam “*The American Journal of Clinical Nutrition*” disebutkan bahwa batang kulit kayu manis memiliki kandungan insulin

yang akan melancarkan proses metabolisme glukosa, sehingga kadar gula darah bisa ditekan mendekati normal.

Methyl Hydroxyl Chalcone Polymer (MHCP) yang mempunyai efek tiruan sebagai insulin dapat mencegah terjadinya resistensi insulin. Sehingga mampu mencegah peningkatan asam lemak bebas yang dapat menyebabkan penumpukan trigliserida di dalam hati (Muzasti, 2011). *Methyl Hydroxyl Chalcone Polymer* (MHCP) mampu menstimulasi reseptor insulin kinase, terhadap proses autofosforilasi pada reseptor insulin substrat 1. Hal ini menyebabkan *Methyl Hydroxyl Chalcone Polymer* (MHCP) juga dapat meningkatkan pengikatan glukosa di jaringan adipose. *Methyl Hydroxyl Chalcone Polymer* (MHCP) juga dapat meningkatkan pembentukan glikogen dalam tubuh (Antony *et al.*, 2007).

2.3 Bunga Bungur (*Lagerstroemia speciosa*)

Bungur (*Lagerstroemia speciosa*) merupakan tanaman yang banyak tumbuh di Negara Filipina, India, dan Asia Tenggara. Tanaman bungur sering dimanfaatkan secara tradisional di Filipina sebagai obat yang dapat mencegah maupun mengobati diabetes (Vijaykumar, 2006). Bungur merupakan pohon yang tingginya mencapai 5-25 m, memiliki akar tunjang, berkayu dan berwarna coklat kehitaman. Daun bungur berwarna hijau tua, berbentuk oval, kaku dengan panjang 9-28 cm dan memiliki lebar 4-12 cm. Bungur memiliki bunga yang berbentuk malai dengan panjang mencapai 40 cm berwarna ungu. Pohon ini memiliki buah dengan bentuk bola sampai bulat memanjang, berdiameter 1-1,5 cm, panjang 2-3,5 cm, berwarna hijau muda dan setelah masak berwarna coklat (Astiti, 2005).

Tanaman bungur (*Lagerstroemia speciosa*) dalam ilmu Botani diklasifikasikan sebagai berikut :

- Kingdom : *Plantae* (Tumbuhan)
Subkingdom : *Tracheobionta* (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi : *Spermatophyta* (Menghasilkan biji)
Divisi : *Magnoliophyta* (Tumbuha berbunga)
Kelas : *Magnoliopsida* (Berkeping dua/ dikotil)
Sub kelas : *Rosidae*
Ordo : *Myrtales*
Famili : *Lythraceae*
Genus : *Lagerstroemia*
Spesies : *Lagerstoemia speciosa* Pers. (Steven, 2001).



Gambar 2.2 Bunga Bungur (*Lagerstroemia speciosa*)

2.3.1 Kandungan Bunga Bungur

Kemampuan bunga bungur dalam menurunkan kadar glukosa darah tikus yang mengalami diabetik berkaitan dengan aktifitas biologis senyawa yang terkandung di dalam bunga bungur. Senyawa aktif yang dapat menurunkan kadar

glukosa darah tikus kemungkinan ada tiga kelompok yaitu, alkaloid, saponin, flavonoid.

Liu *et al* (2001) berhasil menunjukkan secara *in vitro* bahwa senyawa aktif bunga bungur mampu meningkatkan kecepatan transport glukosa, namun belum diketahui senyawanya. Hal ini kemudian dibuktikan oleh Hayashi *et al* (2002) dengan mengisolasi senyawa aktif tersebut. Setelah diteliti, ternyata diketahui senyawa aktif dalam bunga bungur tidak termasuk dalam ketiga kelompok senyawa diatas, namun masuk dalam kelompok polifenol, yaitu ellagitanin. Ellagitanin tersebut, yaitu *lagerstroemia* dan flosin B, dan reginin A memiliki sifat yang mirip dengan hormone insulin (*insulin-like compound*). Secara *in vitro*, tiga senyawa tersebut mampu meningkatkan aktifitas transport glukosa ke sel dalam sel adipose. Kemampuan *lagerstroemia* dan flosin B hampir setengah kali kemampuan insulin dalam meningkatkan kecepatan transport glukosa. Bahkan, reginin A memiliki kemampuan yang hampir sama dengan insulin (Hayashi *et al.*, 2002).

Selain senyawa ellagitanin, senyawa yang terkandung dalam bunga bungur adalah asam korosolat. Asam korosolat merupakan senyawa triterpenoid yang juga memiliki kemampuan meningkatkan transport glukosa ke dalam sel. Asam korosolat atau memiliki nama lain *2alpha-hydroxyursolic acid*, juga dapat bertindak sebagai antioksidan yang mampu melindungi sel dan menangkal radikal bebas (Vijaykumar, 2006).

2.4 Glukosa

Glukosa suatu gula monosakarida yang merupakan salah satu karbohidrat terpenting yang digunakan sebagai sumber tenaga utama dalam tubuh (Murray *et al.*,

2003). Glukosa adalah monosakarida yang paling penting, dimana sel hidup menggunakan komponen ini sebagai sumber energi (Harison, 2008). Glukosa menjadi salah satu hasil dari proses fotosintesis pada tumbuhan hijau. Glukosa menjadi komponen utama yang membentuk pati, yaitu suatu unit polisakarida dalam gandum, beras, kentang, dan sagu, yang pada umumnya menjadi bahan makanan pokok di berbagai belahan dunia (Sunita, 2001).

2.4.1 Metabolisme glukosa

Semua sel dengan tiada hentinya mendapat glukosa, tubuh mempertahankan kadar glukosa dalam darah yang konstan, yaitu sekitar 80-100 mg/dL bagi dewasa dan 80-90 mg/dL bagi anak, walaupun pasokan makanan dan kebutuhan jaringan berubah-ubah sewaktu kita tidur, makan, dan bekerja (Cranmer and Shannon, 2009).

Proses ini disebut homeostasis glukosa. Kadar glukosa yang rendah, yaitu hipoglikemia dicegah dengan pelepasan glukosa dari simpanan glikogen hati yang besar melalui jalur glikogenolisis dan sintesis glukosa dari laktat, gliserol, dan asam amino di hati melalui jalur glukoneogenesis dan melalui pelepasan asam lemak dari simpanan jaringan adiposa apabila pasokan glukosa tidak mencukupi. Kadar glukosa darah yang tinggi yaitu hiperglikemia dicegah oleh perubahan glukosa menjadi glikogen dan perubahan glukosa menjadi triasilgliserol di jaringan adiposa. Keseimbangan antar jaringan dalam menggunakan dan menyimpan glukosa selama puasa dan makan terutama dilakukan melalui kerja hormon homeostasis metabolik yaitu insulin dan glukagon (Ferry, 2008).

2.4.2 Metabolisme glukosa di jaringan adiposa

Insulin merangsang penyaluran glukosa ke dalam sel-sel adiposa. Glukosa dioksidasi menjadi energi oleh adiposit. Selain itu, glukosa digunakan sebagai sumber untuk membentuk gugus gliserol pada triasilgliserol yang disimpan di jaringan adiposa (Bell, 2001).

2.5 Fruktosa

Fruktosa merupakan mono-sakarida, terdiri atas 6 atom karbon (heksosa) yang merupakan isomer glukosa ($C_6H_{12}O_6$) dan mengandung gugus karbonil sebagai keton. Fruktosa dikonsumsi dalam bentuk sukrosa dan jarang dalam bentuk bebas. Di dalam usus, sukrosa dihidrolisis oleh enzim sukrase menjadi fruktosa dan glukosa. Setelah diabsorpsi oleh usus, fruktosa diangkut melalui vena porta menuju hepar untuk dimetabolisme menjadi lipid (Sijani, 2012).

2.5.1 Metabolisme Fruktosa dalam menginduksi resistensi insulin

Penelitian terhadap hewan coba dan jangka pendek pada manusia menunjukkan bahwa asupan tinggi fruktosa berkontribusi terhadap kegagalan toleransi glukosa, resistensi insulin dan hiperinsulinemia. Fruktosa menginduksi resistensi insulin melalui dua mekanisme yaitu melalui pembentukan asam urat dan *de novo lipogenesis* (DNL). Fruktosa mengalami fosforilasi oleh enzim *Ketohexokinase* (KHK) yang menghabiskan ATP sehingga dibentuk asam urat menimbulkan efek sistemik dengan menurunkan nitrit oksida (NO) sehingga terjadi vasokonstriksi dan penurunan serapan glukosa oleh otot skeletal. Selain efek sistemik, asam urat juga menimbulkan efek seluler terhadap sel adiposit melalui peningkatan stres oksidatif dan penurunan adinopektin sehingga terjadi penurunan oksidasi lipid

hepatik. Akibat efek sistemik dan efek seluler asam urat tersebut memicu timbulnya resistensi insulin. Fruktosa juga menginduksi DNL dengan menyediakan atom karbon (gliserol-3fosfat dan asil-KoA) yang diubah menjadi monoasilgliserol dan diasilgliserol (DAG). Selanjutnya DAG diubah menjadi trigliserida dan *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) yang mengakibatkan resistensi insulin.

Hasil berbagai penelitian menunjukkan pemberian fruktosa pada tikus juga dapat menyebabkan berbagai kelainan yang berhubungan dengan sindrom metabolik seperti disfungsi endotel, stres oksidatif, aktivasi sistem nervus simpatik, aktivasi sistem renin angiotensin, inflamasi sistemik, *fatty liver*, peningkatan akumulasi lemak intra abdominal, resistensi leptin, proteinuria, kelebihan berat badan, dan kegagalan toleransi glukosa (Sijani, 2012).

2.6 Perbedaan Glukosa dan Fruktosa

Fruktosa dan glukosa merupakan gula utama dalam diet karbohidrat manusia. Fruktosa diabsorpsi oleh intestinum melalui mekanisme yang berbeda dengan glukosa. Perbedaan antara fruktosa dan glukosa adalah kecepatan absorpsi fruktosa lebih lambat, tidak seperti glukosa, fruktosa tidak menstimulasi pelepasan insulin, fruktosa ditranspor ke dalam sel melalui transporter yang berbeda dengan glukosa, setelah sampai di hepar, fruktosa diubah menjadi gliserol, dan pembentukan lipid, sedangkan glukosa disimpan dalam bentuk glikogen, sebagian individu tidak dapat mengabsorpsi fruktosa secara sempurna jika diberikan dosis tinggi fruktosa sekitar 50g, konsumsi fruktosa dan glukosa pada saat yang sama meningkatkan absorpsi fruktosa (Sijani, 2012).

2.7 *Rattus norvegicus*

Hewan model hiperglukosa adalah hewan laboratorium yang dalam hal tertentu secara natural maupun artificial memiliki respon, serta mempunyai pathogenesis ataupun patofisiologis yang sebagian atau seluruhnya mirip dengan hiperglukosa pada manusia dan hewan (Widyastuti, 2000). Penggunaan hewan model dalam penelitian ini dapat menggunakan *Rattus norvegicus* strain Wistar yang memiliki klasifikasi sebagai berikut (David, 2000).



Kingdom	: Animal
Filum	: <i>Chordata</i>
Subfilum	: Vertebrata (Craniata)
Kelas	: Mamalia
Subkelas	: <i>Theria</i>
Infrakelas	: <i>Eutharia</i>
Ordo	: <i>Rodentia</i>
Subordo	: <i>Myomorpha</i>
Superfamili	: <i>Murinadea</i>
Famili	: <i>Murinae</i>
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i> strain Wistar

Pembuatan hewan model Hiperglukosa dengan menggunakan campuran glukosa 10% dan fruktosa 15% dari jumlah pakan perhari yang akan dicampurkan pada pakan yang akan diberikan selama 14 hari berturut-turut (Florensia *et al.*, 2011).

Penelitian terhadap hewan coba dan jangka pendek pada manusia menunjukkan

bahwa asupan tinggi glukosa dan fruktosa berkontribusi terhadap kegagalan toleransi glukosa, resistensi insulin dan hiperinsulinemia (Sijani, 2012).

2.8 Nuclear Factor Kappa Beta (NF- κ B)

2.8.1 Definisi

Nuclear Factor Kappa Beta (NF- κ B) adalah golongan protein yang berperan dalam faktor transkripsi yang ditemukan di semua tipe sel. NF- κ B juga terlibat dalam respon segera pada berbagai stimulus, seperti infeksi virus dan bakteri, stress oksidan dan lain-lain. Pada sebagian besar pengaktifan NF- κ B akan mengawali regulasi terekspresinya sejumlah gen yang mengkode sitokin, *growth factor*, molekul imun, gen yang berhubungan dengan apoptosis dan lainnya (Putra, 2012).

Terdapat 5 sub unit produk gen yang berpartisipasi dalam fungsi NF- κ B : RelA/p65, cRel, RelB, p50 (dan prekusornya p105) dan p52 (dan prekusornya p100). NF- κ B ini terdiri atas homo-ata hetero-dimer dimana spesies predominannya berada di semua tipe sel, seperti sel β adalah heterodimer p65-p50.

Pada sel yang tidak teraktivasi, NF- κ B berada di sitoplasma dalam bentuk tidak aktif yang tidak berikatan dengan DNA, yang berasosiasi dengan protein *inhibitor* κ B (IkBs). IkB terdiri atas IkB α , IkB γ , IkB ϵ , Bcl-3, precursor p100 dan p105. Pada saat NF- κ B terstimulasi, protein IkB secara cepat difosforilasi oleh kompleks IkB kinase (IKK) yang menuju protein *inhibitor* untuk *ubiquitination* dan selanjutnya akan didegenerasi oleh jalur *ubiquitin-proteasome*. IKK terdiri atas dua subunit katalitik, IKK α dan IKK β , serta subunit *modifier* esensial NF- κ B atau biasa disebut IKK γ . Pelepasan dimer NF- κ B akan translokasi ke nucleus dan menyebabkan ekspresi berbagai macam gen (Santangelo *et al.*, 2007).

2.8.2 Jalur NF- κ B

Jalur NF- κ B digolongkan menjadi 2 jalur utama yaitu klasik (*canonical*) dan jalur alternatif (*non canonical*). Pada jalur klasik, sub unit utama yang berperan adalah Rel-A yang dapat membentuk dimer dengan p50 maupun p52. Jalur ini diaktivasi sangat cepat dan merupakan respon akut dari berbagai sinyal. Jalur ini diaktivasi oleh IKK α /IKK β yang akan memfosforilasi I κ B sehingga NF- κ B akan terlepas dari ikatannya dengan I κ B. IKK α /IKK β sendiri akan diaktivasi akibat fosforilasi dan ubiquitinasi dari NEMO (IKK γ) yang mengikat dimer IKK tersebut. Sedangkan jalur alternatif melibatkan peran utama dari Rel-B dan p52. Aktivasi jalur ini memerlukan waktu yang lama karena p52 tersedia dalam bentuk prekursornya (p100) sehingga diperlukan proses transformasi p100 menjadi p52. Aktivasi jalur ini hanya melibatkan peran IKK α saja yang sebelumnya diaktivasi oleh NIK (Oeckinghaus and Ghosh, 2009; Sandip, 2009).

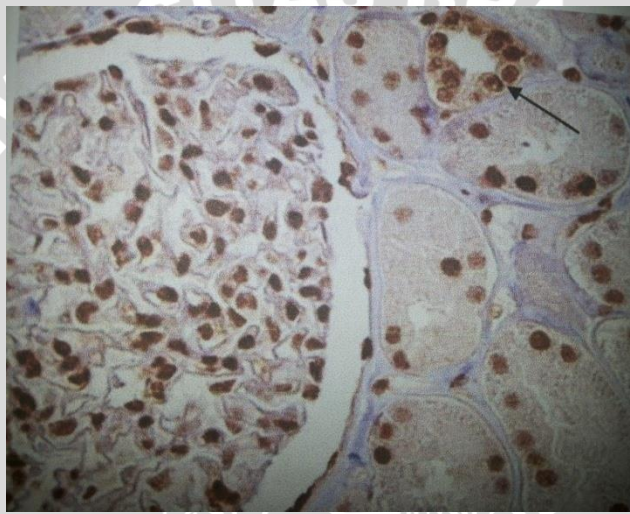
Jalur kanonik disebabkan oleh TNF- α , IL-1, atau LPS dan menggunakan berbagai macam sinyal adapter untuk terlibat aktivitas IKK. Fosforilasi residu sering di wilayah sinyal spesifik (SRR) dari I κ Bs klasik oleh IKK β , mengarahkan untuk *ubiquitination* I κ B dan degradasi proteosomal berikutnya. Hal ini menyebabkan pelepasan dari NF- κ B dimer, yang kemudian dapat mentranslokasi ke inti dan menginduksi transkripsi gen target. Jalur non-kanonik terganggu pada NIK (NF- κ B – inducing kinase) aktivasi diinduksi dari IKK α . IKK *aphosphorylates* yang p100 NF- κ B subunit, yang mengarah ke pengolahan proteosomal dari p100 ke p52. Hal ini menyebabkan aktivasi dari p52-RelB dimer, yang menargetkan elemen specific κ B (Oeckinghaus and Ghosh, 2009; Sandip, 2009).

2.9 TNF- α

Tumor Necrosis Factor- α dibentuk atas 212 asam amino diatur pada homotrimer yang stabil dengan berat molekul 51 kDa. TNF- α adalah suatu sitokin yang bersifat pleiotropik, yang sebagian besar dihasilkan oleh sel-sel hematopoietic dan sel intrinsik ginjal, termasuk sel mesangial, glomerulus, endotel, dendrit, sel tubulus ginjal menghasilkan sitokin ini. Penelitian pada saat ini memperlihatkan bahwa, TNF- α dapat disimpan didalam sel dalam bentuk proaktif, dan enzim yang dapat merubah TNF- α secara cepat dapat meningkatkan ekspresi TNF- α yang aktif. Meningkatnya ekspresi TNF- α terdapat pada keadaan inflamasi akut dan kronik (Popa *et al.*, 2007).

Menurut Green and Flavell (2000) penyebab teraktivasi TNF- α adalah faktor-faktor eksogen dan endogen. Faktor eksogen merupakan antigen atau benda asing yang berasal dari luar tubuh seperti enterotoksin, protein dinding sel jamur, virus dan komponen dari parasit. TNF- α merupakan sitokin yang memiliki peranan yang besar dalam aktivasi sistem imun dibandingkan dengan sitokin lainnya. TNF- α memiliki peranan penting dalam mendukung proses kemotoksis sel-sel inflamasi, mengaktifasi sel-sel inflamasi baik TNF- α sendiri maupun sitokin lain, merangsang sel-sel endotel untuk meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I dan mendukung fungsi sel T-cytotoxic. Efek yang ditimbulkan oleh TNF- α diantaranya adalah inisiator neutrofil dan monosit ke tempat-tempat infeksi, menginisiasi ekspresi molekul adhesi sel, menginduksi apoptosis sel-sel inflamasi (Cohen and Bonta, 2004).

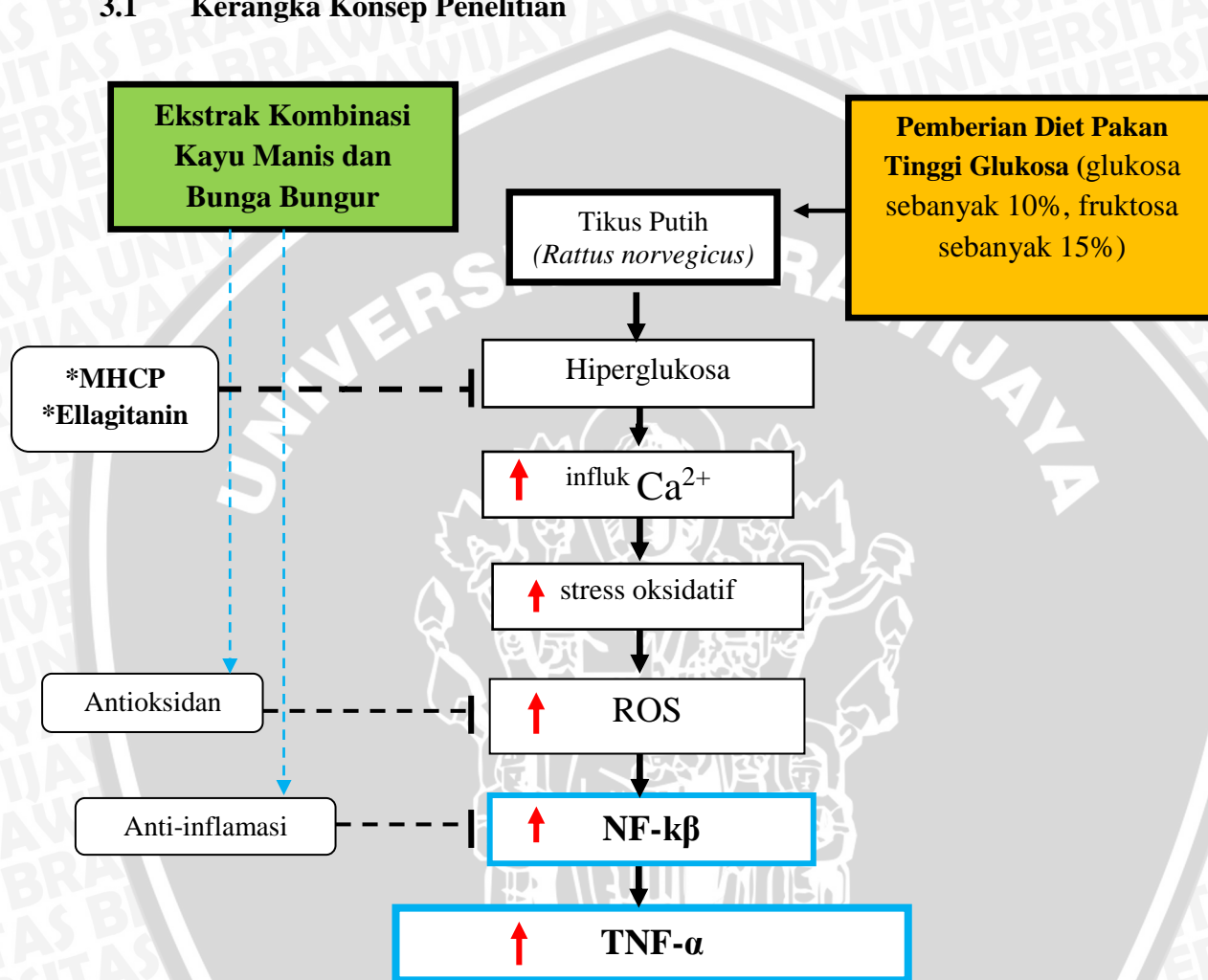
Keberadaan TNF- α pada jaringan ginjal dapat menjadi indikasi kondisi patologi jaringan yang dapat digambarkan melalui metode imunohistokimia. Proses inflamasi didalam sel akan menyebabkan teraktivasinya makrofag yang akan memproduksi sitokin proinflamasi, salah satunya TNF- α . Keberadaan TNF- α ini menjadi sangat penting sebagai parameter kerusakan ginjal (Gambar 2.3).



Gambar 2.3 Ekspresi TNF- α pada tubulus ginjal pada tikus hiperglukosa (tanda panah hitam); Perbesaran 400x; Pewarnaan IHK (Imunohistokimia) (Lamki, 2001).

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :

- ↓ : Patomekanisme --▶ : Terapi ■ : Variabel Bebas
- ↑ : Peningkatan - - | : Menghambat □ : Variabel Tergantung
- : Hewan coba * : Kandungan ekstrak ■ : Paparan

Pemberian sejumlah pakan tambahan glukosa dan fruktosa pada pakan hewan coba merangsang produksi hepatic trigliserida dengan mempromosikan reesterifikasi dari sirkulasi asam lemak non-esterifikasi (NEFA) dengan merangsang sintesis *de novo lipogenesis* (DNL). Peningkatan pengiriman trigliserida atau asam lemak non-esterifikasi (NEFA) mengganggu pemanfaatan glukosa sehingga merusak aksi insulin dan menyebabkan tingginya kadar glukosa darah yang disebut dengan hiperglukosa (Florensia *et al.*, 2011).

Keadaan hiperglukosa menyebabkan masuknya kalsium secara berlebihan, juga mengakibatkan peningkatan kecepatan aktivitas metabolisme mitokondria, sehingga kebutuhan asupan kalsium dan oksigen akan semakin meningkat dan selanjutnya akan menimbulkan radikal bebas yang menyebabkan munculnya stress oksidatif. Ketidakseimbangan radikal bebas memicu peningkatan reaksi reduksi dan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) di mitokondria (Liu *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Turrens, 2003).

Reactive Oxygen Species (ROS) menstimulasi aktivasi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- κ B). Peningkatan NF- κ B berhubungan dengan peningkatan ekspresi gen *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) dan infiltrasi makrofag pada jaringan ginjal dengan memproduksi ekspresi gen-gen proinflamasi seperti TNF- α , IL-1 β , IL-6, sehingga akan menimbulkan inflamasi kronik yang menjadi kejadian terminal komplikasi vaskuler (Gross, 2005).

Kandungan kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciosa* L) yang diperkirakan memiliki peran aktif dalam penelitian ini adalah polifenol *Methyl Hydroxyl Chalcone Polymer* (MHCP) dan

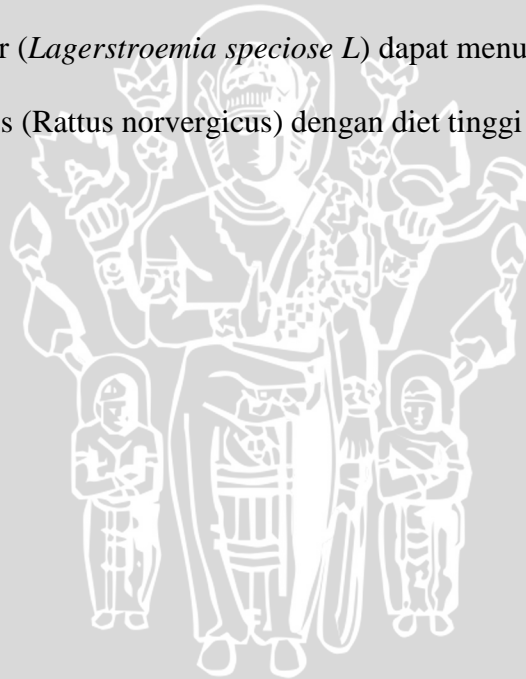
senyawa ellagitanin. MHCP mempunyai efek yaitu mampu mencegah peningkatan asam lemak bebas yang dapat menyebabkan penumpukan trigliserida yang menyebabkan hiperglukosa, sedangkan senyawa ellagitanin memiliki sifat yang mirip dengan hormon insulin (*insulin-like compound*). Secara *in vitro*, senyawa tersebut mampu meningkatkan aktifitas transport glukosa ke sel dalam sel adipose juga sebagai antioksidan yang dapat menekan kerusakan oksidatif akibat radikal bebas dan menurunkan kadar enzim *xanthine oksidase* yang berlebihan. Enzim *xanthine oksidase* ini berperan dalam pembentukan ROS (Nugroho,2006). Penurunan enzim *xanthine oksidase* akan menurunkan ROS sehingga menghambat kerusakan sel beta pankreas dan sintesis serta sekresi insulin akan meningkat. Kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciosa* L) sebagai anti-inflamasi dapat menghambat ekspresi gen-gen proinflamasi seperti TNF- α , IL-6, IL-1 β yang berperan dalam peradangan dengan menghambat enzim siklooksigenase-1 (COX-1) dan siklooksigenase-2 (COX-2) yang akan menurunkan tingkat kerusakan sel- β pankreas dan epitel tubulus ginjal. Enzim ini memiliki peran penting dalam menjaga homeostasis jaringan tubuh khususnya pankreas, ginjal, saluran cerna dan trombosit.

Pemberian ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciosa* L) pada tikus dengan diet tinggi glukosa akan menurunkan ekspresi NF-k β dan TNF- α dengan menghambat ekspresi gen-gen proinflamasi dengan menekan kerusakan oksidatif akibat radikal bebas dan menurunkan kadar enzim *xanthine oksidase* yang berlebihan yang berperan dalam pembentukan ROS.

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian pada penelitian Hiperglukosa dengan pemberian ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciose L*) ini adalah :

1. Pemberian ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciose L*) dapat menurunkan ekspresi NF- κ β pada ginjal tikus (*Rattus norvergicus*) dengan diet tinggi glukosa.
2. Pemberian ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciose L*) dapat menurunkan ekspresi TNF- α pada ginjal tikus (*Rattus norvergicus*) dengan diet tinggi glukosa.



BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan April 2016 sampai dengan Juni 2016 di Laboratorium Farmakologi FK-UB, Laboratorium Patologi Anatomi FK-UB, Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, kandang tikus, alat sonde, scalpel, gunting, timbangan, pinset, pot specimen, tabung endorff, beaker glass, oven, object glass, kapas, mikroskop, mikropipet, yellow tip, GlucoDr™, cawan petri, Erlenmeyer, dan sentrifugator.

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam percobaan ini adalah hewan coba berupa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar (umur 8-12 minggu, berat badan sekitar 150-200 gram) diperoleh dari Peternakan Tikus Milik Bapak Purnomo Sumbersekar-Dau, yang mendapat pakan standart dan campuran glukosa 10% dan fruktosa 15%, ekstrak kombinasi kayu manis dan bunga bungur, *cover glass*, *object glass*, alkohol 70%, alkohol 90%, alkohol 95%, alkohol absolut, akuades, PBS pH 7.4, antibodi monoclonal anti-p65, antibodi sekunder (*conjugated to horse radish peroxidase*), antibodi primer *Rat anti TNF- α* , antibodi sekunder berlabel biotin (*Goat Anti Rat biotin labeled*), *Navocastra Peroxidase Block*, *Navocastra Post Primari*,

Counterstain (*mayer hematoxylen*), *Strep avidin-Horseradish Peroxidase* (SA-HRP) dan *entellan, kromogen DAB (Diaminobenzinidine)*.

4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan sebagai berikut :

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba.
2. Aklimatisasi hewan coba (*Rattus norvergicus*).
3. Pembuatan Tikus dengan pakan diet tinggi glukosa (*Lampiran 7*).
4. Perhitungan Ekstrak Kayu Manis dan Bunga Bungur.
5. Pemberian Ekstrak Kayu Manis dan Bunga Bungur.
6. Isolasi organ ginjal.
7. Uji Imunohistokimia.
8. Pengamatan ekspresi NF- κ B.
9. Pengamatan ekspresi TNF- α .
10. Analisis data.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Sampel penelitian menggunakan tikus jantan strain wistar berumur 8-12 minggu dengan berat 150-200 gram. Perkiraan besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusningrum, 2010) :

$t(n-1) \geq 15$	Keterangan :
$5(n-1) \geq 15$	t = jumlah kelompok (terdiri dari 5
$5n-5 \geq 15$	macam perlakuan)
$5n \geq 20$	n = jumlah ulangan yang diperlukan
$n \geq 4$	

Berdasarkan perhitungan diatas maka untuk lima kelompok hewan coba diperlukan jumlah ulangan paling sedikit empat kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba. Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif yang diberikan diet standart (A), kelompok kontrol positif yang diberikan diet tinggi glukosa dan fruktosa (B), kelompok dosis yang diberikan diet tinggi glukosa dan fruktosa dan ekstrak 4,5 mg/kg BB (C), kelompok dosis yang diberikan diet tinggi glukosa dan fruktosa dan ekstrak 9 mg/kg BB (D), kelompok dosis yang diberikan diet tinggi glukosa dan fruktosa dan ekstrak 18 mg/kg BB (E) (Lampiran 5). (Tabel 4.1)

Tabel 4.1 Rancangan Kelompok Penelitian

Kelompok	Ekspresi NF- κ B dan TNF- α			
	1	2	3	4
Kelompok kontrol negatif (A)				
Kelompok kontrol positif (B)				
Kelompok terapi 4,5 mg/kg BB (C)				
Kelompok terapi 9 mg/kg BB (D)				
Kelompok terapi 18 mg/kg BB (E)				

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Glukosa dan fruktosa dan ekstrak kombinasi kayu manis dan bunga bungur

Variabel tergantung : Ekspresi NF- κ B dan TNF- α

Variabel kendali : Tikus putih (*Rattus norvegicus*), kandang, pakan dan minuman tikus.

4.4.2 Pembuatan dan Penentuan Dosis Ekstrak Kombinasi Kayu Manis dan Bunga Bungur

Ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciosa* L) yang diperoleh dari Dexa Medika Laboratorium (Florensia *et al.*, 2011) yang di ekstraksi dengan metode berikut: disiapkan sebagai ekstrak polar dimana setiap bahan dikeringkan dan di campurkan yang kemudian di ekstraksi secara bersamaan dalam pelarut polar menggunakan teknik perkolasi pada suhu 50-90°C. Ekstrak yang dihasilkan dari percampuran awal kemudian dikeringkan dengan menggunakan rotavapor dengan suhu 40-50°C dan kemudian dilarutkan dalam metanol untuk dilanjutkan ketahap selanjutnya. Ekstrak dari kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciosa* L) diidentifikasi menggunakan metode *Thin Layer Chromatography* (TLC). Ini dapat dilihat dari 60 F₂₅₄ piring silica gel dan dielusi menggunakan campuran *eluen 1-butanol*, asam asetat, air, kloroform, aseton, dan format asam dengan ratio 10: 4: 4: 70: 25: 15. *Eluen* dibiarkan bergerak sepanjang lempeng TLC dengan jarak 8 cm. Pengamatan dilakukan dibawah sinar UV pada 254 dan 366 nm sebelum dan setelah proses derivatisasi menggunakan asam lemah. Di kromatogram dihasilkan

dari TLC, dapat diamati bahwa komponen dari ekstrak telah terekstraksi dengan baik. Setelah proses derivatisasi diamati di bawah sinar UV pada 366 nm, menunjukkan bahwa ekstrak mengandung konsentrasi dari *Cinnamomum burmanii* sebanyak Rf 0,6 dan Rf 0,3 dari *Lagerstroemia speciosa* (Florensia *et al.*, 2011).

Penentuan dosis ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciosa*) adalah 4,5 mg/kg BB, 9 mg/kg BB, 18 mg/kg BB selama 2 minggu (*Lampiran 6*) (Florensia *et al.*, 2011).

4.4.3 Pemberian Ekstrak Kombinasi Kayu Manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan Bunga Bungur (*Lagerstroemia speciose L*)

Persiapan hewan coba dimulai dengan diaklimatisasi hewan coba selama 14 hari di laboratorium. Pemberian pakan selama masa adaptasi berupa pakan standar sesuai kebutuhan yaitu 40 gram/ekor/hari dan air minum diberikan secara *ad libitum*. Hewan coba sebanyak 20 ekor dibagi dalam 5 kelompok perlakuan secara acak. Setiap kelompok hewan coba terdiri dari masing-masing 4 ekor hewan coba. Tikus dikandangkan sesuai kelompok perlakuan dan dipelihara pada ruang bersuhu 26-27°C. Pemberian diet tinggi glukosa dan fruktosa diberikan selama 14 hari dengan perhitungan glukosa sebanyak 10% dan fruktosa sebanyak 15% dari jumlah pakan tikus per ekor per hari, atau sekitar 4 gram untuk glukosa dan 6 gram untuk fruktosa per 40 gram pakan standart perawatan. Kemudian pemberian terapi ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciose L*) secara peroral melalui sonde lambung dengan dosis 4,5 mg, 9 mg, 18 mg/kg BB selama 14 hari setelah 14 hari dilakukan diet tinggi glukosa. Selama

pemberian terapi dilakukan pengukuran kadar glukosa darah puasa pada semua kelompok perlakuan.

4.4.4 Isolasi Organ Ginjal

Isolasi ginjal (*Lampiran 3*) dilakukan pada kelompok kontrol positif, kontrol negatif, dan kelompok terapi pada minggu ke-4 setelah pemberian ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciosa* L). Langkah awal yang dilakukan yaitu dieutanasi dengan cara dislokasi leher, kemudian dilakukan pembedahan. Pembedahan dan pengambilan organ ginjal dilakukan pada bagian dorsal dari rongga abdominal. Organ ginjal lalu dibilas pada cawan petri dengan NaCl fisiologis 0.9 % dan direndam dengan larutan *Paraformaldehyde Acid* 4%.

4.4.5 Pemeriksaan Ekspresi NF- κ B Secara Imunohistokimia

Lakukan deparafinasi preparat (blok parafin) dengan *xylene* sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit. Kemudian rehidrasi preparat dengan menggunakan alkohol 100%, alkohol 95% dan alkohol 70% masing-masing selama dua menit, dua menit, satu menit dan terakhir dengan air selama satu menit. Tetesi PBS pada slide dan ditunggu selama 5 menit dan keringkan secara perlahan menggunakan *tissue*. Teteskan *Navocastra Peroxidase Block* sampai menutupi organ pada setiap slide dan ditunggu selama 20 menit kemudian dibuang. Kemudian teteskan PBS kembali sampai pengulangan 3 kali selama 5 menit. Rendam preparat didalam antibodi *monoclonal anti-p65* selama 24 jam dan teteskan preparat dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali pengulangan. Kemudian ditetesi *Navocastra Post Primer* pada

setiap slide dan dibiarkan selama 1 jam, dilanjutkan dengan PBS sebanyak 3 kali selama 5 menit, pembuangan post primer bersamaan dengan pembilasan pertama. Preparat ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radish Peroxidase*) selama 40 menit dengan suhu ruang. Kemudian dicuci kembali dengan PBS dan dibilas dengan steril water. Kemudian slide ditetesi dengan kromogen DAB (*Diaminobenzinidine*) selama 10-20 menit, setelah itu dicuci kembali dengan PBS pH 7.4 selama 5 menit 3 kali. Selanjutnya *counterstaining* menggunakan Hematoxylen selama 5 menit. Dicuci *mounting, entellan*, dan ditutup dengan coverglass. Hasil diamati dengan mikroskop (Ramos, 2005).

4.4.6 Pemeriksaan Ekspresi TNF- α Secara Imunohistokimia

Langkah-langkah dalam metode pewarnaan imunohistokimia yaitu dengan pembuatan preparat dapat dilihat pada (*Lampiran 4*). Lakukan deparafinasi preparat (blok parafin) dengan *xylene* sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit. Kemudian rehidrasi preparat dengan menggunakan alkohol 100%, alkohol 95% dan alkohol 70% masing-masing selama dua menit, dua menit, satu menit dan terakhir dengan air selama satu menit. Tetesi PBS pada slide dan ditunggu selama 5 menit dan keringkan secara perlahan menggunakan *tissue*. Teteskan *Navocstra Peroxidase Block* sampai menutupi organ pada setiap slide dan ditunggu selama 20 menit kemudian dibuang. Kemudian teteskan PBS kembali sampai pengulangan 3 kali selama 5 menit. Rendam preparat didalam antibodi *Rat anti TNF- α* selama 24 jam dan teteskan preparat dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali pengulangan. Kemudian ditetesi *Navocstra Post Primer* pada setiap slide dan dibiarkan selama 1 jam, dilanjutkan dengan PBS sebanyak 3 kali selama 5 menit, pembuangan post primer bersamaan

dengan pembilasan pertama. Preparat ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radish Peroxidase*) selama 40 menit dengan suhu ruang. Kemudian dicuci kembali dengan PBS dan dibilas dengan steril water. Kemudian slide ditetesi dengan kromogen DAB (*Diaminobenzinidine*) selama 10-20 menit, setelah itu dicuci kembali dengan PBS pH 7.4 selam 5 menit 3 kali. Selanjutnya *counterstaining* menggunakan Hematoxylen selama 5 menit. Dicuci *mounting, entellan*, dan ditutup dengan coverglass. Hasil diamati dengan mikroskop (Ramos, 2005).

4.4.7 Pengamatan Ekspresi NF- κ B dan TNF- α

Pengamatan imunohistokimia dilakukan di ginjal untuk mengetahui ekspresi NF- κ B dan TNF- α . Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x. pengamatan lima bidang pandang setiap kelompok kemudian dilakukan penilaian rata-rata persentase area menggunakan pengujian *Immunoratio*.

4.4.8 Analisis Data

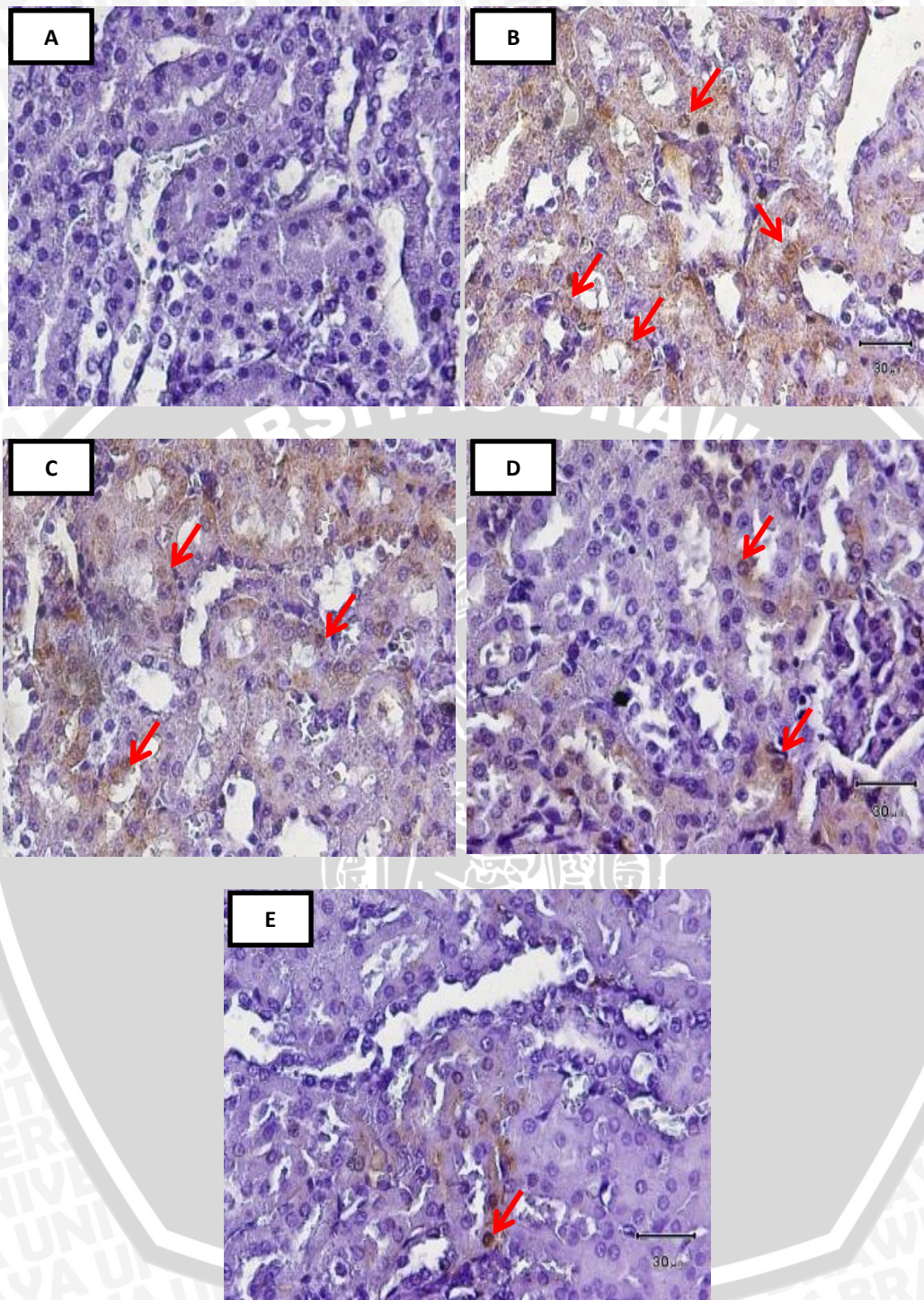
Analisis data yang digunakan pada penelitian ini menggunakan analisis kuantitatif untuk ekspresi NF- κ B dan TNF- α yang dianalisa dengan SPSS 16.0 Edition for Windows dengan analiss ragam ANOVA, apakah ada perbedaan antar perlakuan dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha = 5\%$ untuk melihat perlakuan yang memberikan hasil signifikan.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN


Penelitian ini menggunakan pengujian imunohistokimia ekspresi *Nuclear Faktor Kappa Beta* (NF- κ) dan *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) ginjal sebagai parameter perbaikan ginjal tikus dengan diet tinggi glukosa yang diberi terapi ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciose* L). Analisa imunohistokimia ekspresi NF- κ dan TNF- α dilakukan untuk mendeteksi terjadinya perubahan level pada NF- κ dan TNF- α yang dipengaruhi oleh perbedaan dosis pada variabel bebas yaitu dosis pemberian glukosa dan fruktosa tambahan pada pakan dan dosis terapi ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciose* L).

5.1 Pengaruh Terapi Ekstrak Kombinasi Kayu Manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciose* L) terhadap Penurunan Ekspresi *Nuclear Faktor Kappa Beta* (NF- κ) pada Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) dengan Diet Tinggi Glukosa.

Hasil pengamatan ekspresi *Nuclear Faktor Kappa Beta* (NF- κ) pada jaringan tikus dari lima kelompok perlakuan seperti pada **Gambar 5.1**. Pemotretan imunohistokimia organ ginjal dilakukan sebanyak lima lapang pandang pada daerah korteks yang merupakan letak tubulus.



Gambar 5.1 Ekspresi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF-κβ) pada Gambaran Immunohistokimia Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Perbesaran 400x.

Keterangan Gambar 5.1: (A) Tikus kontrol negatif, (B) tikus kontrol positif, (C) tikus terapi ekstrak kombinasi kayu manis dan bunga bungur dosis 4,5mg/kgBB (P1), (D) terapi ekstrak kombinasi kayu manis dan bunga bungur dosis 9mg/kgBB (P2), (E) terapi ekstrak kombinasi kayu manis dan bunga bungur dosis 18mg/kgBB (P3). Tanda panah () menunjukkan ekspresi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF-k β). Skala menunjukkan 1 garis adalah 30 μ m.

Analisis ekspresi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF-k β) (**Tabel 5.1**) pada penelitian ini dilakukan dengan melakukan rata-rata lima lapang pandang persentase ekspresi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF-k β) tubulus dan sekitarnya pada perbesaran 400x yang diproses melalui aplikasi *Immunoratio* pada setiap tikus pada semua ulangan tiap perlakuan, kemudian dilakukan analisis statistika menggunakan *One Way ANOVA* dengan aplikasi SPSS for Windows 16 dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan taraf kepercayaan $\alpha=5\%$ (*Lampiran 8-9*).

Tabel 5.1 Ekspresi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF-k β) pada Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberi Diet Tinggi Glukosa dan Terapi Ekstrak Kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmannii* (NESS) BI) dan bunga bungur (*Langestromia speciose* L)

Kelompok	Rata-Rata Persentase Ekspresi NF-k β	Ekspresi NF-k β (%)	
		Peningkatan Terhadap Kontrol Negatif	Penurunan Terhadap Kontrol Positif
Kontrol Negatif	0,78 \pm 0,42 _a	-	-
Kontrol Positif	14,48 \pm 0,37 _d	1763,3	-
Terapi 4,5mg/kgBB	12,72 \pm 0,87 _c	-	12,2
Terapi 9mg/kgBB	6,48 \pm 0,48 _b	-	55,2
Terapi 18mg/kgBB	1,69 \pm 0,63 _a	-	88,3

Keterangan: notasi *a,b,c,d* menunjukkan bahwa ada perbedaan signifikan tiap kelompok ($p<0,05$)

Hasil ekspresi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- κ B) (**Tabel 5.1**) menunjukkan adanya warna coklat pada tubulus ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) dengan diet tinggi glukosa. Penggunaan antibodi NF- κ B menggunakan metode imunohistokimia (IHK). Warna coklat yang dihasilkan merupakan reaksi antara enzim *Streptavidin conjugated Horseradish Peroxidase* (SAHRP) yang berikatan dengan antibodi sekunder dengan kromagen *Diaminobenzidine* (DAB) (Immunostar, 2010).

Ekspresi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- κ B) pada ginjal kontrol negatif paling sedikit bila dibandingkan dengan kelompok yang lain. *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- κ B) merupakan golongan protein yang berperan dalam faktor transkripsi yang ditemukan di semua tipe sel. NF- κ B juga terlibat dalam respon segera pada berbagai stimulus, seperti infeksi virus dan bakteri, stress oksidan dan lain-lain. Pada sebagian besar pengaktifan NF- κ B akan mengawali regulasi terekspresinya sejumlah gen yang mengkode sitokin, *growth factor*, molekul imun, gen yang berhubungan dengan apoptosis dan lainnya (Putra, 2012). Adanya ekspresi NF- κ B pada kelompok kontrol negatif karena NF- κ B secara normal terdapat pada ginjal dalam jumlah relatif sedikit sebagai komponen imunitas.

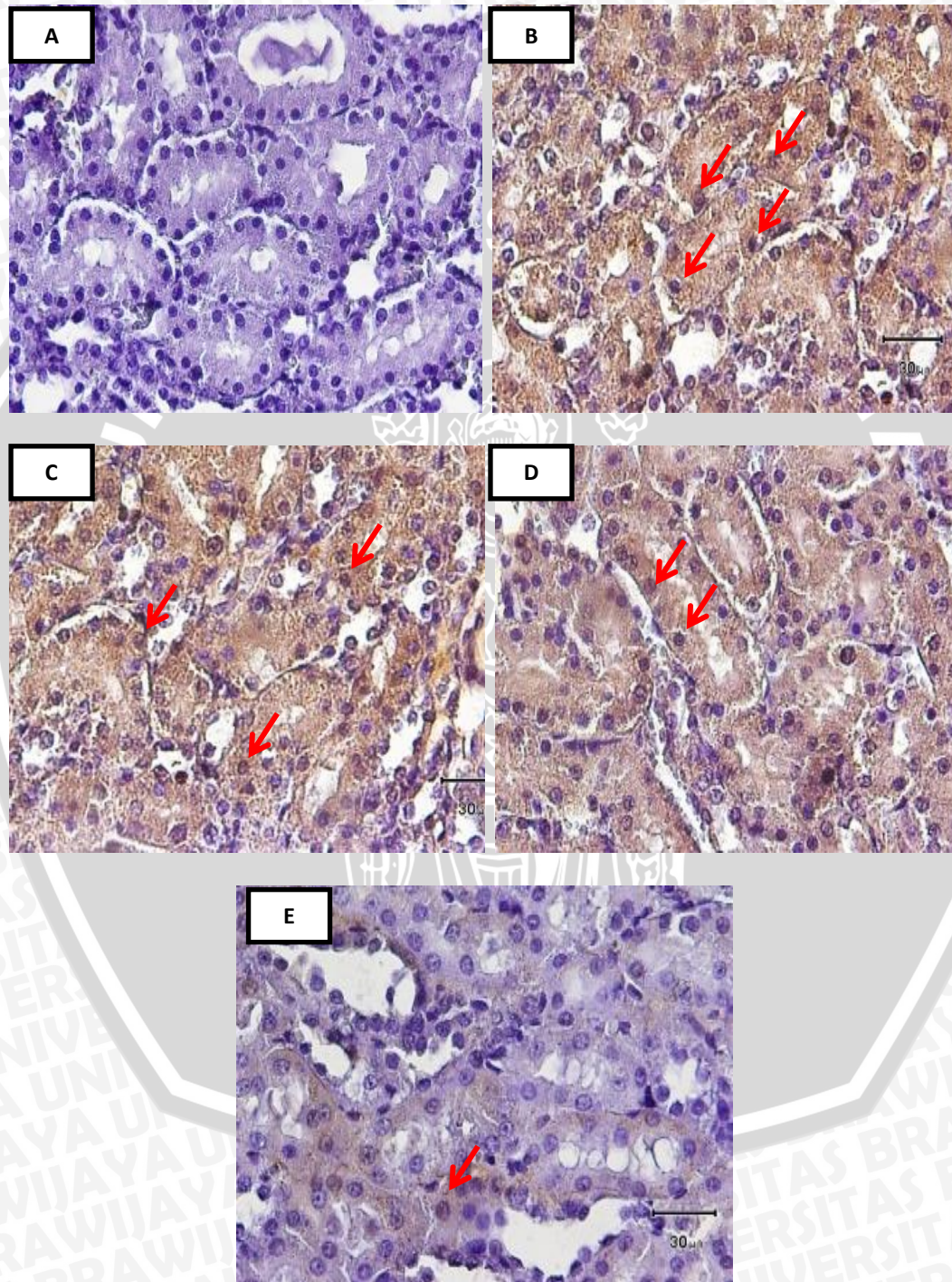
Hasil pengamatan ekspresi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- κ B) secara statistik menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antar perlakuan. Peningkatan ekspresi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- κ B) pada kontrol positif (**Tabel 5.1**) sebesar 1763,3% dibandingkan kontrol negatif. Hal ini membuktikan bahwa kondisi hiperglukosa menyebabkan masuknya kalsium secara berlebihan, juga mengakibatkan peningkatan kecepatan aktivitas metabolisme pada

mitokondria, sehingga kebutuhan asupan kalsium dan oksigen semakin meningkat yang diikuti adanya stress oksidatif akibat meningkatnya produksi radikal bebas. Ketidakseimbangan radikal bebas memicu peningkatan reaksi reduksi dan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) di mitokondria (Liu *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Turrens, 2003). Reactive Oxygen Species (ROS) menstimulasi aktivasi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- κ B). Peningkatan NF- κ B berhubungan dengan peningkatan ekspresi gen *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) dan infiltrasi makrofag pada jaringan ginjal dengan memproduksi ekspresi gen-gen proinflamasi seperti TNF- α .


Ekspresi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- κ B) pada Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberi diet tinggi glukosa dan terapi ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciosa* L) dosis 4,5 mg/kgBB (**Gambar 5.2C**), dosis 9 mg/kgBB (**Gambar 5.2D**) dan dosis 18 mg/kgBB (**Gambar 5.2E**) menunjukkan adanya penurunan dibandingkan dengan kontrol positif (**Gambar 5.2B**) dengan persentase penurunan berturut-turut yaitu 12,2%, 55,2% dan 88,3% (**Tabel 5.1**). Penurunan ekspresi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- κ B) yang signifikan ($p < 0,05$) secara statistik ditunjukkan dengan dengan perbedaan notasi huruf yang berbeda.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dosis terapi 18 mg/kgBB adalah dosis efektif yang didukung adanya hasil analisis statistik dapat menurunkan ekspresi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- κ B) pada ginjal tikus dengan diet tinggi glukosa hingga mendekati nominal persentase ekspresi NF- κ B ginjal tikus kontrol negatif.

5.2 Pengaruh Terapi Ekstrak Kombinasi Kayu Manis (*Cinnamomum burmannii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciosa* L) terhadap Penurunan Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) pada Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) dengan Diet Tinggi Glukosa.



Gambar 5.2 Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) pada Gambaran Immunohistokimia Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Perbersaran 400x.

Keterangan Gambar 5.2: (A) tikus kontrol negatif, (B) tikus kontrol positif, (C) tikus terapi ekstrak kombinasi kayu manis dan bunga bungur dosis 4,5mg/kgBB, (D) tikus terapi ekstrak kombinasi kayu manis dan bunga bungur dosis 9mg/kgBB, (E) tikus terapi ekstrak kombinasi kayu manis dan bunga bungur dosis 18mg/kgBB. Tanda panah () menunjukkan ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α). Skala menunjukkan 1 garis adalah 30 μ m.

Tabel 5.2 Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha*(TNF- α) pada Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberi Diet Tinggi Glukosa dan Terapi Ekstrak Kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciose* L)

Kelompok	Rata-Rata Persentase Ekspresi TNF- α	Ekspresi TNF- α (%)	
		Peningkatan Terhadap Kontrol Negatif	Penurunan Terhadap Kontrol Positif
Kontrol Negatif	0,82 \pm 0,25 _a	-	-
Kontrol Positif	12,72 \pm 0,87 _d	1446,5	-
Terapi 4,5mg/kgBB	10,86 \pm 0,52 _c	-	14,6
Terapi 9mg/kgBB	5,93 \pm 1,47 _b	-	53,3
Terapi 18mg/kgBB	1,12 \pm 0,51 _a	-	91,1

Keterangan: notasi a,b,c,d menunjukkan bahwa ada perbedaan signifikan tiap kelompok ($p < 0,05$)

Analisis ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) (**Tabel 5.2**) pada penelitian ini dilakukan dengan melakukan rata-rata lima lapang pandang persentase ekspresi TNF- α glomerulus dan tubulus sekitarnya pada perbersaran 400x yang diproses melalui aplikasi *Immunoratio* pada setiap tikus pada semua ulangan tiap perlakuan, kemudian dilakukan analisis statistika menggunakan *One Way ANOVA* dengan aplikasi *SPSS for Windows 16* dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan taraf kepercayaan $\alpha = 5\%$ (*Lampiran 10-11*).

Hasil ekspresi TNF- α (**Gambar 5.2**) ditandai dengan adanya warna coklat pada jaringan. Timbul warna coklat diakibatkan oleh adanya ikatan antigen dan antibodi berlabel biotin sehingga dengan penambahan substrat kromogen akan menimbulkan warna kecoklatan. Pemberian antibodi sekunder diikuti dengan penambahan *Strep Avidin conjugated Horseradish Peroxidase* (SA-HRP) dan substratnya berupa *Diaminobenzidine* (DAB). *Diaminobenzidine* (DAB) merupakan substrat dari peroksidase yang dapat menghasilkan warna kecoklatan, sehingga akan terbentuk warna yang lebih jelas pada jaringan tersebut (Ramos, 2005).

Hasil analisis statistik (**Tabel 5.2**) menunjukkan bahwa terapi ekstrak kombinasi kayu manis dan bunga bungur secara signifikan ($p < 0,05$) menurunkan ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α). *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) merupakan suatu sitokin yang dihasilkan oleh leukosit yang berfungsi untuk merangsang dan mengaktifkan sistem imun terhadap respon inflamasi, dimana dalam keadaan normal, antigen yang masuk memicu reaktivitas imun pada imunitas nonspesifik maupun spesifik (Baratawidjaja, 2004). Keberadaan TNF- α pada jaringan ginjal dapat menjadi indikasi kondisi patologi jaringan yang dapat digambarkan melalui metode imunohistokimia. Proses inflamasi didalam sel akan menyebabkan teraktivasinya makrofag yang akan memproduksi sitokin proinflamasi salah satunya TNF- α . **Gambar 5.2A** merupakan gambaran imunohistokimia (IHK) ginjal kontrol negatif, terdapat ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) pada kontrol negatif. Adanya ekspresi TNF- α pada

kelompok kontrol negatif karena TNF- α secara normal terdapat pada ginjal dalam jumlah relatif sedikit sebagai komponen imunitas.

Peningkatan ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) pada kontrol positif (**Tabel 5.2**) sebesar 1446,5% dibandingkan kontrol negatif. Pada penelitian ini membuktikan bahwa keadaan hiperglukosa dapat meningkatkan ekspresi TNF- α . Ekspresi TNF- α dihasilkan oleh leukosit, sel intrinsik ginjal seperti sel mesangial, glomerular, endothelial dan sel tubulus renal yang juga dapat memproduksi TNF- α pada glomerulus dan tubulus ginjal. *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) dapat disimpan pada sel dalam bentuk proaktif (Wang *et al.*, 2004).

Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) merupakan sitokin yang memiliki peranan yang besar dalam aktivasi sistem imun dibandingkan dengan sitokin lainnya. *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) memiliki peranan penting dalam mendukung proses kemotoksis sel-sel inflamasi, mengaktifasi sel-sel inflamasi baik TNF- α sendiri maupun sitokin lain, merangsang sel-sel endotel untuk meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I dan mendukung fungsi sel *T-cytotoxic*. Efek yang ditimbulkan oleh *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) diantaranya adalah inisiator neutrofil dan monosit ke tempat-tempat infeksi, menginisiasi ekspresi molekul adhesi sel, menginduksi apoptosis sel-sel inflamasi (Cohen and Bonta, 2004).

Berdasarkan penelitian Khan (2003) kayu manis memiliki kandungan senyawa yaitu *Methyl Hydroxyl Chalcone Polymer* (MHCP) yang mampu mencegah dan meringankan gejala penyakit diabetes. Selain mengandung *Methyl*

Hydroxyl Chalcone Polymer (MHCP) kayu manis juga berperan sebagai anti-inflamasi yang digunakan sebagai penghambat peningkatan kadar gen-gen proinflamasi yang berperan dalam peradangan serta kandungan *ellagitanin* pada bunga bungur yang bertindak sebagai antioksidan yang mampu melindungi sel dan menangkal radikal bebas. *Methyl Hydroxyl Chalcone Polymer* (MHCP) dan *ellagitanin* memiliki kemampuan untuk menghambat *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) dengan mencegah transkripsi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- κ B) (Ruiz and Haller, 2006).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terapi ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciosa* L) dosis 18 mg/kgBB efektif dalam menurunkan ekspresi *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α) pada ginjal tikus dengan diet tinggi glukosa hingga mendekati nominal persentase ekspresi TNF- α ginjal tikus kontrol negatif bila dibandingkan dengan dosis 4,5 mg/kgBB dan 9 mg/kgBB.

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan suatu kesimpulan bahwa:

1. Pemberian terapi ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciose L*) mampu menurunkan ekspresi *Nuclear Faktor Kappa Beta* (NF- κ) pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) dengan diet tinggi glukosa dengan dosis terapi efektif yaitu 18 mg/kgBB.
2. Pemberian terapi ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciose L*) mampu menurunkan ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) dengan diet tinggi glukosa dengan dosis terapi efektif yaitu 18 mg/kgBB.

6.2 Saran

Uji klinis sebaiknya dilakukan pada penelitian selanjutnya melalui terapi ekstrak kombinasi kayu manis (*Cinnamomum burmanii* (Ness) BI) dan bunga bungur (*Lagerstroemia speciose L*) pada diet tinggi glukosa sebagai data pendukung penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustine, Destia., R Sri Wilarso Budi.2008. *Pengaruh Periode Penyimpanan Dan Perlakuan Pendahuluan Terhadap Viabilitas Benih Kayu Manis (Cinnamomum Burmannii BL)*. Bogor : Departemen Silvikultur Fakultas Kehutanan Institute Pertanian Bogor.
- Aiello. 2000. *The Merck Veterinary Manual*. Edisi ke-8. USA : White house station.
- Almatsier, Sunita. 2001. *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama.
- American Diabetes Association. 2011. *Diagnosis And Classification Of Diabetes Mellitus*. *Diabetes Care* ;34:s62-9.
- Asman Manaf.2010.*Prediabetes*. Padang : Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.
- Astiti, R.I.A.2005. *Uji Hipoglikemik Daun Bungur (Langerstroemia Speciosa) Terhadap Kadar Glukosa Darah Kelinci*. *Review Kimia*, 8 (1) :112.
- Baratawidjaya Garna Karnen. 2004. *Imunologi Dasar*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Bell D.S.2001. *Importance of Postprandial Glucose Control*. *South Med J*. 2001; 94(8). USA: Lippincott Williams & Wilkins. Available from: <http://www.medscape.com/viewarticle/410819> [Diakses pada 12 Maret 2016].
- Cohen and Bonta.2004. *Corpendium : An Inflammatory Disease*. Medical World Business Press.
- Cranmer, H., dan Shannon, M. 2009. *Blood Glucose Levels: Medical Reference from Healthwise*. Hypoglycemia Diabetes Health Center.
- David. M. M. 2000. *Laboratory Animal Medicine And Science Series II. Health Sci. Coni.Edu*. Resources. Wasington Uni. U.S.A hlm.50-51.
- Dalimarta, S. 2005. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 1*. Trubus agriwidya, Jakarta. hal.170,198, 214.
- Dalimartha, S. 2003. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 3*. Cetakan I. Puspa Swara. Jakarta.
- Ellya, R.D., P. Sijani, R. Utju dan P. Edhiwan.2001. *Dislipidemia pada Kelompok Usia Lanjut di Lembang Bandung*. *Journal of Knowledge Management*, 1: 39–53.

- Faiz Omar, Moffat David. 2004. *At a Glance Anatomy*. Alih Bahasa oleh Annisa Rahmalia. Jakarta: Erlangga, P:132-3.
- Ferry R. J., 2008. *Fructose 1,6-Diphosphatase Deficiency*. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/943882-overview> [Diakses pada 12 Maret 2016].
- Florensia N, O.M Tandrasasmita, R.R Tjandrawinata. 2011. *DLBS3233 increases glucose uptake by mediating upregulation of PPAR_α and PPAR_γ expression*. Divisions of Protein Biochemistry and Molecular Pharmacology, Dexa Laboratories of Biomolecular Sciences, Dexa Medica Group, Industri Selatan V Block PP No. 7, Jababeka Industrial Estate II, Cikarang, Jawa Barat 17550, Indonesia.
- Green, E.A dan R.A Flavell. 2000. *The Temporal Importance Of TNF- α Expression In The Development Of Arthritic Rheumatoid*. Journal Immunity, 12:459-469.
- Gross. 2005. *Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment*. Journal. Endocrinologia 26:1806-1811.
- Guyton AC and Hall JE. 2006. *Textbook Of Medical Physiology*. 11th Ed, Elsevier Inc, Philadelphia, p. 840-851.
- Guzman, C., H.C Claudia, L.G Lorena, and M.M Jorge. 2010. *interleukin-6: A Cytokine With Pleiotropic Role In The Neuroimmunoendocrine Network*. The Open Neuroendocrinology Journal, 3, 152-160.
- Hayashi, T., H. Maruyama, R. Kasai, K. Hattori, S. Takasuga, O. Hazeki, K. Yamasaki, and T. Tanaka. 2002. *Ellagitannins From Langerstroemia Speciosa A Activators Of Glucose Transport In Fat Cells*. Planta Medica 68: 173-175.
- Jarvill Taylor, J Karalee, R.A Anderson, and J.G Donald. 2001. *A Hydroxychalcone Derived From Cinnamom Functions As A Mimetic For Insulin In 3T3-L1 Adipocytes*. Journal Of The American Collage Of Nutrition 20(4) : 327-336.
- Joanna. 2007. *Effect Of Cinnamon On Postprandial Blood Glucose, Gastric Emptying, And Satiety In Healthy Subjects 1,2,3*. American Society For Clinical Nutrition. <http://ajcn.nutrition.org/content/85/6/1552.long>.
- Khan, A., M. Safdar, M.H.A Khan, K.N Khattak, R.A Anderson. 2003. *Cinnamon Improves Glucose And Of People With Type 2 Diabetes*. Diabetes Care 26, 3215-3218. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14633804>.
- Kusningrum, R.S. 2010. *Perancangan Percobaan*. Surabaya. Airlangga University Press.

- Liu F, Kim J-K , LiY , Liu X, Li J, Chen X.2001.*An extract of Lagerstroemia speciosa L. has insulin like glucose uptake stimulatory and adipocytes differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells*. JNutr2001;131:2242-7.
- Masharani, U., Karam J.H., German M.S. 2004. *Pancreatic hormones & diabetes mellitus*. In : Greenspan F.S., Gardner D.G., editors. *Basic & Clinical Endocrinology*. 7th. Ed. USA : McGraw-Hill. p.658-63, 669-70, 683, 690, 693-7
- Mescher. A. L.2013. *Histologi Dasar Junqueira : Text & Atlas : Edisi . 12. Alis Bahasa Oleh Frans Dani*. Jakarta : ECG
- Murray RK, Granner D K, Mayes PA, dan Rodwell VW. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry* . Twenty-Sixth Edition. Lange Medical Books/McGraw-Hill.
- Muzasti. 2011. *Nonalcoholic Fatty Liver Disease Pada DM Tipe 2* <http://repostory.usu.ac.id/handle/123456789/28231>.
- Nugroho, Agung Endro.2006. *Review Hewan Percobaan Diabetes Mellitus : Patologi Dan Mekanisme Aksi Diabetogenik*. Biodiversitas issn: 1412-033x volume 7, halaman: 378-382.
- Oeckinghaus Andrea dan Ghosh Sankar.2009. *The NF-Kb Family Of Transcription Factor And Its Regulation*. Cold Spring Harb Perspect Biol 2009;doi;10.
- Ping, Hua.,Zhang, Guijun., Guizing Ren.2010.*Antidiabetic Effect Of Cinnamon Oil In Diabetic KK-Ay Mice*. *ELSI VIER:Food And Toxicology* 48 2344-2349.
- Popa,C.,M.G.Netea,M.v,Riel.,M.van der Meer J.W, A.Stalenhoef.2007. *The Role Of TNF-A In Chronic Inflammatory Conditions, Intermediary Metabolism, And Cardiovascular Risk*. *J lipd res* 48:751-762.
- Prahastuti, Sijani, 2012. *Konsumsi Fruktosa Berlebihan dapat Berdampak Buruk bagi Kesehatan Manusia*. JKM, 10 (2) : 173-189.
- Putra HB, Ratnawati Retty dan Yudani Tri.2012. *Efek Polifenol Buah Tin Terhadap Kadar Nuclear Factor Kappa B (NF-K β) Pada Aorta Tikus Galur Wistar Jantan Yang Diberi Diet Atherogenik*.Malang: Universitas Brawijaya.
- Ramos Vara, J.A.2005.*Technical Aspects of Immunohistochemistry*. *J Vaterinary pathology*,vol.42,pp.405-426.
- Sandip Patel and Santani, Dev.2009. *Role NFKB In The Pathogenesis Of Diabetes And Its Associated Complications*. *Pharmacological reports*, 61, 595-603.
- Shulman, GI, 2000, Cellular Mechanism of Insulin Resistance, 106: (2):171-6.

- Steven, P.F.2001. *Angiosperm Phylogeny Website*. Dilihat 20 Maret 2016.
- Syukur dan Hernani.2002. *Budidaya Tanaman Obat Komersial*, 91, Penebar Swadaya, Jakarta
- Vijaykumar, K.,P.B Murthy, S. Kannababu, B. Syamasundar and G.V Subbaraju. 2006. *Quantitative Determination Of Cocosolic Acid In Langerstroemia Speciosa Leaves, Extracts And Dosage Forms*. International Journal Of Applied Science And Engineering 4:103-104.
- Wangsa, Rasdi., Nuryani, Sri.2005. *Status Dan Potensi Pasar Kayu Manis Organic Nasional Dan Internasional*. Bogor : Aliansi Organik Indonesia. www.organicindonesia.org.
- Widyastuti SK.2000. *Monyet Ekor Panjang (Macaca Fascicularis) Sebagai Model Diabetes Mellitus : Pengaruh Hiperqlikemia Pada Lipid Darah, Serum Oksida Nitric (No) Dan Tingkah Laku Klinis.[Tesis]*. Bogor : Program Pasca Sarjana, Institute Pertanian Bogor.
- Wijaya, C.H., M. Rahminiwati, M.C Wu, D. Lo. 2011. *Inhibition of α -Glukosidase and α -Amylase Activities of some Indonesian Herbs : In Vitro Study. The 12th ASEAN Food Conference 2011*. Bangkok 16-18 June.



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 517-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL : PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK KAYU MANIS (*Cinnamomum burmannii*) DAN BUNGA BUNGUR (*Langestromia specrose L*) TERHADAP EKSPRESI TNF- α DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI TUBULUS GINJAL TIKUS MODEL HIPERGLUKOSA

PENELITI : PUTRI SUCI RULLIYANI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

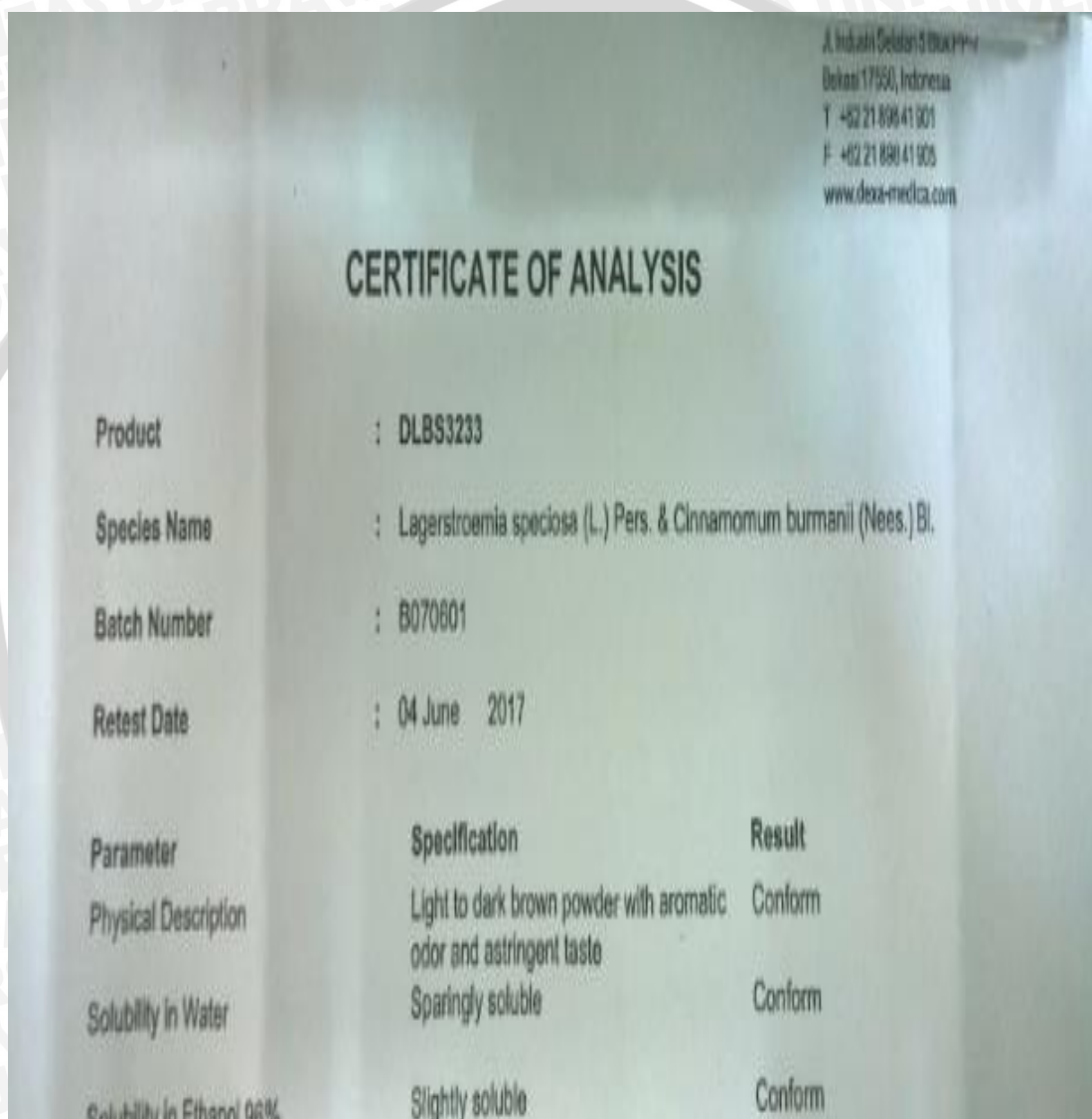
Malang, 13 April 2016
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001



Lampiran 2. Sertifikat Ekstrak Kombinasi dari PT. Dexa Medika Laboratorium



Lampiran3. Pengambilan Sampel dan Pembuatan Preparat Histopatologi Ginjal (Wati dkk., 2013; Junquiera and Carneiro, 2005)

Organ ginjal

- dicucidengan menggunakan PBS
- direndam dalam *Paraformaldehyde Acid* 4%.
- diiris menggunakan *microtome* dengan ukuran 2x1x0,5 cm

ginjal dalam PFA 4%

- diambil dan direndam dalam alkohol 70% selama 24 jam
- direndam dalam alkohol 80% selama 2 jam
- direndam dalam alkohol 90% selama 20 menit
- direndam dalam alkohol 95% selama 20 menit

ginjal hasil dehidrasid dengan alkohol

- dimasukkan dalam *xylol* I selama 20 menit
- dimasukkan dalam *xylol* II selama 30 menit
- dicelupkan pada parafin cair dengan suhu 56°C selama 2 jam

ginjal dalam blok parafin

- diambil dan dipotong dengan menggunakan *microtome* ukuran 4 – 5 μ m
- direndam pada *water bath* dengan suhu 38 – 40°C
- diambil irisan yang didapat dengan objek glass
- diletakkan di atas *shot plate* 38 – 40 °C dan disimpan dalam inkubator suhu 38 – 40 °C selama 24 jam

Preparat ginjal siap pengujian IHK

Lampiran4.Diagram alirPembuatanImunohistokimia**PembuatanPreparatImuno
histokimia**

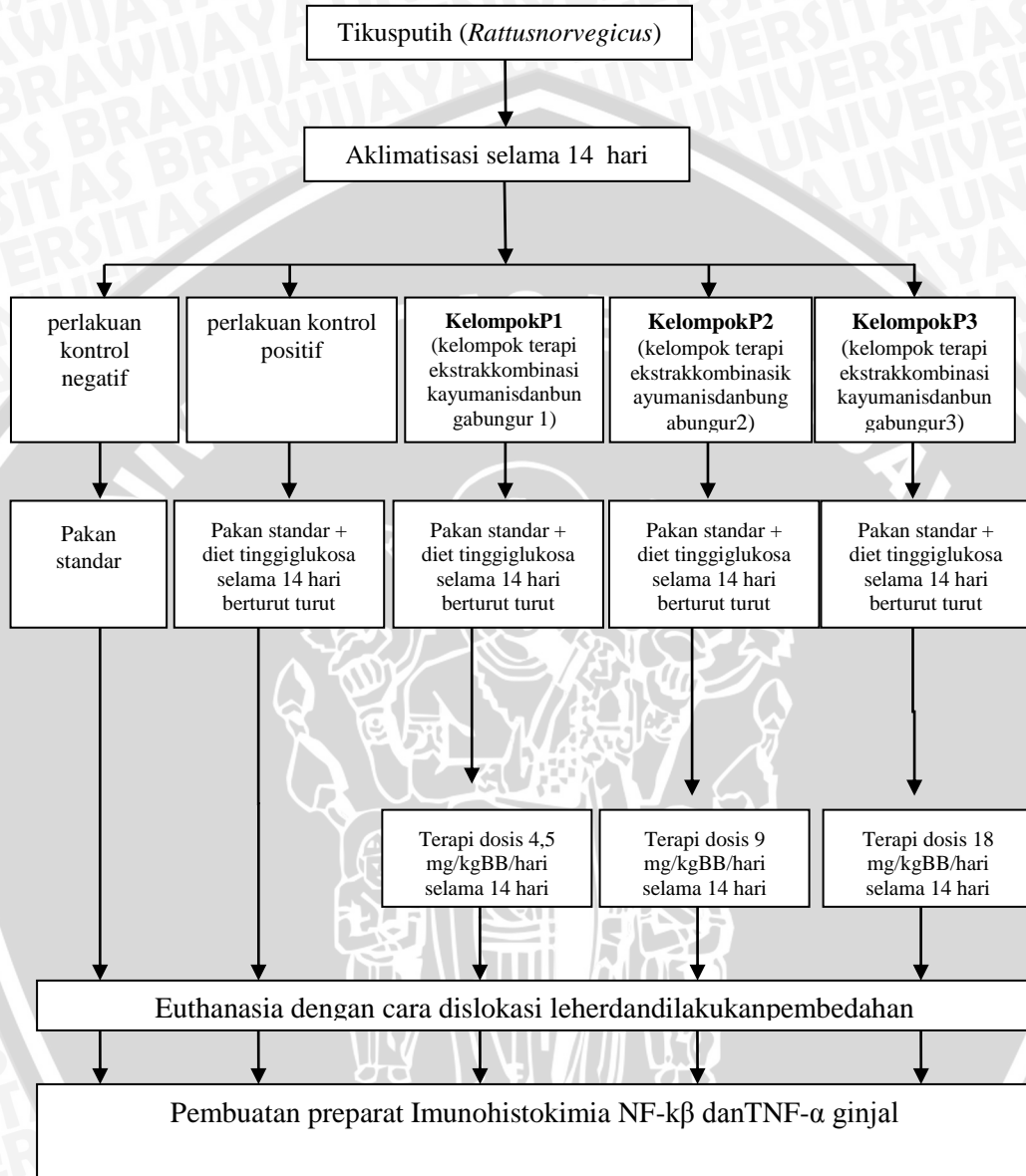
- Dilakukanpembuatanpreparatdandeparafinasi
- Dilakukanperendamenganylol I, II selama 5 menit
- Dilakukanperendamengankoholbertingkat (100%, 95%, 70%) selama 5 menit
- Dilakukanpencucianpreparatdengan PBS pH 7.4 selama 3x5 menit
- Kemudianditetesidengan*Navocastra Peroxidase Block*selama 20 menit
- Dicucikembalidengan PBS pH 7.4 selama 5 menitsebanyak 3 kali
- Diinkubasidenganantibodi primer selama 24 jam dengansuhu 4°C
- Dicucikembalidengan PBS PH 7.4 selama 5 menitsebanyak 3 kali
- Kemudianditetesidengan*Navocastra POST Primer* selama 1 jam dengansuhuruang
- Dicucikembalidengan PBS PH 7.4 selama 5 menitsebanyak 3 kali
- Ditetesi SA-HRP selama 40 menitdengansuhuruang
- Dicucikembalidengan PBS PH 7.4 selama 5 menitsebanyak 3 kali
- Ditetesidenganchromogen DAB (Diamonobenzidine) selama 10 menit
- Dicucikembalidengan PBS PH 7.4 selama 5 menitsebanyak 3 kali
- SelanjutnyacounterstainingdenganHematoxylenselama 5 menit

- Dicumai mounting, entellan, dan ditutup dengan cover glass
- Diamati dengan mikroskop

HASIL



Lampiran5.SkemaKerjaPenelitian



Lampiran 6. Perhitungan Dosis Ekstrak Kombinasi Kayu Manis dan Bunga Bungur

Berat badan tikus putih = 150 gram, sehingga volume ekstrak yang dibutuhkan untuk masing – masing perlakuan dalam sekali pemberian adalah:

1. Terapi 1 (P3)

Dosis pemberian ekstrak kombinasi dengan dosis 4,5 mg/kg per ekor tikus adalah:

$$\begin{aligned}
 &= \text{Dosis P3} \times \text{BB} \\
 &= \frac{4,5 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 150 \text{ g} \\
 &= \mathbf{0,7 \text{ mg/ekor}}
 \end{aligned}$$

Jadi, untuk 1 hari perlakuan diberikan sebanyak:

$$\begin{aligned}
 &= \text{Jumlah tikus} \times \text{dosis/tikus} \\
 &= 4 \text{ ekor} \times 0,7 \text{ mg} \\
 &= 2,8 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

2. Terapi 2 (P4)

Dosis pemberian ekstrak kombinasi dengan dosis 9 mg/kg per ekor tikus adalah:

$$\begin{aligned}
 &= \text{Dosis P4} \times \text{BB} \\
 &= \frac{9 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 150 \text{ g} \\
 &= \mathbf{1,35 \text{ mg/ekor}}
 \end{aligned}$$

Jadi, untuk 1 hari perlakuan diberikan sebanyak:

$$\begin{aligned}
 &= \text{Jumlah tikus} \times \text{dosis/tikus} \\
 &= 4 \text{ ekor} \times 1,35 \text{ mg} \\
 &= 5,4 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

3. Terapi 3 (P5)

Dosis pemberian ekstrak kombinasi dengan dosis 18 mg/kg per ekor tikus adalah:

$$\begin{aligned}
 &= \text{Dosis P5} \times \text{BB} \\
 &= \frac{18 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 150 \text{ g}
 \end{aligned}$$

$$= 2,7 \text{ mg/ekor}$$

Jadi, untuk 1 hari perlakuan diberikan sebanyak:

$$= \text{Jumlah tikus} \times \text{dosis/tikus}$$

$$= 4 \text{ ekor} \times 2,7 \text{ mg}$$

$$= 10,8 \text{ mg}$$



Lampiran 7. Pemberiandan Pembuatan Pakan Diet Pakan Tinggi Glukosa

Tikus

- Dicampur : glukosa 10% dan fruktosa 15% dari total pakan per hari
- Dilakukan selama 14 hari mulai hari ke 1-14
- Pakadiberikan pada kelompok P1, P2 dan P3

Hiperglukosa

Perhitungan Pakan Diet Tinggi Glukosa:

I. Glukosa 10%

$$= \frac{10}{100} \times 40 \text{ gram} = 4 \text{ gram/tikus/hari}$$

II. Fruktosa 15%

$$= \frac{15}{100} \times 40 \text{ gram} = 6 \text{ gram/tikus/hari}$$

Jadi, untuk 5 perlakuan setiap hari dibutuhkan

- Tikus kontrol negatif : 4 ekor
- Tikus kontrol positif : 4 ekor
- Tikus perlakuan 1 : 4 ekor
- Tikus perlakuan 2 : 4 ekor
- Tikus perlakuan 3 : 4 ekor

Total

Glukosa

$$= 16 \text{ tikus} \times 4 \text{ gram}$$

$$= 64 \text{ gram per hari untuk glukosa yang dicampurkan pada pakan standart}$$

Fruktosa

$$= 16 \text{ tikus} \times 6 \text{ gram fruktosa}$$

$$= 96 \text{ gram per hari untuk fruktosa yang dicampurkan pada pakan standart}$$



Lampiran 8. Data Hasil Ekspresi dan Perhitungan NF-k β

1. Data Hasil ekspresi NF-k β

Kelompok Perlakuan	Tikus				Rataan Ekspresi NF-k β
	1	2	3	4	
Kontrol negatif	0,50	0,43	1,36	0,82	0.7775
Kontrol positif	14,23	15,04	14,04	14,36	14.4875
Terapi 4,5mg/kgBB	12,90	11,43	13,25	13,29	12.7175
Terapi 9mg/kgBB	6,04	6,14	7,08	6,66	6.4800
Terapi 18mg/kgBB	1,13	1,20	2,07	2,41	1.6900

2. Perhitungan ekspresi NF-k β

Kelompok Kontrol Positif

$$\begin{aligned} \text{Peningkatan ekspresi NF-k}\beta(\%) &= \frac{\text{Rataan Hiper} - \text{Rataan Kontrol}}{\text{Rataan Kontrol}} \times 100\% \\ &= \frac{14,4875 - 0,7775}{0,7775} \times 100\% \\ &= 1763,3\% \end{aligned}$$

Kelompok Terapi 4,5mg/kgBB

$$\begin{aligned} \text{Penurunan ekspresi NF-k}\beta(\%) &= \frac{\text{Rataan Hiper} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Hiper}} \times 100\% \\ &= \frac{14,4875 - 12,7175}{14,4875} \times 100\% \\ &= 12,2\% \end{aligned}$$

Kelompok Terapi 9mg/kgBB

$$\begin{aligned} \text{Penurunan ekspresi NF-k}\beta(\%) &= \frac{\text{Rataan Hiper} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Hiper}} \times 100\% \\ &= \frac{14,4875 - 6,4800}{14,4875} \times 100\% \\ &= 55,2\% \end{aligned}$$

Kelompok Terapi 18mg/kgBB

$$\begin{aligned} \text{Penurunan ekspresi NF-k}\beta(\%) &= \frac{\text{Rataan Hiper} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Hiper}} \times 100\% \\ &= \frac{14,4875 - 1,6900}{14,4875} \times 100\% \\ &= 88,3\% \end{aligned}$$

Lampiran 9. Hasil Uji Statistika Ekspresi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF-k β) dengan Aplikasi SPSS for Windows 16.

1. Uji Deskriptif

Descriptives

Persentase NF-k β

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K(-)	4	.7775	.42382	.21191	.1031	1.4519	.43	1.36
K(+)	4	14.4875	.37232	.18616	13.8950	15.0800	14.23	15.04
4,5mg/kgBB	4	12.7175	.87603	.43801	11.3235	14.1115	11.43	13.29
9mg/kgBB	4	6.4800	.48360	.24180	5.7105	7.2495	6.04	7.08
18mg/kgBB	4	1.6900	.62743	.31371	.6916	2.6884	1.13	2.41
Total	20	7.2305	5.74837	1.28537	4.5402	9.9208	.43	15.04

2. Uji Homogeneitas

Test of Homogeneity of Variances

Persentase NF-k β

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.308	4	15	.312

- Berdasarkan uji homogenitas $sig=0,312 > 0,05$ yang menandakan data bersifat homogen dan layak untuk dilanjutkan uji one wayANOVA

3. Uji ANOVA Ekspresi NF-k β

ANOVA					
Persentase NF-k β	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	622.691	4	155.673	454.331	.000
Within Groups	5.140	15	.343		
Total	627.831	19			

- Pada uji ANOVA terlihat nilai sig = 0,000 = 0% < 5% maka H_0 ditolak karena diterima H_1 . Disini diperlukan uji lanjutan yaitu menggunakan uji Tukey.

4. Uji lanjut Beda Nyata Jujur (BNJ) atau Uji Tukey

Multiple Comparisons						
Persentase NF-k β Tukey HSD						
(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
Perlakuan	Perlakuan				Lower Bound	Upper Bound
K(-)	K(+)	-13.71000*	.41391	.000	-14.9881	-12.4319
	4,5mg/kg BB	-11.94000*	.41391	.000	-13.2181	-10.6619
	9mg/kg BB	-5.70250*	.41391	.000	-6.9806	-4.4244
	18mg/kg BB	-.91250	.41391	.230	-2.1906	.3656
K(+)	K(-)	13.71000*	.41391	.000	12.4319	14.9881
	4,5mg/kg BB	1.77000*	.41391	.005	.4919	3.0481
	9mg/kg BB	8.00750*	.41391	.000	6.7294	9.2856
	18mg/kg BB	12.79750*	.41391	.000	11.5194	14.0756
4,5mg/kg BB	K(-)	11.94000*	.41391	.000	10.6619	13.2181
	K(+)	-1.77000*	.41391	.005	-3.0481	-.4919

9mg/kg BB	6.23750*	.41391	.000	4.9594	7.5156
18mg/k gBB	11.02750*	.41391	.000	9.7494	12.3056
9mg/kg BB K(-)	5.70250*	.41391	.000	4.4244	6.9806
BB K(+)	-8.00750*	.41391	.000	-9.2856	-6.7294
4,5mg/k gBB	-6.23750*	.41391	.000	-7.5156	-4.9594
18mg/k gBB	4.79000*	.41391	.000	3.5119	6.0681
18mg/k gBB K(-)	.91250	.41391	.230	-.3656	2.1906
BB K(+)	-12.79750*	.41391	.000	-14.0756	-11.5194
4,5mg/k gBB	-11.02750*	.41391	.000	-12.3056	-9.7494
9mg/kg BB	-4.79000*	.41391	.000	-6.0681	-3.5119

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Persentase NF-kβ

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		a	b	c	D
K(-)	4	.7775			
18mg/k gBB	4	1.6900			
9mg/kg BB	4		6.4800		
4,5mg/k gBB	4			12.7175	
K(+)	4				14.4875
Sig.		.230	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- *Signifikansi perbedaan terlihat pada notasi angka $\alpha=0,05\%$ yang berbeda*



5. Uji Normalitas Data (*Kolmogorov-Smirnov Test*)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Persentase
N		20
Normal Parameters ^a	Mean	7.2305
	Std. Deviation	5.74837
Most Extreme Differences	Absolute	.199
	Positive	.199
	Negative	-.188
Kolmogorov-Smirnov Z		.891
Asymp. Sig. (2-tailed)		.406

a. Test distribution is Normal.

- Berdasarkan uji normalitas, maka disimpulkan distribusi data bersifat normal.



Lampiran 10. Data Hasil Ekspresi dan Perhitungan TNF- α

1. Data Hasil ekspresi TNF- α

Kelompok Perlakuan	Tikus				Rataan Ekspresi TNF- α
	1	2	3	4	
Kontrol negatif	0,62	0,90	0,63	1,14	0.8225
Kontrol positif	14,03	12,26	12,34	12,25	12.7200
Terapi 4,5mg/kgBB	10,35	11,22	11,40	10,48	10.8625
Terapi 9mg/kgBB	7,88	5,60	5,92	4,32	5.9300
Terapi 18mg/kgBB	1,40	0,36	1,44	1,28	1.1200

2. Perhitungan ekspresi TNF- α

Kelompok Kontrol Positif

$$\begin{aligned} \text{Peningkatan ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} &= \frac{\text{Rataan Hiper} - \text{Rataan Kontrol}}{\text{Rataan Kontrol}} \times 100\% \\ &= \frac{12.7200 - 0.8225}{0.8225} \times 100\% \\ &= 1446,5\% \end{aligned}$$

Kelompok Terapi 4,5mg/kgBB

$$\begin{aligned} \text{Penurunan ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} &= \frac{\text{Rataan Hiper} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Hiper}} \times 100\% \\ &= \frac{12.7200 - 10.8625}{12.7200} \times 100\% \\ &= 14,6\% \end{aligned}$$

Kelompok Terapi 9mg/kgBB

$$\begin{aligned} \text{Penurunan ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} &= \frac{\text{Rataan Hiper} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Hiper}} \times 100\% \\ &= \frac{12.7200 - 5.9300}{12.7200} \times 100\% \\ &= 53,3\% \end{aligned}$$

Kelompok Terapi 18mg/kgBB

$$\begin{aligned} \text{Penurunan ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} &= \frac{\text{Rataan Hiper} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Hiper}} \times 100\% \\ &= \frac{12.7200 - 1.1200}{12.7200} \times 100\% \\ &= 91,1\% \end{aligned}$$

Lampiran 11. Hasil Uji Statistika Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) dengan Aplikasi SPSS for Windows 16.

1. Uji Deskriptif

Descriptives

Persentase TNF- α

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K(-)	4	.8225	.24824	.12412	.4275	1.2175	.62	1.14
K(+)	4	12.7200	.87426	.43713	11.3289	14.1111	12.25	14.03
4,5mg/kgBB	4	10.8625	.52462	.26231	10.0277	11.6973	10.35	11.40
9mg/kgBB	4	5.9300	1.47237	.73618	3.5871	8.2729	4.32	7.88
18mg/kgBB	4	1.1200	.51121	.25560	.3066	1.9334	.36	1.44
Total	20	6.2910	5.06074	1.13162	3.9225	8.6595	.36	14.03

2. Uji Homogeneitas

Test of Homogeneity of Variances

Persentase TNFa

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.499	4	15	.252

- Berdasarkan uji homogenitas $\text{sig}=0,252 > 0,05$ yang menandakan data bersifat homogen dan layak untuk dilanjutkan uji one wayANOVA

3. Uji ANOVA Ekspresi TNF- α

ANOVA					
Persentase TNFa	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	476.019	4	119.005	168.544	.000
Within Groups	10.591	15	.706		
Total	486.610	19			

- Pada uji ANOVA terlihat nilai $sig = 0,000 = 0\% < 5\%$ maka H_0 ditolak dan diterima H_1 . Disini diperlukan uji lanjutan yaitu menggunakan uji Tukey.

4. Uji lanjut Beda Nyata Jujur (BNJ) atau Uji Tukey

Multiple Comparisons						
Persentase TNF- α						
Tukey HSD						
(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
Perlakuan	Perlakuan				Lower Bound	Upper Bound
K(-)	K(+)	-11.89750*	.59417	.000	-13.7323	-10.0627
	4,5mg/kg gBB	-10.04000*	.59417	.000	-11.8748	-8.2052
	9mg/kg BB	-5.10750*	.59417	.000	-6.9423	-3.2727
	18mg/kg gBB	-.29750	.59417	.986	-2.1323	1.5373
K(+)	K(-)	11.89750*	.59417	.000	10.0627	13.7323
	4,5mg/kg gBB	1.85750*	.59417	.047	.0227	3.6923
	9mg/kg BB	6.79000*	.59417	.000	4.9552	8.6248
	18mg/kg gBB	11.60000*	.59417	.000	9.7652	13.4348
4,5mg/kg gBB	K(-)	10.04000*	.59417	.000	8.2052	11.8748
	K(+)	-1.85750*	.59417	.047	-3.6923	-.0227

9mg/kg BB	4.93250*	.59417	.000	3.0977	6.7673
18mg/k gBB	9.74250*	.59417	.000	7.9077	11.5773
9mg/kg BB K(-)	5.10750*	.59417	.000	3.2727	6.9423
BB K(+)	-6.79000*	.59417	.000	-8.6248	-4.9552
4,5mg/k gBB	-4.93250*	.59417	.000	-6.7673	-3.0977
18mg/k gBB	4.81000*	.59417	.000	2.9752	6.6448
18mg/k gBB K(-)	.29750	.59417	.986	-1.5373	2.1323
BB K(+)	-11.60000*	.59417	.000	-13.4348	-9.7652
4,5mg/k gBB	-9.74250*	.59417	.000	-11.5773	-7.9077
9mg/kg BB	-4.81000*	.59417	.000	-6.6448	-2.9752

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Persentase TNF-a

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		a	b	c	d
K(-)	4	.8225			
18mg/k gBB	4	1.1200			
9mg/kg BB	4		5.9300		
4,5mg/k gBB	4			10.8625	
K(+)	4				12.7200
Sig.		.986	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Signifikansi perbedaan terlihat pada notasi angka $\alpha=0,05\%$ yang berbeda

5. Uji Normalitas Data (*Kolmogorov-Smirnov Test*)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Persentase
N		20
Normal Parameters ^a	Mean	6.2910
	Std. Deviation	5.06074
Most Extreme Differences	Absolute	.231
	Positive	.231
	Negative	-.189
Kolmogorov-Smirnov Z		1.034
Asymp. Sig. (2-tailed)		.236

a. Test distribution is Normal.

- Berdasarkan uji normalitas, maka disimpulkan distribusi data bersifat normal.



Lampiran 12. Data Hasil Pengukuran Kadar Glukosa Darah Tikus

I. Sebelum Perlakuan

Kelompok Perlakuan	Tikus (mg/dL)			
	1	2	3	4
Kontrol negatif	92	80	87	84
Kontrol positif	87	90	98	85
Terapi 4,5mg/kgBB	96	88	81	87
Terapi 9mg/kgBB	92	89	90	90
Terapi 18mg/kgBB	80	87	83	94

II. Setelah Pemberian Diet Pakan Tinggi Glukosa

Kelompok Perlakuan	Tikus (mg/dL)			
	1	2	3	4
Kontrol negatif	90	84	83	85
Kontrol positif	112	121	112	117
Terapi 4,5mg/kgBB	115	123	116	118
Terapi 9mg/kgBB	127	106	124	114
Terapi 18mg/kgBB	124	113	112	111

III. Setelah Selesai Terapi Ekstak

Kelompok Perlakuan	Tikus (mg/dL)			
	1	2	3	4
Kontrol negatif	87	81	84	82
Kontrol positif	124	110	117	121
Terapi 4,5mg/kgBB	98	100	98	84
Terapi 9mg/kgBB	102	90	101	88
Terapi 18mg/kgBB	94	86	87	96