

**Karakterisasi Ekstrak Etanol Akar Pletekan  
(*Ruellia tuberosa L.*) menggunakan LC-MS dan  
Pengaruhnya terhadap Aktivitas Enzim Amilase  
dan Lipase pada Serum Tikus (*Rattus norvegicus*)  
yang Diinduksi MLD-STZ**

**SKRIPSI**

Oleh :

**NINGRUM ARROCHMAH**  
**145090201111004**



**JURUSAN KIMIA**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**  
**MALANG**  
**2018**



**Karakterisasi Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) menggunakan LC-MS dan Pengaruhnya terhadap Aktivitas Enzim Amilase dan Lipase pada Serum Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi MLD-STZ**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains  
dalam bidang Kimia

Oleh :

**NINGRUM ARROCHMAH**  
**145090201111004**



**JURUSAN KIMIA**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**  
**MALANG**  
**2018**

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Karakterisasi Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) menggunakan LC-MS dan Pengaruhnya terhadap Aktivitas Enzim Amilase dan Lipase pada Serum Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi MLD-STZ

Oleh :

NINGRUM ARROCHMAH  
145090201111004

Setelah diseminarkan di depan Majelis Penguji pada  
tanggal **19 DEC 2018** dan dinyatakan memenuhi syarat  
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I

Anna Safitri, S.Si., M.Sc., Ph.D  
NIP. 19800813 200502 2 008

Pembimbing II

Dra. Anna Roosdiana , M.App, Sc  
NIP. 19580711 199203 2 002



Masruri, S.Si., M.Sc., Ph.D  
NIP. 19731020 200212 1 001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ningrum Arrochmah

NIM : 145090201111004

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi yang berjudul :

**Karakterisasi Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) menggunakan LC-MS dan Pengaruhnya terhadap Aktivitas Enzim Amilase dan Lipase pada Serum Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi MLD-STZ**

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang tercantum di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata tugas akhir 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 Desember 2018

Yang menyatakan,



Ningrum Arrochmah  
NIM. 145090201111004

# Karakterisasi Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa L.*) menggunakan LC-MS dan Pengaruhnya terhadap Aktivitas Enzim Amilase dan Lipase pada Serum Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi MLD-STZ

## ABSTRAK

Diabetes melitus merupakan penyakit gangguan metabolismik yang ditandai dengan hiperglikemia (peningkatan kadar glukosa darah). Akar tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa L.*) diduga mengandung senyawa antioksidan yang mampu mengurangi kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol akar pletekan menggunakan LC-MS dan pengaruh pemberian ekstrak tersebut terhadap aktivitas amilase dan lipase serum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi MLD-STZ. Injeksi MLD-STZ dengan dosis 20 mg/kgBB dapat menyebabkan tikus menderita diabetes melitus. Tikus dibagi dalam 5 kelompok yaitu kontrol negatif, kontrol positif, kelompok terapi dosis 250 mg/kgBB, 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB. Terapi diberikan selama 21 hari secara oral. Aktivitas amilase pada serum diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan aktivitas lipase menggunakan metode titrasi alkalimetri. Hasil karakterisasi ekstrak menunjukkan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol akar pletekan adalah senyawa flavonoid (cirsimaritin, cirsimarin, cirsiliol 4-glucoside dan sorbifolin). Pemberian terapi ekstrak etanol akar pletekan dosis 250, 375, 500 mg/kgBB mampu menurunkan aktivitas amilase berturut-turut sebesar 51,16 %, 36,56 %, 20,94 % dan aktivitas lipase sebesar 62,80 %, 41,55 %, 15,46 % dengan dosis terbaik dicapai pada 250 mg/kgBB.

**Kata kunci:** aktivitas amilase, aktivitas lipase, diabetes melitus, flavonoid, LC-MS, *Ruellia tuberosa L.*

# Characterization of Ethanol Root Extract of Pletekan (*Ruellia tuberosa L.*) using LC-MS and the Effect on Amylase and Lipase Activity in Serum of Multiple Low Dose-Streptozotocin (MLD-STZ) Induced Rats

## ABSTRACT

Diabetes mellitus is a metabolic disorder indicated by hyperglycemia (increasing blood glucose levels). Ethanol root extracts of pletekan contain antioxidant compounds which capable to reduce cell damages from free radicals. This study aims to determine secondary metabolites compounds in ethanol root extract of pletekan (*Ruellia tuberosa L.*) using LC-MS technique, and to investigate the effect of ethanol root extract pletekan to the activities of amylase and lipase in rats serum (*Rattus norvegicus*) induced by MLD-STZ. The injection of MLD-STZ with doses 20 mg/kg body weight causes rats suffered from diabetes mellitus. Rats were divided into five groups, ie negative control, positive control, and 3 therapy groups with doses of 250, 375, and 500 mg/kg body weights. Therapy was given orally for 21 days. Activity of amylase on blood serum was determined using UV-Vis spectrophotometry and the activity of lipase was measured using alkalimetric titration methode. The results of extract characterizations showed that the secondary metabolites compounds contained in ethanol root extract of pletekan were flavonoid (cirsimarinin, cirsimarin, cirsiliol 4-glucoside and sorbifolin) compound. Therapy with ethanol root extract of pletekan doses of 250, 375, 500 mg/kg body weight showed that amylase activity decreased by 51.16 %, 36.56 %, 20.94 % and lypase activity decreased by 62.80 %, 41.55 %, 15.46 % with the best dose achieved at 250 mg/kg body weight.

**Keywords:** amylase activity, lipase activity, diabetes mellitus, flavonoid, LC-MS, *Ruellia tuberosa L.*

## KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah yang telah melimpahkan rahmat, berkah, dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Karakterisasi Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) menggunakan LC-MS dan Pengaruhnya terhadap Aktivitas Enzim Amilase dan Lipase pada Serum Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi MLD-STZ”** ini sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, FMIPA, Universitas Brawijaya, Malang. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW dan ummatnya hingga akhir zaman.

Penyusunan skripsi ini tidak dapat terselesaikan dengan baik tanpa bantuan dan kerjasama dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada :

1. Anna Safitri, S.Si., M.Sc., Ph.D dan Dra. Anna Roosdiana, M.App, Sc selaku dosen pembimbing yang telah membimbing, memberikan pengetahuan, dukungan dan masukan kepada penulis selama penyusunan skripsi.
2. Dr. Drs. Edi Priyo Utomo, MS selaku dosen penasehat akademik yang telah memberikan arahan, dukungan serta nasehat selama masa studi.
3. Dosen penguji seminar proposal, kemajuan dan tugas akhir atas saran kepada penulis.
4. Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D selaku Ketua Jurusan Kimia beserta segenap Staf Pengajar dan Karyawan Jurusan Kimia.
5. Bapak Maryono selaku laboran Biokimia yang telah membantu dalam menyediakan alat dan kebutuhan lain selama penelitian.
6. Bapak Murdianto, Ibu Siti Ngaisah, Kakak Saiful Ma’arif dan Fina Mutoharoh beserta seluruh keluarga yang selalu mendoakan dan memberikan semangat serta dukungan moril dan materil.
7. Tim Pletekan (Pretty Septiana, Istoria Rosyada, Siti Sumadyah N.A., Cindy Alvionita E, Zulfatul Muzayyana dan Resti Rachmawanti) yang telah membantu dan memberikan dukungan selama pelaksanaan penelitian

8. Seluruh sahabatku Alimah Azmi, Reiza Tri Suciani P.S., Hannisa Triesani M., Melinda Novitasari, Revina Intan N.P., Niksi Tri Yuliati dan juga teman-teman Kimia Angkatan 2014, LBO 2016, Inkakasu HMK UB 2017 serta berbagai pihak yang telah mendukung penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini, mohon maaf apabila terdapat kesalahan. Semoga skripsi ini dapat memberi manfaat dan pengetahuan kepada pembaca.

Malang, 21 Desember 2018

Penulis



## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b>	i
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b>	ii
<b>LEMBAR PERNYATAAN</b>	iii
<b>ABSTRAK</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>KATA PENGANTAR</b>	vi
<b>DAFTAR ISI</b>	viii
<b>DAFTAR TABEL</b>	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b>	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b>	xii
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL</b>	xiii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 <i>Ruellia tuberosa</i> L.	5
2.2 Senyawa Fitosterol dan Flavonoid	6
2.3 Karakterisasi LC-MS	7
2.4 Diabetes Melitus	8
2.5 Patogenesis Diabetes Melitus Tipe 1	9
2.6 <i>Streptozotocin</i>	9
2.7 ROS dan Radikal Bebas	10
2.8 Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> )	11
2.9 Serum	12
2.10 Enzim Lipase	12
2.11 Enzim Amilase	13
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	15
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	15
3.2.1 Alat Penelitian	15
3.2.2 Bahan Penelitian	15
3.3 Tahapan Penelitian	15
3.4 Prosedur Penelitian	16

3.4.1 Penyiapan Hewan Coba	16
3.4.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Akar Pletekan	16
3.4.3 Pembuatan Larutan MLD-STZ dan Injeksi IP	17
3.4.4 Pengukuran Kadar Glukosa Darah	17
3.4.5 Penentuan Dosis Terapi dan Terapi Hewan Coba	17
3.4.6 Pengambilan dan Isolasi Serum	18
3.4.7 Isolasi Amilase dan Lipase	18
3.4.8 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	18
3.4.9 Pembuatan Kurva Baku	19
3.4.10 Penentuan Aktivitas Amilase dalam Serum	19
3.4.11 Penentuan Aktivitas Lipase dalam Serum	20
3.4.12 Analisis Data	20
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Akar Pletekan	21
4.2 Karakterisasi Ekstrak menggunakan LC-MS	21
4.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak terhadap Aktivitas Amilase	24
4.4 Pengaruh Pemberian Ekstrak terhadap Aktivitas Lipase	27
<b>BAB V PENUTUP</b>	
5.1 Kesimpulan	31
5.2 Saran	31
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	
<b>LAMPIRAN</b>	
	33
	41

**DAFTAR TABEL**

Tabel 4.1	: Interpretasi Hasil LC-MS Senyawa Flavonoid	23
Tabel 4.2	: Aktivitas Amilase kelompok negatif, positif, terapi dosis 250 mg/kgBB, 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB	26
Tabel 4.3	: Aktivitas Lipase kelompok negatif, positif, terapi dosis 250 mg/kgBB, 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB	28

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	: Tanaman <i>Ruellia tuberosa</i> L.	5
Gambar 2.2.1	: Struktur $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, kampesterol	6
Gambar 2.2.2	: Struktur Flavonoid	7
Gambar 2.6	: <i>Streptozotocin</i>	10
Gambar 2.8	: <i>Rattus norvegicus</i>	11
Gambar 4.1	: Kromatogram prediksi senyawa sorbifolin, cirsimarinin, cirsimarin dan cirsiliol 4-glucoside	25
Gambar 4.2	: Perkiraan mekanisme reaksi flavonoid menetralkan radikal bebas	29

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A.	Sertifikat Laik Etik	41
Lampiran B.	Surat Determinasi	42
Lampiran C.	Skema Kerja Penelitian Secara Umum	43
Lampiran D.	Perhitungan dan Preparasi Larutan	44
D.1	Perhitungan Dosis Terapi	44
D.2	Pembuatan Larutan Asam Sitrat 0,2 M	44
D.3	Pembuatan Larutan Natrium Sitrat 0,2 M	44
D.4	Pembuatan Larutan Buffer Sitrat Ph 4,5	45
D.5	Pembuatan Larutan Stok STZ	45
D.6	Perhitungan Dosis Larutan STZ	45
D.7	Pembuatan Larutan DNS	46
D.8	Pembuatan Substrat Amilum (1%)	46
Lampiran E.	Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Akar Pletekan terhadap Aktivitas Amilase	46
Lampiran F.	Penentuan Kurva Baku Glukosa	47
Lampiran G.	Pengukuran Aktivitas Amilase	48
Lampiran H.	Hasil Uji Statistik Aktivitas Amilase	53
Lampiran I.	Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Akar Pletekan terhadap Aktivitas Lipase	54
Lampiran J.	Hasil Uji Statistik Aktivitas Lipase	56

## DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL

### Singkatan

DM	Diabetes Melitus
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
STZ	<i>Streptozotocin</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
MDA	Malondialdehid
MLD-STZ	<i>Multiple Low Dose-Streptozotocin</i>
GLUT 2	<i>Glucose Transporter 2</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
XOD	Xantin Oksidase
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultraviolet
hCG	<i>Hormon chrorionic gonadotropin</i>
HSL	<i>Hormon sensitive lypase</i>
HL	<i>Hepatic lipase</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
BNJ	Beda Nyata Jujur

### Simbol

$\beta$	Beta
$\alpha$	Alfa
$\gamma$	Gamma
mL	Mililiter
mg	Miligram
mg/dL	Miligram/desiliter
mg/kgBB	Miligram/kilogram berat badan
$\mu\text{L}$	Mikroliter
$\mu\text{mol}$	Mikromol

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus (DM) adalah salah satu penyakit degeneratif dengan prevalensi paling banyak [1]. Data IDF (*International Diabetes Federation*) menunjukkan pada tahun 2013, Indonesia menempati peringkat ke-7 di dunia dengan penyandang DM sebesar 7,6 juta orang dan naik dua peringkat menjadi peringkat ke-5 di dunia pada tahun 2014 dengan total 9,1 juta orang penyandang DM. Diperkirakan pada tahun 2035 jumlah penderita DM akan meningkat sebesar 529 juta orang dimana 175 juta diantaranya belum terdiagnosis sehingga terancam berkembang progresif menjadi komplikasi tanpa disadari dan tanpa pencegahan [2].

Diabetes melitus merupakan kelainan metabolism yang ditandai dengan hiperglikemia dan berhubungan dengan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak dan protein [3]. DM terjadi akibat insufisiensi fungsi insulin yang disebabkan oleh gangguan atau defisiensi produksi insulin oleh sel-sel  $\beta$  Langerhans kelenjar pankreas, atau disebabkan oleh kurang responsifnya sel-sel tubuh terhadap insulin [4]. DM tipe 1 disebabkan suatu proses autoimun yang merusak sel  $\beta$  pankreas sehingga produksi insulin berkurang atau bahkan berhenti [5]. Oleh karenanya penderita DM tipe ini sangat bergantung pada insulin untuk kelangsungan hidupnya [6]. Sebagian besar penderita DM tipe 1 adalah anak-anak dengan usia terbanyak 6-10 tahun. Kerusakan sel  $\beta$  pankreas dapat disebabkan oleh kelainan genetik, infeksi virus atau pemberian senyawa kimia bersifat racun [5].

*Streptozotocin* (STZ) merupakan senyawa toksik yang memicu kerusakan sel  $\beta$  pankreas. STZ berperan dalam pembentukan radikal bebas atau *Reactive Oxygen Species* (ROS) oleh donor *nitric oxide* (NO) [7]. ROS yang berlebihan memicu stres oksidatif yaitu suatu kondisi ketika produksi oksidan atau ROS melebihi kapasitas antioksidan dalam tubuh sehingga akan mengarahkan pada oksidasi molekul-molekul penting dalam tubuh. Stres oksidatif dapat memperparah kerusakan sel  $\beta$  pankreas [8], kerusakan pada sel asinar dan menyebabkan degenerasi serta kematian pada sel.

Kerusakan pada sel asinar menyebabkan aktivitas enzim terganggu [9]. Sel asinar atau eksokrin pankreas membantu dan berperan penting dalam sistem pencernaan dengan mensekresikan enzim-enzim pankreas seperti amilase dan lipase [10]. Enzim amilase berperan dalam mengkatalisis proses hidrolisa pati menghasilkan molekul sederhana seperti glukosa sehingga dapat diubah tubuh menjadi energi [11]. Sedangkan lipase merupakan enzim yang menghidrolisis ikatan ester seperti trigliserida menjadi asam lemak bebas dan gliserol [12]. Kerusakan pankreas menunjukkan peradangan pankreas eksokrin dan endokrin atau dikenal sebagai pankreatitis atau inflamasi pankreas [13]. Inflamasi pankreas yang progresif menyebabkan kerusakan pankreas yang irreversibel serta mengakibatkan disfungsi eksokrin dan endokrin. Selain itu inflamasi pankreas juga dikaitkan dengan peningkatan dan penurunan aktivitas amilase dan atau lipase [2,4].

Pengembangan penelitian tanaman yang berpotensi sebagai obat diabetes sangat diperlukan karena pengobatan tradisional mempunyai efek samping yang rendah [14]. Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai tanaman obat dan banyak ditemukan di Indonesia adalah tanaman *Ruellia tuberosa* L. atau lebih dikenal sebagai tanaman pletekan. Dalam pengobatan tradisional tanaman ini dapat digunakan sebagai diuretik, antipiretik, antidiabetik, analgesik, antihipertensi dan agen antidotum [15].

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya [16] diketahui dalam ekstrak etanol akar pletekan mengandung senyawa fitosterol jenis stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, dan kampesterol. Selain itu terdapat steroid, flavonoid, fenolik dan asam askorbat. Kandungan fitosterol dalam suatu tanaman sendiri berkhasiat meluruhkan kencing (diuretik) dan menurunkan kadar glukosa darah (hipoglikemik) diduga karena peran senyawa aktif diantaranya  $\beta$ -sitosterol dan stigmaterol [17]. Senyawa ini bermanfaat dalam merangsang sekresi insulin dari pankreas sehingga kadar glukosa darah turun [18].

Tanaman pletekan diketahui mengandung beberapa jenis flavonoid diantaranya cirsimaritin, cirsimarin, cirsiliol 4-glucoside, dan sorbifolin. Senyawa flavonoid digunakan sebagai antioksidan karena dapat mendonorkan elektronnya atau berperan sebagai reduktan [15]. Menurut Amri (2014), ekstrak etanol 70 % pletekan mempunyai aktivitas biologis yang dapat menghambat enzim  $\alpha$ -

glukosidase yang mengakibatkan kadar glukosa darah tidak terbentuk secara berlebihan, sehingga ekstrak etanol 70 % pletekan berkhasiat sebagai antidiabetes [19].

Berbagai penelitian tentang ekstrak etanol akar pletekan telah dilakukan, diantaranya adalah pengaruh pemberian ekstrak etanol akar pletekan terhadap aktivitas protease dalam serum dan pankreas, profil protein dalam serum dan pankreas, kadar MDA dalam serum dan pankreas, aktivitas amilase dan lipase dalam pankreas serta kandungan fitosterol dalam ekstrak menggunakan LC-MS. Sehingga perlu dilakukan penelitian tentang kandungan senyawa metabolit sekunder lain pada tanaman pletekan yang berperan sebagai antioksidan alami menggunakan LC-MS dan pengaruh pemberian ekstrak etanol akar pletekan terhadap aktivitas enzim amilase dan lipase pada serum tikus yang diinduksi MLD-STZ.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dirumuskan beberapa permasalahan dalam penelitian ini:

1. Bagaimanakah kandungan ekstrak etanol akar pletekan yang dikarakterisasi menggunakan LC-MS?
2. Bagaimanakah aktivitas enzim amilase pada tikus model diabetes melitus akibat induksi MLD-STZ setelah pemberian ekstrak etanol akar pletekan ?
3. Bagaimanakah aktivitas enzim lipase pada tikus model diabetes melitus akibat induksi MLD-STZ setelah pemberian ekstrak etanol akar pletekan ?

## 1.3 Batasan Masalah

Berdarkan uraian rumusan masalah, maka batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain Wistar berusia 2 bulan dengan berat badan rata-rata 200 g sebanyak 20 ekor. Penggunaan hewan coba tersebut telah menyertakan sertifikat laik etik No. 873-KEP-UB dari komisi etik penelitian UB

2. Dosis MLD-STZ yang digunakan adalah 20 mg/kg BB tikus per hari selama 5 hari berturut-turut. Tikus dianggap mengalami diabetes apabila kadar glukosa dalam darah melebihi 200 mg/dL [20]
3. Terapi ekstrak etanol akar pletekan dengan dosis 250 mg/kg BB, 375 mg/kg BB, dan 500 mg/kg BB diberikan pada hewan coba sebanyak 1x3 mL sehari secara oral (sonde) selama 21 hari
4. Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah karakterisasi ekstrak etanol akar pletekan menggunakan LC-MS, uji aktivitas enzim amilase dan lipase dalam serum tikus yang diinduksi MLD-STZ.

#### **1.4 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui kandungan flavonoid ekstrak etanol akar pletekan menggunakan LC-MS.
2. Mempelajari pengaruh pemberian ekstrak etanol akar pletekan terhadap aktivitas enzim amilase pada serum tikus yang diinduksi MLD-STZ
3. Mempelajari pengaruh pemberian ekstrak etanol akar pletekan terhadap aktivitas enzim lipase pada serum tikus yang diinduksi MLD-STZ

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

Dari penelitian ini diharapkan mampu memberikan pengetahuan terkait ekstrak etanol akar pletekan yang berpotensi sebagai tanaman antidiabetik.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Ruellia tuberosa* L.

*Ruellia tuberosa* L. (**Gambar 2.1**) atau lebih sering dikenal dengan nama pletekan diklasifikasikan sebagai berikut [21]:

Kingdom	:	Plantae
Divisi	:	Spermatophyta
Sub divisi	:	Angiospermae
Kelas	:	Dicotyledoneae
Bangsa	:	Solanales
Familia	:	Acanthaceae
Marga	:	<i>Ruellia</i>
Jenis	:	<i>Ruellia tuberosa</i> L.



**Gambar 2.1** Akar tanaman pletekan

Pletekan merupakan tumbuhan *perennial* (tumbuhan yang hidup lebih dari 2 tahun) dengan daun sederhana berbentuk elips. Tanaman ini tumbuh baik pada daerah yang memiliki intensitas cahaya rendah dan lembab [21]. Pletekan mudah didapatkan dan banyak tumbuh di tepi jalan, pematang sawah atau pada semak-semak. Tumbuhan tropis ini tersebar secara luas di Asia Tenggara. Dalam pengobatan tradisional, pletekan dapat digunakan sebagai diuretik, antipiretik, antidiabetik, analgesik, antihipertensi dan agen antidotum [15].

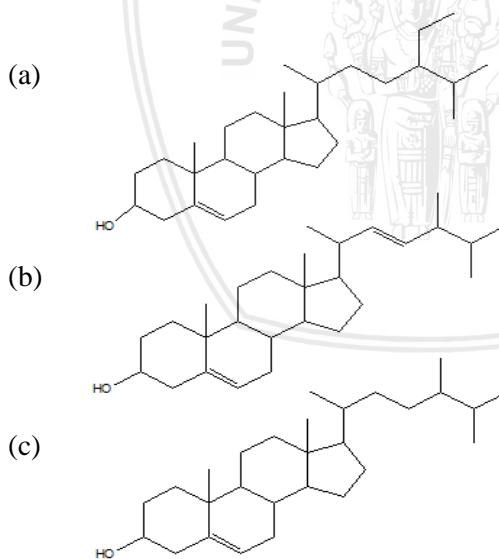
Kandungan senyawa bioaktif dalam tanaman pletekan terdapat hampir di semua bagian tanaman. Pada daun mengandung apigenin dan luteolin, bunga mengandung malvidin 3-5-diglukosida, kuncup bunga mengandung proporsi maksimum flavonoid (3%

apigenin-7-O-glucoronide dan flavon), sedangkan umbi akar mengandung n-alkana, triterpenoid dan fitosterol [22].

Komponen utama yang terdeteksi dalam ekstrak etanol dari akar pletekan diantaranya adalah lupeol (68,14%), stigmasterol (8,89%), usosterol (3,99%), sukrosa (2,24%), 3-bromo-Cholest-5-ene (2,24%), 2 metil oktadekana (2,10%), 2 metil nonadekana (1,93%), 2 metil eikosana (1,79%) dan heptakosana(1,43%) [23].

## 2.2 Senyawa Fitosterol dan Flavonoid Sebagai Antioksidan Alami

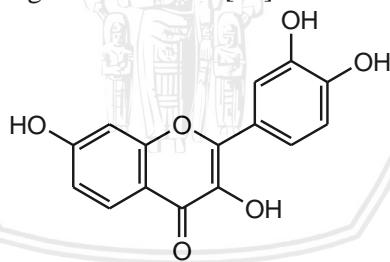
Fitosterol merupakan sterol nabati dengan struktur mirip kolesterol. Fitosterol terdiri dari 28 hingga 30 atom dengan steroid sebagai rangka struktur dengan gugus hidroksil menempel pada C-3 dari cincin A dan rantai alifatik pada atom C-17 dari cincin D. Terdapat 3 macam senyawa yang biasa disebut sebagai “fitosterol” yaitu sitosterol (dikenal sebagai  $\beta$ -sitosterol), stigmasterol dan kampesterol [24]. Perbedaan struktur masing-masing sterol terletak pada posisi dan jumlah ikatan rangkap serta struktur dan jumlah rantai karbon yang terikat pada C17-nya [25].



Gambar 2.2.1 (a) Struktur  $\beta$ -sitosterol, (b) Stigmasterol, (c) Kampesterol

Kandungan fitosterol dalam suatu tanaman berkhasiat meluruhkan kencing (diuretik) dan menurunkan kadar glukosa darah (hipoglikemik) diduga karena peran senyawa aktif diantaranya  $\beta$ -sitosterol dan stigmaterol [17]. Senyawa ini bermanfaat dalam merangsang sekresi insulin dari pankreas sehingga kadar glukosa darah turun [18]. Stigmaterol merupakan jenis sterol tumbuhan yang berpotensi sebagai antioksidan serta mempunyai sifat menghambat hipoglikemia [26]. Sedangkan  $\beta$ -sitosterol dan kampesterol bermanfaat dalam menurunkan kolesterol karena memiliki struktur kimia yang hampir sama dengan kolesterol sehingga bisa menghambat absorpsi kolesterol oleh darah sehingga dapat diekskresikan keluar tubuh [27].

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang banyak ditemukan dalam tanaman. Tanaman pletekan diketahui mengandung beberapa jenis flavonoid diantaranya cirsimaritin, cirsimarin, cirsiliol 4-glucoside, sorbifolin dan pedalitin[15]. Senyawa fenolik memiliki kemampuan sebagai antioksidan karena dapat menangkap radikal bebas dengan adanya ikatan rangkap terkonjugasi serta gugus hidroksil (-OH) pada strukturnya. Flavonoid bersifat sebagai antioksidan yang menghambat radikal bebas hidroksi dan superokksida sehingga dapat melindungi lipid membran terhadap reaksi radikal bebas yang bersifat toksik [28].



Gambar 2.2.2 Struktur flavonoid

### 2.3 Karakterisasi LC-MS

LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) merupakan teknik analisis kimia yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair (HPLC) dengan kemampuan analisis masa dari spektrometri massa sebagai detektor. LC-MS mempunyai kelebihan diantaranya adalah hasil analisis yang khas

dan spesifik, aplikasi yang luas dengan sistem yang praktis, tingkat fleksibilitas tinggi, kaya informasi karena sejumlah data kuantitatif maupun kualitatif dapat diperoleh disebabkan seleksi ion yang sangat cepat dengan banyak parameter. Spektrofotometer massa bekerja dengan molekul pengion yang kemudian akan memilah dan mengidentifikasi ion menurut massa, yang disesuaikan dengan rasio fragmentasinya. Komponen penting dalam proses ini adalah sumber ion (*ion source*) yang akan menghasilkan ion dan analisis massa (*mass analyzer*) yang menseleksi ion. Sistem HPLC umumnya menggunakan beberapa jenis *ion source* dan *mass analyzer* yang dapat disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dianalisa [29].

## 2.4 Diabetes Melitus

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit gangguan metabolismik menahun yang diakibatkan oleh pankreas tidak memproduksi cukup insulin atau tubuh tidak dapat menggunakan insulin yang diproduksi secara efektif. Insulin sendiri merupakan hormon yang berfungsi mengatur keseimbangan kadar gula darah. Sehingga apabila insulin tidak bekerja secara efektif mengakibatkan peningkatan konsentrasi gula dalam darah (hiperglikemia) [2].

Diabetes melitus dapat dibagi menjadi DM tipe 1, DM tipe 2, diabetes gestational dan diabetes melitus tipe khusus. Namun sebagian besar kasus DM terbagi dalam 2 kategori *etiopatogenetik*. Kategori pertama yaitu diabetes tipe 1 atau *insulin dependent diabetes mellitus* dan kategori kedua yaitu diabetes tipe 2 atau *non-insulin dependt diabetes mellitus* [30].

DM tipe 1 ditandai dengan kegagalan produksi insulin oleh sel-sel  $\beta$  pankreas [3]. Faktor penyebab DM tipe 1 adalah invaski virus dan reaksi autoimun (rusaknya sistem kekebalan tubuh) yang merusak sel-sel penghasil insulin (sel  $\beta$  pankreas) [6]. Sehingga kekurangan sekresi insulin yang berakibat pada kadar glukosa dalam darah meningkat [31]. Kegagalan atau penurunan sel  $\beta$  pankreas dalam memproduksi insulin dapat disebabkan oleh stres, glukotoksisitas dan lipotoksisitas [32].

DM tipe 2 ditandai dengan resistensi insulin yaitu keadaan dimana sel dalam tubuh tidak dapat menggunakan insulin dengan baik atau ketika hormon insulin diproduksi dengan bentuk yang tidak

efektif. Pada diabetes tipe ini terdapat korelasi genetik yang kuat dan berkaitan erat dengan obesitas [3]. DM tipe 2 disebabkan oleh kombinasi resistensi insulin dan disfungsi sekresi insulin sel  $\beta$ . Diabetes melitus gestational merupakan diabetes yang dialami oleh ibu hamil yang disebabkan oleh peningkatan sekresi berbagai hormon sehingga menimbulkan efek metabolismik terhadap toleransi glukosa. Diabetes tipe ini dapat hilang setelah proses persalinan selesai. Diabetes tipe khusus merupakan diabetes yang jarang ditemukan, dapat disebabkan oleh cacat genetik pada kerja insulin, cacat genetik dari sel  $\beta$  pankreas, penyakit pankreas atau karena obat tertentu [33].

## 2.5 Patogenesis Diabetes Melitus Tipe 1

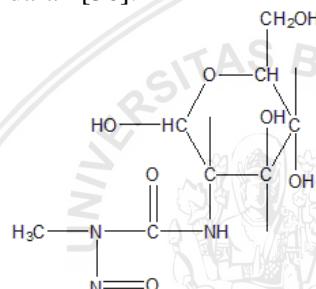
Diabetes Melitus tipe 1 merupakan penyakit autoimun kronis yang berhubungan dengan ketidakmampuan produksi insulin akibat kehancuran selektif sel  $\beta$  pankreas oleh proses autoimun [6]. Patogenesis DM tipe 1 berkembang sebagai akibat dari faktor genetik, lingkungan dan faktor imunologi yang menghancurkan sel-sel  $\beta$ -pankreas [34]. Kerusakan sel  $\beta$  menyebabkan produksi insulin berkurang [6]. Insulin sendiri merupakan hormon yang dilepaskan oleh pankreas yang bertanggungjawab mempertahankan kadar gula darah dalam tubuh agar tetap seimbang. Insulin berfungsi sebagai hormon yang membantu gula berpindah ke dalam sel sehingga bisa menghasilkan energi atau disimpan sebagai cadangan energi [35]. Gejala DM tidak akan muncul pada seorang individu hingga  $\pm 80\%$  sel  $\beta$ -pankreas dihancurkan. DM tipe 1 banyak diderita oleh anak-anak dan bermanifestasi saat remaja yang berprogres seiring bertambahnya umur [34].

## 2.6 Streptozotocin

*Streptozotocin* (**Gambar 2.6**) merupakan glukosa beracun yang umumnya terakumulasi dalam sel  $\beta$  pankreas melalui glukosa transporter 2 (GLUT2) [36]. *Streptozotocin* (STZ) dapat menyebabkan kerusakan pada pulau Langerhans sehingga terjadi defisiensi insulin yang berakibat pada peningkatan kadar glukosa darah. Kerusakan ini disebabkan oleh pembentukan radikal bebas *nitric oxide* (NO) yang menyebabkan peningkatan aktivitas *guanil siklase* yang memicu terjadinya alkilasi DNA. Selain itu

pembentukan radikal bebas NO dapat menyebabkan penurunan konsumsi *adenosine triphosphate* (ATP) mitokondria sehingga meningkatkan aktivitas *xantin oksidase* (XOD) yang akan mengkatalisis pembentukan radikal bebas. Alkilasi DNA dan radikal bebas ini menyebabkan terjadinya deplesi energi sel sehingga mendorong terjadinya nekrosis atau kerusakan sel  $\beta$  pulau Langerhans pankreas [37].

STZ merupakan salah satu stresor atau rangsangan bagi hewan coba DM yang lebih baik daripada aloksan karena rentang dosisnya yang lebih lebar. Selain itu tikus dapat mempertahankan hiperglikemia lebih lama. Pemberian STZ secara berkala dapat mempengaruhi fisiologis yaitu pembengkakan pada kelenjar pankreas yang mengakibatkan perubahan produksi insulin atau peningkatan glukosa darah [36].



Gambar 2.6 Streptozotocin

## 2.7 ROS dan Radikal Bebas

Salah satu faktor yang memicu penyakit DM adalah banyaknya radikal bebas atau *Reactive Oxigen Species* (ROS) [8]. ROS merupakan senyawa oksigen yang tidak stabil dan sangat reaktif karena mengandung 1 elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. ROS hanya dapat bertahan dalam hitungan *millisecond* ( $10^{-9}$  –  $10^{-10}$ ) sebelum bereaksi dengan molekul lain untuk menstabilkan diri [38]. Kestabilan atom atau molekulnya diperoleh dengan cara kecenderungan ROS menarik elektron dari molekul-molekul penting disekitarnya seperti lipid, protein dan DNA untuk memperoleh pasangan elektron. Hal ini dapat membahayakan jaringan dan menyebabkan kematian sel [8].

Tubuh secara fisiologis dapat menghasilkan ROS (radikal bebas atau oksidan) yang berasal dari fagosit, mitokondria,

perokisisime, xantin oksidase dan sebagainya [39]. Selain itu ROS juga dapat bersumber dari faktor luar yaitu radiasi sinar rontgen dan sinar ultraviolet yang dapat melisiskan air menjadi radikal OH. Macam-macam ROS yang memiliki efek berbahaya dan dapat merusak adalah superoksida ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hydroxyl ( $\cdot\text{OH}$ ) dan perhydroxyl ( $\cdot\text{O}_2\text{H}$ ). Serangan ROS dapat menyebabkan kerusakan jaringan yang disebut dengan stres oksidatif [37]. Stres oksidatif terjadi apabila rasio antara radikal bebas lebih besar daripada antioksidan [8]. Radikal bebas ini dapat merusak membran sel dan mengganggu berbagai fungsi tubuh diantaranya kerusakan pada DNA, karbohidrat, protein dan lipid [40]. Stres oksidatif pada DM dapat meningkatkan pembentukan ROS didalam mitokondria yang mengakibatkan berbagai kerusakan oksidatif. Hal ini dapat menyebabkan timbulnya komplikasi dan memperparah diabetes [41]. Tingginya stres oksidatif dapat dipengaruhi oleh faktor internal yaitu genetik, umur, oksidasi fosforilasi dan proses patofisiologi. Sedangkan faktor eksternal dapat berasal dari asupan makanan, patogen, sinar UV dan bahan kimia [42].

## 2.8 Tikus (*Rattus norvegicus*)

Penelitian ini menggunakan hewan percobaan yaitu tikus putih galur Wistar (**Gambar 2.8**) :



**Gambar 2.8 *Rattus norvegicus***

Taksonomi tikus putih adalah sebagai berikut [44]:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia

Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Tikus putih memiliki beberapa sifat yang menguntungkan sebagai hewan percobaan diantaranya adalah perkembangbiakan cepat, mempunyai ukuran yang lebih besar dari mencit, dan mudah dipelihara dalam jumlah banyak [43]. Selain itu tikus putih adalah hewan mamalia yang memiliki organ tidak jauh berbeda dengan manusia [44]. Ciri-ciri morfologis tikus putih diantaranya albino, kepala kecil, memiliki ekor yang lebih panjang dibandingkan badannya, pertumbuhan cepat, cukup tahan terhadap perlakuan dan memiliki berat rata-rata berkisar 200-250 g untuk tikus dewasa [43].

## 2.9 Serum

Darah terbagi atas dua bagian yaitu serum dan plasma. Serum merupakan bagian cair dari darah atau cairan yang tidak mempunyai zat pembekuan, sehingga tidak membutuhkan antikoagulan untuk pemisahannya. Jumlah serum lebih sedikit jika dibandingkan dengan plasma. Serum mengandung protein, elektrolit, antibodi, antigen dan hormon. Serum dapat digunakan untuk berbagai tes diagnostik seperti penentuan kadar hCG, kolesterol, protein, gula dalam darah dan lain-lain. Serum darah memiliki antigen lebih dari darah atau plasma sehingga lebih efektif digunakan untuk tes diagnostik. Antikoagulan dalam plasma atau darah dapat mengganggu reaksi kimia yang digunakan untuk mengukur konstituen darah karena antikoagulan dapat menarik air keluar sel, menipiskan sampel dan mengubah hasil tes [45].

## 2.10 Enzim Lipase

Lipase merupakan enzim yang menghidrolisis ikatan ester seperti trigliserida, digliserida dan monoglisirida menjadi asam lemak bebas dan gliserol. Proses hidrolisis terjadi karena adanya enzim trigliserid lipase. Terdapat 3 jenis enzim trigliserid lipase yaitu LPL yang terdapat pada endotelium vaskular, hormon sensitive lipase (HSL) di sel adiposa dan hepatic lipase (HL) di hati. Kerja enzim lipase sangat bergantung pada jumlah insulin. Dalam jaringan

adiposa, insulin menekan kerja enzim HSL, semakin rendah kadar insulin makin aktif kerja dari hormon tersebut [12].

Kadar trigliserida dalam darah dapat dipengaruhi oleh beberapa sebab diantaranya adalah stres yang dapat mengaktifkan saraf simpatik yang menyebabkan pelepasan epinefrin dan norepinefrin yang akan meningkatkan konsentrasi asam lemak bebas dalam darah serta meningkatkan tekanan darah. Kadar hormon dalam darah juga akan mempengaruhi kadar trigliserida darah. Hormon tersebut antara lain hormon tiroid menginduksi peningkatan asam lemak bebas dalam darah, namun menurunkan kadar trigliserida darah. Hormon insulin menurunkan kadar trigliserida darah karena insulin akan mencegah hidrolisis trigliserida, hormon estrogen, menurunkan kolesterol LDL dan meningkatkan kolesterol HDL [46].

Penurunan produksi insulin mengakibatkan kerja beberapa enzim untuk melakukan metabolisme lemak yaitu enzim lipoprotein lipase dan lipase sensitive hormon terganggu. Enzim lipoprotein lipase yang menghidrolisis trigliserida dalam sirkulasi tidak terinduksi sedangkan enzim lipase sensitive hormon yang menghidrolisis trigliserida dalam jaringan tidak terhambat. Akibatnya kadar lemak dalam sirkulasi darah meningkat dan kadar lemak dalam jaringan adiposa menurun [47].

## 2.11 Enzim Amilase

Amilase merupakan enzim yang mampu mengkatalisis proses hidrolisa pati menghasilkan molekul lebih sederhana seperti glukosa, maltosa dan dekstrin. Proses hidrolisa pati merupakan pemutusan ikatan glikosidik pada rantai polimernya oleh suatu reaktan yang dibantu oleh air. Proses ini dilakukan melalui tiga tahap yaitu gelatinisasi, likuifikasi dan sakarifikasi yang memerlukan energi relatif tinggi [11].

Kelompok enzim amilase memiliki banyak variasi dalam aktivitasnya, sangat spesifik tergantung pada tempatnya bekerja. Enzim amilase diklasifikasikan berdasarkan cara memotong ikatan glicosidic. Alpha( $\alpha$ )-amilase merupakan endoamilase yang menghidrolisis  $\alpha$  1,4-glikosidik secara acak menghasilkan dekstrin, oligosakarida dan monosakarida. Beta( $\beta$ )-amilase dan gamma( $\gamma$ )-amilase termasuk dalam exoamylase yang menghidrolisis  $\alpha$  1,4-

glikosidik linkage hanya dari non pereduksi ujung rantai polisakarida luar [48].

Peningkatan kadar amilase yang tinggi disertai dengan peningkatan kadar pada glukosa darah disebabkan fungsi amilase yang mengubah pati menjadi glukosa. Salah satu cara menanggulangi tingginya konsentrasi gula dalam darah yaitu dengan cara menghambat kerja enzim yang menghidrolisis karbohidrat sehingga mengurangi absorpsi gula. Enzim  $\alpha$ -amilase berperan penting dalam pemecahan oligosakarida dan disakarida menjadi monosakarida. Penghambatan enzim  $\alpha$  amilase dapat menunda dan memperlama waktu cerna karbohidrat, menyebabkan penurunan laju absorpsi glukosa dan mencegah peningkatan kadar plasma glukosa postprandial [49].



## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Brawijaya, Malang, pada bulan Februari sampai Juni 2018.

#### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

##### 3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat bak pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat bedah, *blood strip*, *microtube*, *spuit*, jarum sonde, seperangkat alat gelas (erlenmeyer, labu ukur, tabung reaksi, pipet tetes, gelas kimia, batang pengaduk, corong gelas, gelas arloji), neraca analitik, bejana maserasi, kertas saring, *rotary evaporator*, botol coklat, oven, botol semprot, *vortex*, lemari pendingin, seperangkat alat *sentrifuse*, inkubator, spektrofotometri UV-Vis, glucometer digital (Easy Touch GPU), mikro pipet, *yellow tip* dan *blue tip*, masker, tisu, sarung tangan, *vacutainer* merah, *plasticin*, buret dan statif, bola hisap, stirrer, pipet volume, *aluminium foil* dan instrumen LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) : UHPLC ACCELLA tipe 1250 merk *Thermo Scientific* dengan spektrometri massa TSQ QUANTUM ACCES MAX merk *Thermo Finnigan*.

##### 3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk akar pletekan yang diperoleh dari Materia Medika Batu, Malang, *Streptozotocin* (STZ), serum tikus (*Rattus norvegicus*), etanol, aquades, larutan PBS-Tween : PMSF (*Poly Methyl Sulfonil Fluoride*), buffer Tris-HCl pH 6,5 0,02 M, gum arabik, indikator *phenolptalein*, NaOH 0,05 M, amilum, air bebas reduktor, DNS.

#### 3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yaitu :

1. Penyiapan hewan coba
2. Pembuatan ekstrak etanol akar pletekan

3. Pembuatan larutan *Streptozotocin* (STZ) dan injeksi intraperitoneal (IP) pada hewan coba
4. Pengukuran kadar glukosa darah dengan glukometer
5. Penentuan dosis terapi dan terapi hewan coba menggunakan ekstrak etanol akar pletekan
6. Pengambilan darah dan isolasi serum
7. Isolasi enzim amilase dan lipase
8. Penentuan panjang gelombang maksimum glukosa
9. Pembuatan kurva baku glukosa
10. Penentuan aktivitas enzim amilase
11. Penentuan aktivitas enzim lipase
12. Analisa data

### **3.4 Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1 Penyiapan hewan coba**

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tikus putih galur wistar jantan berusia  $\pm$  2 bulan yang diperoleh dari Biosains, Universitas Brawijaya. Tikus putih berjumlah 20 ekor dengan berat masing-masing  $\pm$  200 g. Penelitian terbagi atas 5 kelompok perlakuan, yaitu kelompok I kontrol negatif, kelompok II kontrol positif DM, kelompok III terapi dosis 250 mg/kg BB, kelompok IV terapi dosis 375 mg/kg BB dan kelompok V terapi dosis 500 mg/kg BB. Tiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Hewan uji diaklimatisasi selama 1 minggu di Laboratorium Hewan Biosains.

#### **3.4.2 Pembuatan ekstrak etanol akar pletekan**

Ditimbang serbuk akar pletekan sebanyak 900 g. Serbuk tersebut selanjutnya dimaserasi menggunakan pelarut campuran etanol dan aquades dengan perbandingan 1 : 1 sebanyak 3 L. Selanjutnya didiamkan selama 1x24 jam dan didekantasi, kemudian ekstrak cair yang diperoleh di saring menggunakan kertas saring sehingga terpisah antara filtrat dan endapannya. Selanjutnya filtrat diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, 120 rpm hingga diperoleh ekstrak kental akar pletekan dan pelarut. Pelarut hasil evaporasi pertama digunakan untuk maserasi kedua dan seterusnya. Maserasi dan evaporasi dilakukan sebanyak 3x. Ekstrak

kental akar pletekan dimasukkan dalam wadah tertutup dan disimpan didalam lemari pendingin.

### **3.4.3 Pembuatan larutan MLD-STZ dan injeksi intraperitoneal (IP) pada hewan coba**

Serbuk STZ ditimbang menggunakan neraca analitik, kemudian dilarutkan dalam 4870  $\mu\text{L}$  buffer sitrat 0,1 M pH 4,5. Larutan di *vortex* hingga homogen dan disimpan pada temperatur 4 °C.

Larutan stok tersebut digunakan untuk injeksi pada hewan coba dimana volumenya disesuaikan dengan berat badan tikus. Dosis yang digunakan sebanyak 20 mg/kg BB per hari selama 5 hari berturut-turut. Injeksi STZ dilakukan dengan cara hewan uji diposisikan menghadap kearah frontal (atas) hingga terlihat bagian abdomennya. Pada bagian atas abdomen disemprot dengan alkohol 70 % dan dilakukan injeksi STZ secara perlahan, kemudian abdomen tikus disemprot kembali dengan alkohol 70 %. Tikus yang telah diinjeksi STZ diinkubasi selama 4 hari dan dilakukan pengecekan kadar glukosa darah setiap 7 hari sekali untuk mengetahui kondisi glukosa darah tikus tersebut. Tikus tergolong (+) DM apabila kadar glukosa darah  $\geq 200 \text{ mg/dL}$  [20].

### **3.4.4 Pengukuran kadar glukosa darah dengan glukometer**

Pengukuran kadar glukosa darah tikus dilakukan pada kelima kelompok perlakuan. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan setelah aklimatisasi (sebelum injeksi STZ), setelah inkubasi dan injeksi STZ, dan setiap 7 hari sekali selama 3 minggu proses terapi DM menggunakan ekstrak etanol akar pletekan. Pengukuran kadar glukosa dilakukan dengan cara ujung ekor tikus diusapkan alkohol 70% dan ditusuk dengan *blood lancet*. Darah tikus yang keluar kemudian dimasukkan kedalam ujung *blood strip* yang telah terhubung dengan glukometer sehingga dapat dibaca kadar glukosa darah tikus.

### **3.4.5 Penentuan dosis terapi dan terapi hewan coba menggunakan ekstrak etanol akar pletekan**

Dosis terapi yang digunakan terbagi atas 3 variasi yaitu 250 mg/kg BB, 375 mg/kg BB dan 500 mg/kg BB.

Ekstrak kental akar pletekan dilarutkan dalam aquades, banyaknya (mg) ekstrak yang diambil didasarkan pada berat badan masing-masing tikus. Terapi dilakukan 1x3 mL sehari selama 3 minggu dengan cara dimasukkan kedalam lambung tikus secara oral.

#### **3.4.6 Pengambilan dan isolasi serum darah pada hewan coba**

Tikus diletakkan diatas papan pembedahan pada posisi ventral (atas) dan dilakukan dislokasi leher. Kemudian dilakukan pembedahan pada rongga abdomen dan diambil plasma darah pada bagian vena cava superior jantung. Plasma darah dimasukkan kedalam vacutainer berwarna merah tanpa antikoagulan dan dimiringkan menggunakan plasticin selama 3 jam. Selanjutnya disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan diambil menggunakan mikropipet dan dimasukkan kedalam mikrotube. Penyimpanan dilakukan dalam *freezer* dengan temperatur -4°C.

#### **3.4.7 Isolasi amilase dan lipase**

Serum darah ditambahkan larutan PBS-Tween : PMSF (9:1) sebanyak 5 kali volume sampel. Dimasukkan kedalam tabung mikrotube dan disisonikasi selama 10 menit. Dilakukan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Supernatan yang diperoleh, ditambahkan etanol absolut dengan perbandingan 1:1 dan didiamkan semalam hingga terbentuk endapan. Selanjutnya dilakukan sentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Endapan dikeringkan hingga pelarut etanol menguap. Endapan ditambahkan dengan larutan buffer Tris-HCl pH 6,5 0,02 M sebanyak 0,2 mL.

#### **3.4.8 Penentuan panjang gelombang maksimum glukosa**

Dipipet sebanyak 1 mL larutan glukosa 300 ppm dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Ditambahkan sebanyak 2 mL DNS. Campuran larutan dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit dan didinginkan menggunakan air mengalir. Selanjutnya larutan dimasukkan dalam labu ukur 25 mL, ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen. Larutan blanko yang digunakan adalah aquades dengan perlakuan sama seperti sampel. Diukur nilai absorbansinya pada kisaran panjang gelombang

480-535 nm. Panjang gelombang maksimum ditentukan dari nilai absorbansi paling besar.

### 3.4.9 Pembuatan kurva baku glukosa

Ditimbang 0,15 gram glukosa, dimasukkan kedalam gelas kimia 100 mL dan ditambahkan aquades secukupnya. Larutan dipindahkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquades hingga tanda batas serta dikocok hingga homogen. Diperoleh larutan stok glukosa 1500 µg/mL. Dipipet larutan sebanyak 0,7; 1; 1,3; 1,7; 2; 2,3; 2,7; 3; 3,3; 3,7; 4; 4,3; 4,7 dan 5 mL larutan stok glukosa 1500 µg/mL dan dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang berbeda. Selanjutnya ditambah aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 dan 750 µg/mL. Masing-masing konsentrasi dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan DNS 2 mL dan dipanaskan selama 15 menit pada suhu 100 °C. Larutan didinginkan dengan air mengalir. Masing-masing larutan dimasukkan dalam labu ukur 25 mL yang berbeda, selanjutnya ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen. Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum glukosa.

### 3.4.10 Penentuan aktivitas amilase

Substrat amilum 1% sebanyak 0,5 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi. Ditambahkan sampel sebanyak 0,05 mL dan air bebas reduktor 0,5 mL. Diinkubasi selama 10 menit pada suhu 42 °C, kemudian ditambahkan DNS 2 mL, dididihkan 5 menit dalam penangas air. Larutan dipindahkan kedalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan aquades hingga tanda batas. Selanjutnya diukur pada panjang gelombang maksimum.

Pengukuran aktivitas enzim amilase dilakukan menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{glukosa}]}{\text{Mr glukosa}} \times \frac{v}{p \times q} \times fp$$

Keterangan :

v = volume total sampel (mL)

p = jumlah enzim (mL)

q = waktu inkubasi (menit)

fp = faktor pengenceran

### 3.4.11 Penentuan aktivitas lipase

Sebanyak 2,5 mL minyak zaitun dimasukkan dalam erlenmeyer, ditambahkan 22,5 mg gum arabik, 15 mL CaCl<sub>2</sub>, 10 mL NaCl 3M dan ditambahkan buffer fosfat hingga pH 7. Kemudian dipipet sebanyak 2,5 mL dan dimasukkan kedalam erlenmeyer berbeda, ditambahkan 0,5 mL sampel, kemudian di *shaker* 15 menit. Diinkubasi 6 menit pada suhu 30 °C dan dimasukkan dalam wadah berisi air mendidih selama 1 menit. Ditambahkan indikator PP sebanyak 3 tetes kemudian di titrasi menggunakan NaOH 0,05 M hingga larutan berwarna merah jambu dan dicatat volume nya.

Aktivitas enzim lipase dapat dihitung melalui persamaan berikut:

$$\text{Aktivitas enzim (U/mL)} = \frac{(ts - tb)\text{NaOH} \times \text{M NaOH} \times 1000}{\text{volume enzim} \times \text{menit}}$$

Keterangan :

ts = titrasi sampel

tb = titrasi blanko

### 3.4.12 Analisis Data

Analisis data uji aktivitas enzim amilase dan lipase dianalisis menggunakan Analisis Ragam *One Way* ANOVA. Ketika terdapat perbedaan hasil antar perlakuan, maka dilakukan analisis BNJ (Beda Nyata Jujur).

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### **4.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Akar Pletekan**

Ekstrak etanol akar pletekan yang diperoleh dari hasil maserasi 900 g serbuk akar pletekan dengan pelarut etanol aquades (1:1) sebesar 284,4 g dengan kadar abu 10,54 % dan kadar air sebesar 10 %. Hasil berupa ekstrak kental berwarna coklat.

#### **4.2 Karakterisasi Ekstrak Etanol Akar Pletekan menggunakan LC-MS**

Karakterisasi ekstrak etanol akar pletekan menggunakan LC-MS bertujuan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder spesifik yang terkandung dalam ekstrak yang berperan sebagai antioksidan. Kromatogram dan data hasil karakterisasi LC-MS ditujukan pada **Tabel 4.1** dan **Gambar 4.1**

**Tabel 4.1** Interpretasi hasil LC-MS senyawa flavonoid

Waktu Retensi (detik)	Fragmentasi Ion	[M] <sup>+</sup> (m/z)	Prediksi Senyawa Flavonoid
2,51	284,50-285,50	299	Sorbifolin
2,61	282,50-283,50	313	Cirsimarin
2,53	312,50-313,50	475	Cirsimarin
2,62	328,50-329,50	491	Cirsiol 4-glucoside

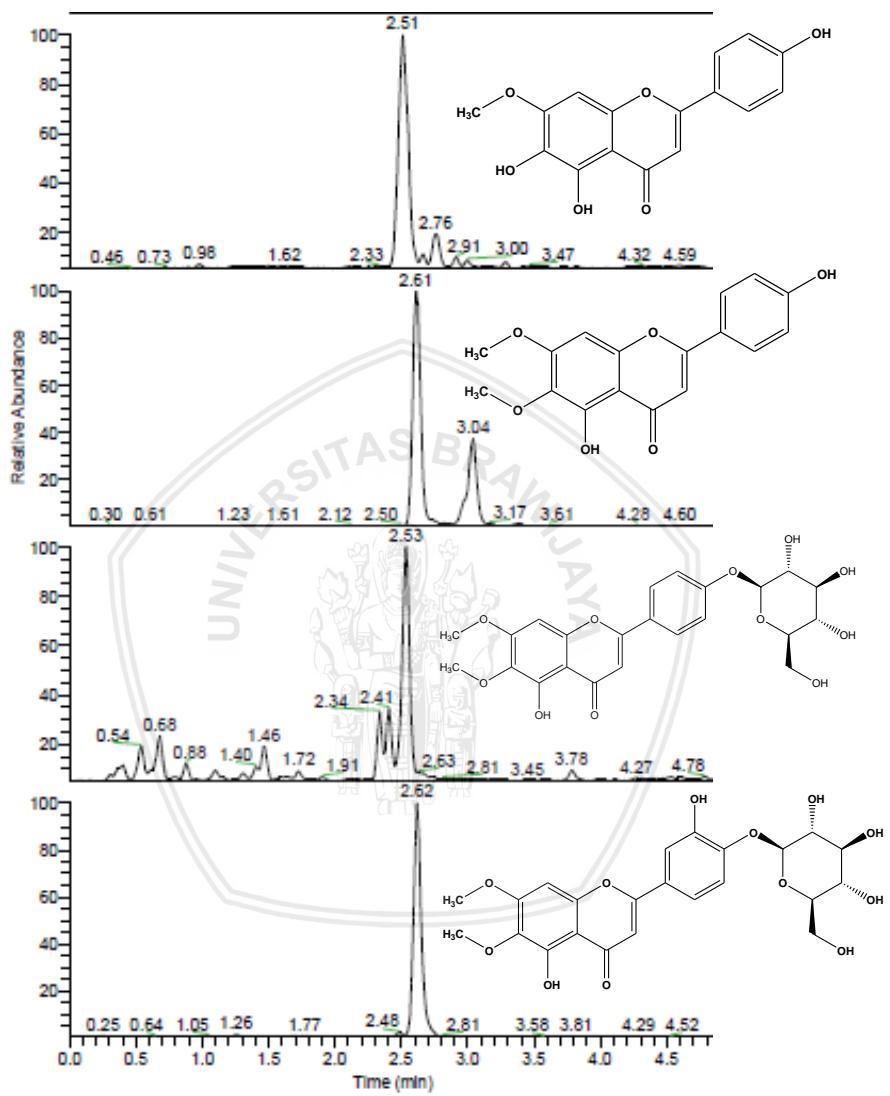
Berdasarkan **Tabel 4.1**, puncak kromatogram pada waktu retensi 2,51 detik menunjukkan fragmen [M-H]<sup>-</sup> pada 299 m/z. Senyawa flavonoid yang diprediksi mempunyai rasio massa terhadap muatan sebesar 299 m/z adalah sorbifolin. Berdasarkan penelitian Lin dkk (2006), diketahui bahwa flavonoid jenis sorbifolin mempunyai m/z sebesar 299 dan berat molekul 300,266 g/mol. Hal tersebut sesuai dengan hasil analisis yang diperoleh pada penelitian ini sehingga dalam ekstrak etanol akar pletekan terdapat kandungan senyawa flavonoid jenis sorbifolin.

Puncak kromatogram pada waktu retensi 2,61 detik menunjukkan fragmen [M-H]<sup>-</sup> pada 313 m/z. Senyawa flavonoid yang diprediksi mempunyai rasio massa terhadap muatan sebesar

313 m/z adalah cirsimarinin. Berdasarkan penelitian Lin dkk (2006), diketahui bahwa flavonoid jenis cirsimarinin mempunyai m/z sebesar 313 dan berat molekul 314,293 g/mol. Hal tersebut sesuai dengan hasil analisis yang diperoleh pada penelitian ini sehingga dalam ekstrak etanol akar pletekan terdapat kandungan senyawa flavonoid jenis cirsimarinin.

Puncak kromatogram pada waktu retensi 2,53 detik menunjukkan fragmen [M-H]<sup>-</sup> pada 475 m/z. Senyawa flavonoid yang diprediksi mempunyai rasio massa terhadap muatan sebesar 475 m/z adalah cirsimarin. Berdasarkan penelitian Lin dkk (2006), diketahui bahwa flavonoid jenis cirsimarin mempunyai m/z sebesar 477 dan berat molekul 476,434 g/mol. Hal tersebut sesuai dengan hasil analisis yang diperoleh pada penelitian ini sehingga dalam ekstrak etanol akar pletekan terdapat kandungan senyawa flavonoid jenis cirsimarin.

Puncak kromatogram pada waktu retensi 2,62 detik menunjukkan fragmen [M-H]<sup>-</sup> pada 491 m/z. Senyawa flavonoid yang diprediksi mempunyai rasio massa terhadap muatan sebesar 491 m/z adalah cirsiliol 4-glucoside. Berdasarkan penelitian Lin dkk (2006), diketahui bahwa flavonoid jenis cirsiliol 4-glucoside mempunyai m/z sebesar 491 dan berat molekul 492,43 g/mol. Hal tersebut sesuai dengan hasil analisis yang diperoleh pada penelitian ini sehingga dalam ekstrak etanol akar pletekan terdapat kandungan senyawa flavonoid jenis cirsiliol 4-glucoside.



**Gambar 4.1** Kromatogram prediksi senyawa Sorbifolin, Cirsimarin dan Cirsiol 4-glucoside.

### 4.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak etanol akar pletekan terhadap Aktivitas Amilase dalam Serum

Satu unit aktivitas enzim amilase dinyatakan sebagai  $\mu\text{mol}$  glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis ikatan glikosidik pada amilum oleh amilase yang diisolasi dari serum tikus tiap menit pada kondisi tertentu. Pengukuran aktivitas enzim amilase dilakukan dengan cara mengkonversi nilai absorbansi sampel menjadi konsentrasi glukosa dengan menggunakan kurva baku glukosa dengan  $\lambda$  490 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

**Tabel 4.2** Aktivitas amilase kelompok negatif, positif, terapi dosis 250 mg/kgBB, 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Aktivitas Amilase ( $\mu\text{mol}/\text{mL}.\text{menit}$ )	Aktivitas Amilase (%)	
		Peningkatan dibandingkan kontrol negatif	Penurunan dibandingkan kontrol positif
Negatif	$2,142 \pm 0,027^{\text{a}}$	-	-
Positif	$7,057 \pm 0,046^{\text{e}}$	229,46 %	-
Terapi 250 mg/kgBB	$3,466 \pm 0,047^{\text{b}}$	-	51,16 %
Terapi 375 mg/kgBB	$4,477 \pm 0,042^{\text{c}}$	-	36,56 %
Terapi 500 mg/kgBB	$5,579 \pm 0,030^{\text{d}}$	-	20,94 %

Berdasarkan **Tabel 4.1** Kelompok tikus kontrol positif mengalami peningkatan aktivitas amilase sebesar 229,46 % dengan rata-rata aktivitas  $7,057 \pm 0,046 \mu\text{mol}/\text{mL}.\text{menit}$ . Peningkatan tersebut dibandingkan pada rata-rata aktivitas amilase kelompok kontrol negatif. Peningkatan aktivitas amilase yang besar menunjukkan adanya kerusakan sel hewan pasca diinduksi MLD-STZ. Pada kelompok terapi terjadi penurunan aktivitas amilase dibandingkan pada rata-rata aktivitas amilase kelompok kontrol positif. Kelompok terapi dosis 250 mg/kgBB mengalami penurunan aktivitas amilase paling besar jika dibandingkan dengan kelompok terapi dosis 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB. Kelompok terapi 250

mg/kgBB mengalami penurunan aktivitas amilase sebesar 51,16 % dengan rata-rata  $3,466 \pm 0,047 \text{ } \mu\text{mol/mL.menit}$ . Kelompok terapi 375 dan 500 mg/kgBB mengalami penurunan aktivitas amilase masing-masing sebesar 36,56 % dan 20,94 % dengan rata-rata aktivitas amilase sebesar  $4,477 \pm 0,042$  dan  $5,579 \pm 0,030 \text{ } \mu\text{mol/mL.menit}$ .

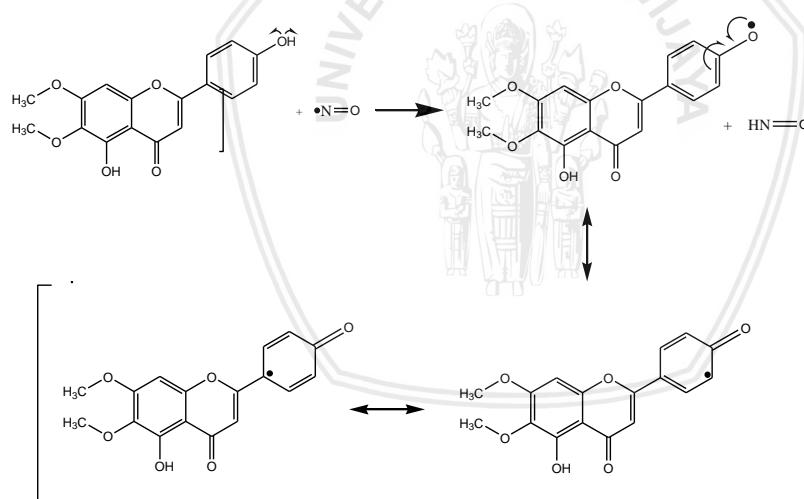
Hasil uji statistik (**Lampiran H**) menunjukkan aktivitas amilase antar kelompok memiliki varian yang sama (homogen) dengan ( $p>0,05$ ) dan terdistribusi secara normal. Hasil uji *one-way* ANOVA menunjukkan adanya perbedaan aktivitas amilase antar kelompok jika dilihat dari data  $F_{\text{hitung}}>F_{\text{tabel}}$  dan dilihat dari nilai ( $p<0,05$ ). Karena terdapat perbedaan maka diteruskan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur). Hasil analisis *Tukey Test* menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar kelompok.

Berdasarkan **Tabel 4.1** aktivitas amilase pada tikus kelompok positif mengalami kenaikan sebesar 229,46 % dan terjadi penurunan aktivitas amilase pada kelompok terapi 250 mg/kgBB, 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB masing-masing sebesar 51,16 %, 36,56 % dan 20,94%. Peningkatan aktivitas amilase disebabkan oleh induksi STZ. Seperti yang telah dijelaskan pada bab II, radikal bebas memicu terjadinya alkilasi DNA yang menyebabkan terjadinya deplesi energi sel sehingga mendorong nekrosis atau kerusakan sel  $\beta$  pankreas [37].

Kerusakan sel  $\beta$  pankreas menyebabkan produksi insulin berkurang atau bahkan berhenti. Insulin sendiri berfungsi sebagai hormon yang membantu gula berpindah kedalam sel sehingga dapat diubah menjadi energi. Selain itu hormon insulin penting bagi hati, karena membantu hati menyerap glukosa dan menyimpannya sebagai glikogen. Glikogen ini berguna sebagai cadangan energi saat tubuh membutuhkan energi ekstra. Pada penderita DM, berkurangnya sekresi insulin mengakibatkan kadar glukosa darah naik yang selanjutnya berakibat pada proses filtrasi yang melebihi transpor maksimum. Hal ini mengakibatkan glukosa dalam darah masuk kedalam urin (glikosuria) sehingga terjadi diuresis osmotik yang ditandai dengan pengeluaran urin yang berlebihan (poliuria) [50]. Glukosa yang hilang melalui urin menyebabkan kurangnya glukosa yang akan diubah menjadi energi. Pada keadaan kekurangan glukosa akan menginduksi sel asinar untuk mensekresikan enzim amilase

yang berfungsi mengkatalisis proses hidrolisa pati menjadi glukosa sehingga kebutuhan glukosa dalam tubuh tercukupi. Oleh sebab itu nilai aktivitas amilase kelompok positif lebih tinggi jika dibandingkan kelompok negatif.

Aktivitas amilase pada kelompok terapi 250 mg/kgBB, 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB mengalami penurunan masing-masing sebesar 51,16 %, 36,56 % dan 20,94 % dibandingkan kontrol positif. Penurunan aktivitas amilase menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol akar pletekan yang mengandung antioksidan memberikan pengaruh pada hewan coba yaitu dapat meredam radikal bebas yang disebabkan oleh STZ. Flavonoid jenis cirsimarinin, cirsimarin, cirsiliol 4-glucoside dan sorbifolin dapat berperan sebagai antioksidan karena pada strukturnya mengandung gugus hidroksil (-OH) yang terikat pada ikatan rangkap terkonjugasi. Gugus hidroksil akan melepaskan atom H dan berikatan dengan radikal bebas sehingga dapat meredam radikal bebas sesuai dengan mekanisme pada **Gambar 4.2**.



**Gambar 4.2** Perkiraan mekanisme reaksi flavonoid menetralkan radikal bebas

Selain itu senyawa fenolik yang terdapat pada tumbuhan dapat menjadi inhibitor enzim karena senyawa fenolik mampu membentuk senyawa kompleks dengan pati. Hal ini menyebabkan pati tidak dapat dihidrolisis oleh enzim pencernaan karena sisi aktif enzim tidak dapat mengenali substratnya yaitu senyawa kompleks yang terbentuk dari pati dan senyawa fenolik [51]. Sehingga aktivitas amilase mengalami penurunan. Namun pemberian dosis yang semakin tinggi justru kurang efektif dalam menurunkan aktivitas enzim amilase, hal ini dapat dilihat pada **Tabel 4.1** dosis terapi 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB. Pemberian antioksidan yang berlebihan diduga dapat mengubah antioksidan menjadi pro-oksidan. Hal tersebut juga dijumpai pada hasil penelitian yang dilakukan Suryani (2013) tentang pemberian terapi ekstrak metanol biji mahoni pada tikus DM [52].

#### 4.4 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Akar Pletekan terhadap Aktivitas Lipase dalam Serum

**Tabel 4.2** Aktivitas lipase kelompok negatif, positif, terapi dosis 250 mg/kgBB, 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB

Kelompok perlakuan	Rata-rata aktivitas lipase (U/mL)	Aktivitas lipase	
		Peningkatan dibandingkan kontrol negatif	Penurunan dibandingkan kontrol positif
Negatif	$8,958 \pm 1,848^a$	-	-
Positif	$43,125 \pm 1,848^e$	381,4 %	-
Terapi 250 mg/kgBB	$16,042 \pm 1,423^b$	-	62,80 %
Terapi 375 mg/kgBB	$25,208 \pm 1,423^c$	-	41,55 %
Terapi 500 mg/kgBB	$36,458 \pm 2,295^d$	-	15,46 %

Berdasarkan **Tabel 4.2** kelompok tikus kontrol positif mengalami peningkatan aktivitas lipase sebesar 381,4 % dengan rata-rata aktivitas  $43,125 \pm 1,848$  U/mL. Peningkatan tersebut dibandingkan pada rata-rata aktivitas lipase kelompok kontrol

negatif. Peningkatan aktivitas lipase yang besar menunjukkan adanya kerusakan sel hewan pasca diinduksi MLD-STZ. Pada kelompok terapi terjadi penurunan aktivitas lipase dibandingkan pada rata-rata aktivitas lipase kelompok kontrol positif. Kelompok terapi dosis 250 mg/kgBB mengalami penurunan aktivitas lipase paling besar jika dibandingkan dengan kelompok terapi dosis 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB. Kelompok terapi 250 mg/kgBB mengalami penurunan aktivitas lipase sebesar 62,80 % dengan rata-rata  $16,042 \pm 1,423$  U/mL. Kelompok terapi 375 dan 500 mg/kgBB mengalami penurunan aktivitas lipase masing-masing sebesar 41,55 % dan 15,46 % dengan rata-rata aktivitas lipase sebesar  $25,208 \pm 1,423$  dan  $36,458 \pm 2,295$  U/mL.

Hasil uji statistik (**Lampiran J**) menunjukkan aktivitas lipase antar kelompok memiliki varian yang sama (homogen) dengan ( $p>0,05$ ) dan terdistribusi secara normal. Hasil uji *one-way* ANOVA menunjukkan adanya perbedaan aktivitas lipase antar kelompok jika dilihat dari data  $F_{\text{hitung}}>F_{\text{tabel}}$  dan dilihat dari nilai ( $p<0,05$ ). Karena terdapat perbedaan maka diteruskan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur). Hasil analisis *Tukey Test* menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar kelompok.

Berdasarkan **Tabel 4.2** aktivitas lipase pada tikus kelompok positif mengalami kenaikan sebesar 381,4 % dan terjadi penurunan aktivitas lipase pada kelompok terapi 250 mg/kgBB, 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB masing-masing sebesar 62,80 %, 41,55 % dan 15,46 %. Peningkatan aktivitas lipase disebabkan oleh induksi STZ yang berakibat pada nekrosis atau kerusakan sel  $\beta$  pankreas. Sel  $\beta$  pankreas sendiri merupakan salah satu sel yang terdapat dalam kelenjar endokrin pankreas yang berfungsi menghasilkan insulin. Kerusakan sel  $\beta$  pankreas menyebabkan terganggunya sekresi insulin dalam tubuh. Pada penderita DM, kurangnya sekresi insulin akan mengaktifasi enzim lipase untuk menghidrolisis trigliserida menjadi asam lemak dan gliserol sehingga dapat menghasilkan energi. Oleh sebab itu nilai aktivitas lipase kelompok positif lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok negatif.

Aktivitas lipase pada kelompok terapi 250 mg/kgBB, 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB mengalami penurunan masing-masing sebesar 62,80 %, 41,55 % dan 15,46 % dibandingkan kontrol positif. Penurunan aktivitas lipase menunjukkan bahwa pemberian ekstrak

etanol akar pletekan memberikan pengaruh pada hewan coba karena kandungan senyawa antioksidan dalam ekstrak yang dapat meredam radikal bebas. Flavonoid jenis cirsimaritin, cirsimarin, cirsiliol 4-glucoside dan sorbifolin dapat berperan sebagai antioksidan karena pada strukturnya mengandung gugus hidroksil (-OH) yang terikat pada ikatan rangkap terkonjugasi. Gugus hidroksil akan melepaskan atom H dan berikatan dengan radikal bebas sehingga dapat meredam radikal bebas (**Gambar 4.2**). Sehingga aktivitas lipase mengalami penurunan. Selain itu, kandungan fitosterol (stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, kampesterol) dalam ekstrak etanol akar pletekan dapat menurunkan aktivitas ROS. Stigmasterol dapat meningkatkan translokasi GLUT 4 yang menyebabkan peningkatan serapan glukosa sehingga kadar glukosa dalam darah berkurang dan insulin meningkat [53].  $\beta$ -sitosterol bermanfaat dalam merangsang sekresi insulin dari pankreas sehingga kadar glukosa darah turun [18].

Namun dapat dilihat pada **Tabel 4.2** dosis 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB bahwa pemberian dosis semakin tinggi pada tikus kurang efektif dalam menurunkan aktivitas lipase, hal ini dapat disebabkan pemberian antioksidan yang berlebihan dapat mengubah antioksidan menjadi pro-oksidan [52].



## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan :

1. Ekstrak etanol akar pletekan mengandung senyawa flavonoid jenis sorbifolin, cirsimarinin, cirsimarin dan cirsiliol 4-glucoside.
2. Terapi ekstrak etanol akar pletekan dapat menurunkan aktivitas amilase pada serum tikus DM tipe 1 hasil induksi MLD-STZ. Dosis 250 mg/kgBB menurunkan aktivitas amilase sebesar 51,16 %, dosis 375 dan 500 mg/kgBB menurunkan aktivitas amilase sebesar 36,56 % dan 20,94 %.
3. Terapi ekstrak etanol akar pletekan dapat menurunkan aktivitas lipase pada serum tikus DM tipe 1 hasil induksi MLD-STZ. Dosis 250 mg/kgBB menurunkan aktivitas lipase sebesar 62,80 %, dosis 375 dan 500 mg/kgBB menurunkan aktivitas lipase sebesar 41,55 % dan 15,46 %

#### 5.2 Saran

Diperlukan karakterisasi LC-MS kandungan flavonoid dalam ekstrak etanol akar pletekan secara kuantitatif



## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Sutrisna, (2013), **Penyakit Degeneratif, Preventif Penyakit Degeneratif dengan Pola Hidup ala Rasulullah SAW**, Surakarta.
- [2] Kementerian Kesehatan RI, (2014), *Situasi dan Analisis Diabetes*. Pusat Data dan Informasi. Jakarta Selatan.
- [3] Azrimaidaliza, (2011), **Asupan Zat Gizi dan Penyakit Diabetes Melitus**. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 6 (1).
- [4] World Health Organization (WHO), (1999), *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classifications of Diabetes Mellitus*, Department of Non-Communicable Disease Surveillance, Geneva.
- [5] Sosenko JM, Krischer JP, Palmer JP, (2008), **A Risk Score for Type 1 Diabetes Derived from Autoantibody-Positive Participants in the Diabetes Prevention TrialType 1**, *Diabetes Care*, 31(3):528-533.
- [6] Grunnet LG and Mandrup-Poulsen T, (2011), **Cytokines and Type 1 Diabetes: A Numbers Game**, *Diabetes*, 60(3):697-699.
- [7] Eleazu, Chinedum, Kate Chinedum Elazu & Udeme Nelson Essien, (2013), **Review of the Mechanism of Cell Death Resulting from Streptozotocin Challenge in Experimental Animals. Its Practical Use and Potential Risk to Humans**, *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*.
- [8] Rahmawati, Gisti , F. N. Rachmawati, H. Winarsi, (2014), **Aktivitas SuperoksidaDismutase Tikus Diabetes yang diberi Ekstrak Batang Kapulaga dan Glibenklamid**, *Scripta Biologica*, 1 (3), 197-201.

- [9] Wresdiyati, T, A. Karmila, M. Astawan dan R. Karnila, (2015), **Teripang Pasir Meningkatkan Kandungan Antioksidan Superoksida Dismutase pada Pankreas Tikus Diabetes**, *Jurnal Veteriner*, 16(1), 145-151.
- [10] Cunningham JG, Klein BG, (2007), *Textbook of Veterinary Physiology*. 4th ed, St. Louis, Missouri. Saunders Elsevier, Pp 424-431.
- [11] Debora, N & A. Sutrisno, (2015), **Enzim Amilase Pemecah Pati Mentah dari Mikroba**, *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3, 1032-1039.
- [12] Pahoja, V.M., Dahot, M.U. dan Sethar, M.A, (2001), **Characteristic Properties of Lipase Crude Extract of *Caesalpinia bouducella* L. seeds**, *Journal of Biological Sciences*, 1, 775-778.
- [13] Srihardyastutie, A., Djoko WS., Fatchiyah., & Aulani'am, (2015), **Relation of Elevated Serum Lipase to Indonesia Type 2 Diabetes Mellitus Progression**, *Biomedical Research*, vol 26.
- [14] Leonita, Emi dan A. Muliani, (2015), **Penggunaan Obat Tradisional oleh Penderita Diabetes Melitus dan Faktor-Faktor yang berhubungan di Wilayah Kerja Puskesmas Rejosari Pekanbaru Tahun 2015**, *Jurnal Kesehatan Komunitas*, 3(1)
- [15] Lin, C.F, Y.L. Huang, L.Y. Cheng, S.J. Sheu and C.C. Chen, (2006), **Bioactive Flavonoids From *Ruellia tuberosa***, *Journal Chin Med*, 17(3): 103-109.
- [16] Rosyada, Istoria, (2018), **Karakterisasi Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) menggunakan LC-MS dan Pengaruhnya terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus (*Rattus norvegicus*) yang terpapar Multiple Low**

**Dose-Streptozotocin (MLD-STZ), Skripsi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang.**

- [17] Jannah, H, I.M. Sudarma dan Y. Andayani, **Analisis Senyawa Fitosterol dalam Ekstrak Buah Buncis (*Phaseolus vulgaris L.*), Tesis, Pendidikan IPA, Universitas Mataram, Mataram.**
- [18] Purnomo, Y., Djoko W.S., Sutiman, b.s., and M.A. Widodo, (2015), **Anti-diabetic Potential of Urena lobata Leaf Extract through Inhibition of Dipeptidyl Peptidase IV Activity. Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine.** 1-5.
- [19] Amri, A.D.F. (2014). **Uji Aktivitas Antidiabetes dari Ekstrak Etanol 70% Tanaman Pecah Beling Hutan (*Ruellia tuberosa L.*) Menggunakan Metode Penghambatan Enzim  $\alpha$ -Glukosidase Secara in Vitro, Skripsi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta. Indonesia.**
- [20] Sri, S.E., Djatmimka., R.S. Utomo, (2007). **Pengaruh Pemberian Infusa Umbi Gadung (*Dioscorea hispida Dennst*) terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Tikus Putih Jantan Diabetes yang diinduksi Aloksan, Majalah Farmasi Indonesia,** 18(1), 29-33.
- [21] Chaitaya, K.B, Ravindra, B.S., Ramesh C.A.R., Jayasree V, Vivian,D.A, (2012). **Hypolipidemic and Anti Oxidant Activity of *Ruellia tuberosa* Linn, IIPBS,** 2(3) 63-72.
- [22] Chothani., Daya L., Patel M.B., Mishra S.H., Vaghasiya, (2010), **Review on *Ruellia tuberosa* (Cracker Plant), Phcog,** 12(12), 506-512.
- [23] Mohan, V.R., R. Kumar N, Vasantha K, (2014), **GC-MS Analysis of Bioactive Component of Tubers of *Ruellia***

- tuberosa* L. (Achantaceae), *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutic*, 2(2), 209-216.
- [24] Harbone, J.B, (1998), *Phytochemical Methods. 3<sup>rd</sup> edition*, Chapman & Hall, London.
- [25] Hudiyono, Sumi, (2004), **Pengaruh Berbagai Kondisi Oksidasi terhadap Kandungan Kolesterol dan Sterol lain dalam Lemak Coklat**, *Makarna Sains*, 8(2)70-75
- [26] Nathan, M. N, Buse J.B, Mayer B. D, Ferrannini E., Holman R.R., Sherwin R., and Zinman B, (2008), **Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for Initiation and Adjustment of Therapy**, *Diabetes Care*. 31(1). 173-175.
- [27] Marineli, Rafaela da Silva, Anne y Castro Marqus, Cibele Priscila Busch Furlan, and Mario Roberto Marostic Jr, (2012), **Antioxidant Effects of the Combination of Conjugated Linoleic Acid and Phytosterol Supplementation in Sprague-Dawley Rats**, *Food Research International Journal*, (49) 487-493
- [28] Robinson, T. (1995). *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Penerbit ITB: Bandung.
- [29] Karisma, M.G , (2012), **Validasi Metode LC-MS/MS untuk Penentuan Senyawa Asama Trans, Trans-Mukonat, Asam Hippurat, Asam 2-Metil Hippurat, Asam 3-Metil Hippurat, Asam 4-Metilhippurat dalam Urin sebagai Biomarker Paparan Benzene, Toluena, dan Xilena**, Skripsi, Fakultas MIPA, Universitas Indonesia.
- [30] American Diabetes Association (ADA), (2010), **Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus**, *Diabetes Care*, 33(1), 562-569.

- [31] Ozougwu, J. C, Obimba K. C., Belonwu C. D, Unakalamba, (2013), **The Pathogenesis and Pathophysiology of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus**, *Journal Physiol Pathophysiol*, 4(4), 46-57.
- [32] Gusti, K. R, (2016), *Podiatri: Perawatan Luka Akut dan Kronik Diabetik Gangrene Menghindari Amputasi*, Penerbit PT. Bhuana Ilmu Populer Gedia, Jakarta.
- [33] American Diabetes Association (ADA), (2014), **Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus**, *Diabetes Care*, 34(1) 562-569.
- [34] Fauci, Harrisons, (2008), *Principles of Internal Medicine 17<sup>th</sup> edition*, McGraw-Hill inc, USA.
- [35] Mahdiana, R, (2010), *Mencegah Penyakit Kronis Sejak Dini*, Tora Book, Yogjakarta.
- [36] Nurmawati, T, 2017, **Study Fisiologis dan Kadar Gula Darah pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang terpapar Streptozotocin (STZ)**. *Jurnal Ners dan Kebidanan*, 4(3), 244-247.
- [37] Nina, Mufida, Nugrahaningsih, B. Lukiat, (2016), **Pengaruh Perasan Labu Siam (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) terhadap Perbaikan Pulau Langerhans Pankreas Mencit (*Mus musculus*) Galur Balb/c Hasil Induksi Streptozotocin (STZ)**, Skripsi, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Malang, Malang.
- [38] Bender, D.A, Murray, K., Botham, K.M, (2009), **Free Radicals and Antioxidant Nutrients**, *Harper's Illustrated Biochemistry Ed 28<sup>th</sup> Mc Graw Hill Lange*, 482-486
- [39] Sudiana, I.K, (2008), *Patobiologi Molekul Kanker*, Salemba Medika, Jakarta.

- [40] Dhirgo, Adji, (2008), **Hubungan Konsentrasi Malondialdehida, Glukosa dan Total Kolesterol pada Tikus Putih yang diinjeksi dengan Streptozotocin**, *Jurnal Sain Veteriner*, 26(2), 73-77.
- [41] Widowati, W, (2010), **Potensi Antioksidan sebagai Antidiabetes**, *Jurnal Kedokteran Maranatha*, 7(2).
- [42] Waris, G., & Ahsan, H, (2006), **Reactive Oxygen Spesies: Role in the Development of Cancer and Various Chronic Conditions**, *Journal of Carcinogenesis*, 5, 14.
- [43] Pambudi, Ridho, (2017), **Perbedaan Panjang serta Berat Tubuh Fetus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Sprangue-Dawley terhadap Pemberian Asam Folat pada Periode Kehamilan yang Berbeda**, Skripsi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung, Bandarlampung.
- [44] Animal Diversity, (2014), *Rattus Norvegicus* Rat. University of Michigan Museum of Zoology, <http://animaldiversity.org>, Diakses tanggal 09 September 2018.
- [45] Aryal, Sagar, *Difference Between Serum and Plasma*, Department of Mikrobiologi, St. Xavler's College, Kaltmandu, Nepal.
- [46] Guyton, A.C., & Hall, J. E, (2006), *Textbook of Medical Physiology 11th edition*. Elsevier Inc.
- [47] Roslizawaty, Rusli, Nazaruddin, Syafruddin, I.S. Bangun, Jumaidar, (2016), **Peningkatan Aktivitas Enzim Lipoprotein Lipase (LPL) dan Perubahan Histopatologis Hati Tikus (*Rattus norvegicus*) Hipertolesterolemia yang diberi Ekstrak Sarang Semut (*Myrmecodia sp.*)**, *Jurnal Kedokteran Hewan*, 10 (1), 2502-5600.

- [48] Aiyer, Prasanna .V, (2005), Review: **Amylases and Their Applications.** *African Journal of Biotechnology*, 4(13), 1525-1529.
- [49] Agustin, N.K.W, Andini, P.T. Andriani, D.I. Sarinastiti, (2017), **Enzim  $\alpha$ -amilase Inhibitor pada Ekstrak Air Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) untuk Penanggulangan Diabetes Melitus**, *Jurnal Ilmu Pangan dan Hasil Pertanian*, 1(2), 50-58.
- [50] Kartika, R.S, (2015), **Uji Efektivitas Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) sebagai Inhibitor Aktivitas  $\alpha$ -Amilase dan  $\alpha$  -Glukosidase secara In Vitro**, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran Uiversitas Jember, Jember.
- [51] Sabarina, D, (2016), **Aktivitas Penghambatan Enzim  $\alpha$ -glukosidase dan  $\alpha$  -amilase dari Ekstrak Daun Salam , Daun Pandan, Daun Jeruk Purut dan Kombinasinya**, *Skripsi*, Fakultas pertanian universitas Lampung, Bandar Lampung.
- [52] Suryani, N, (2013), **Pengaruh Ekstrak Metanol Biji Mahoni terhadap Peningkatan Kadar Insulin, Penurunan Ekspresi TNF- $\alpha$  dan Perbaikan Jaringan Pankreas Tikus Diabetes**, *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 27(3).
- [53] Hopkins, W.G and Norman, P.A.H, (2004), *Introduction to Plant Physiology 3rd Edition*, John Wiley & Sons, Inc. USA



## LAMPIRAN A. Sertifikat Laik Etik



### KOMISI ETIK PENELITIAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

#### KETERANGAN KELAIKAN ETIK "ETHICAL CLEARENCE"

No: 873-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 : EKSPLORASI DAN PENYEDIAAN KOMPLEK  
VANADIUM (IV) DENGAN FLAVONOID DARI AKAR  
PILETEKAN SEBAGAI KANDIDAT OBAT BERBAHAN  
DASAR HERBAL UNTUK DIABETES

PENELITI : ANNA SAFITRI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 17 Januari 2018

Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya

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

## LAMPIRAN B. Surat Determinasi



**PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR**  
**DINAS KESEHATAN**  
**UPT MATERIA MEDICA BATU**  
 Jalan Lahan No.87 Tel/Fax (0341) 593396, Batu  
**KOTA BATU**

65313

Nomor : 074 / 31A / 102.7 / 2018

Sifat :

Perihal : Determinasi Tanaman Pletekan

Memenuhi permohonan saudara :

Nama / NIM	: RESTI RACHMAWANTI	/ 145090201111029
	ZULFATUL MUZAYYANA	/ 145090200111023
	PRETTY SEPTIANA	/ 145090201111007
	NINGGRUM ARROGIYAH	/ 145090201111064
	SITI SUMADYAH NUR'ADYA	/ 145090201111008
	ISTORIA ROSYADA	/ 145090201111032
	CINDY AIVIONITA EVINDASARI	/ 145090200111011
Instansi	: FAKULTAS MIPA JUR. KIMIA UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG	

## 1. Perihal determinasi tanaman pletekan/ ceplikan

- Kingdom : Plantae (Tumbuhan)  
 Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)  
 Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)  
 Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)  
 Kelas : Magnoliopsida (berkecina dta / dikotil)  
 Sub Kelas : Asteridae  
 Ordo : Scrophulariales  
 Famili : Acanthaceae  
 Genus : Ruellia  
 Spesies : *Ruellia tuberosa* L.  
 Nama Daerah : Pletekan, ceplikan (Jawa ).  
 Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-5b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-16a-23b9b-243b-244b-248b-249b-250b-266b-267b-273b-276b-278b-279b-282b-283b-284b-285b-1a-2a-3a-4a-3

2. Morfologi : Habitus: Terna, semusim, tinggi 0.4-0.9m. Batang: Tegak, pangkal sedikit berbaring, bersegi, masif, hijau. Daun: Tunggal, bersilang berhadapan, bentuk solet, ujung membulat, pangkal runcing, tepi bergigi, panjang 6-18 cm, lebar 3-9cm, licin, pertulangan menyirip, hijau. Bunga: membusuk, bentuk payung, di ketiak daun, terdiri 1-15 bunga, kelopak 2-3cm, benang sari melekat pada tabung mahkota berjumlah 4, dasar mahkota membentuk tawung, ujung berlekuk 5, panjang 3,5-5cm, ungu. Buah: koraik, tajug, keriting, berujung tawang, panjang 2-5cm, membuka dengan dua katup, hijau. Biji: Bulat, kecil, coklat. Akar: Tunjang, membentuk umbi, coklat.

3. Nama Simplesis : *Ruellia Folum* = Daun Ceplikan  
*Ruelliae Caulis* = Batang Ceplikan  
*Ruelliae Herba* = Akar Ceplikan

4. Kandungan Kimia : Daun dan akar mengandung saponin, disamping itu daunnya juga mengandung polifenol dan akarnya mengandung flavonoida.

5. Penggunaan : Penelitian

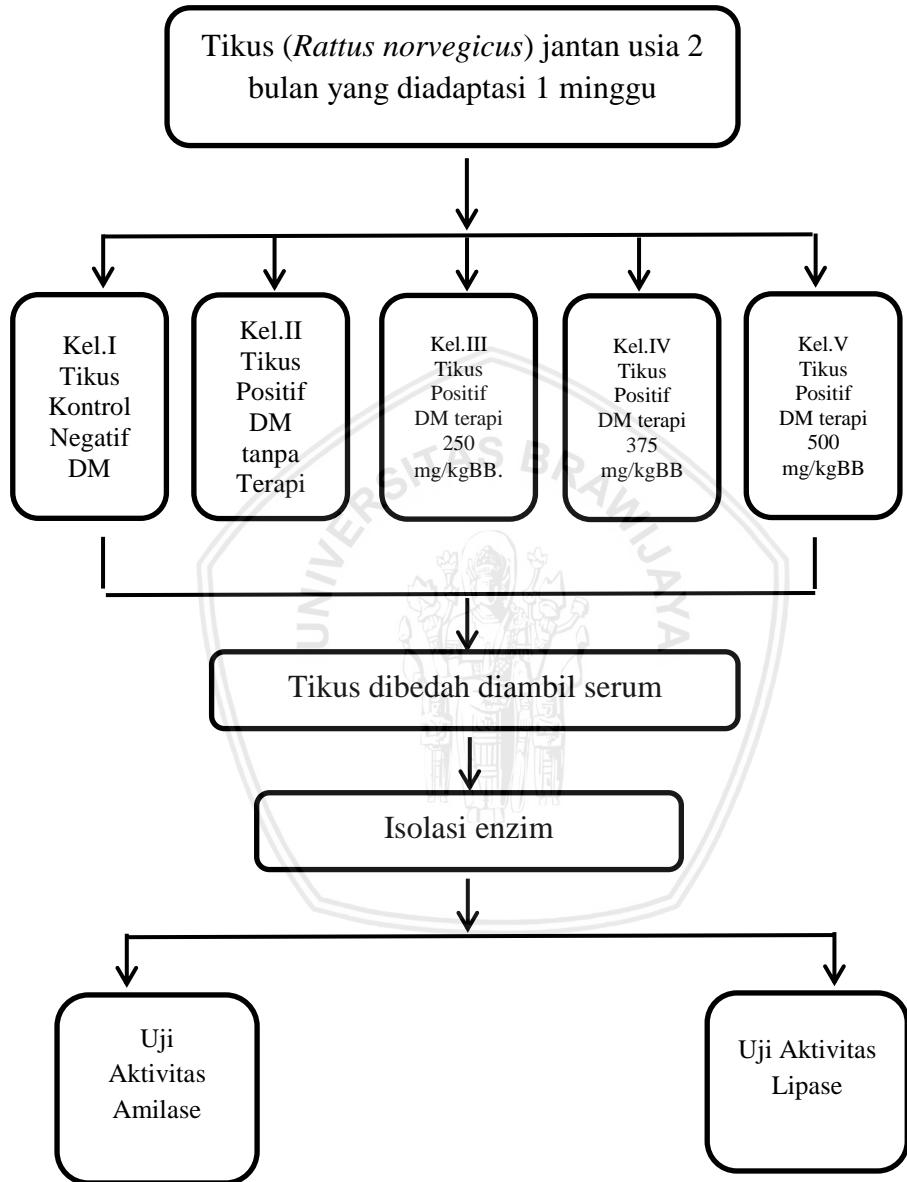
6. Daftar Pustaka

- Anonim. <http://www.plantamor.com/ceplikan>, diakses tanggal 28 Januari 2010.
- Anonim. <http://www.warintek.risetek.go.id/ceplikan>, diakses Tanggal 23 Januari 2007.
- Anonim. 2009. *Taksonomi Koleksi Tanaman Obat Kebun Obat Citeureup*. Badan POM, Direktorat Obat Asli Indonesia, Jakarta.
- Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Johny Ria Hutapea. 1991. Inventaris Tanaman Obat Indonesia I. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Van Steenis, CGGJ. 2008. FLORA. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.



## Lampiran C. Skema Kerja Penelitian Secara Umum



## Lampiran D. Perhitungan dan Preparasi Larutan

### D.1 Perhitungan Dosis Terapi Ekstrak Etanol Akar Pletekan

Dosis terapi ekstrak etanol akar pletekan yaitu 250 mg/kgBB, 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB yang dilakukan selama 21 hari. Pemberian ekstrak disesuaikan dengan berat badan masing-masing tikus. Berikut adalah contoh perhitungan dosis terapi dengan berat badan tikus sebesar 200 mg.

Dalam sehari :

$$\text{Dosis 1} = \frac{250 \text{ mg}}{\text{kgBB}} \times 0,2 \text{ kg} = 50 \text{ mg} \times 4 \text{ tikus} = 200 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis 2} = \frac{375 \text{ mg}}{\text{kgBB}} \times 0,2 \text{ kg} = 75 \text{ mg} \times 4 \text{ tikus} = 300 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis 3} = \frac{500 \text{ mg}}{\text{kgBB}} \times 0,2 \text{ kg} = 100 \text{ mg} \times 4 \text{ tikus} = 400 \text{ mg}$$

Apabila dilakukan selama 21 hari, maka :

$$200 \text{ mg} \times 21 \text{ hari} = 4200 \text{ mg}$$

$$300 \text{ mg} \times 21 \text{ hari} = 6300 \text{ mg}$$

$$400 \text{ mg} \times 21 \text{ hari} = 8400 \text{ mg}$$

Total ekstrak yang dibutuhkan adalah 18.900 mg = 18,9 g

### D.2 Pembuatan Larutan Asam Sitrat 0,2 M

Perhitungan untuk pembuatan larutan asam sitrat 0,2 M sebanyak 100 mL

$$\begin{aligned} \text{mol C}_6\text{H}_8\text{O}_7.\text{H}_2\text{O} &= [\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7.\text{H}_2\text{O}] \times V \text{ larutan} \\ &= 0,2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,02 \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa C}_6\text{H}_8\text{O}_7.\text{H}_2\text{O} &= \text{mol C}_6\text{H}_8\text{O}_7.\text{H}_2\text{O} \times \text{BM C}_6\text{H}_8\text{O}_7.\text{H}_2\text{O} \\ &= 0,02 \text{ mol} \times 210,14 \text{ g/mol} \\ &= 4,2 \text{ g} \end{aligned}$$

Padatan C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O ditimbang sebanyak 4,2 g dan dimasukkan dalam gelas kimia 100 mL. Ditambahkan aquades secukupnya dan diaduk. Selanjutnya dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquades hingga tanda batas, lalu ditutup dan dikocok hingga homogen.

### D.3 Pembuatan Larutan Natrium Sitrat 0,2 M

Larutan natrium sitrat 0,2 M sebanyak 100 mL dibuat dengan perhitungan :

$$\text{BM Na}_3\text{C}_6\text{O}_7.2\text{H}_2\text{O} = 294,10 \text{ g/mol}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Mol Na}_3\text{C}_6\text{O}_7\cdot2\text{H}_2\text{O} &= [\text{Na}_3\text{C}_6\text{O}_7\cdot2\text{H}_2\text{O}] \times V \text{ larutan} \\
 &= 0,2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\
 &= 0,02 \text{ mol} \\
 \text{Massa Na}_3\text{C}_6\text{O}_7\cdot2\text{H}_2\text{O} &= \text{mol Na}_3\text{C}_6\text{O}_7\cdot2\text{H}_2\text{O} \times \text{BM Na}_3\text{C}_6\text{O}_7\cdot2\text{H}_2\text{O} \\
 &= 0,02 \text{ mol} \times 294,10 \text{ g/mol} \\
 &= 5,88 \text{ g}
 \end{aligned}$$

Padatan  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{O}_7\cdot2\text{H}_2\text{O}$  ditimbang sebanyak 5,88 g dan dimasukkan dalam gelas kimia 100 mL. Ditambahkan aquades secukupnya dan diaduk. Selanjutnya dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquades hingga tanda batas, lalu ditutup dan dikocok hingga homogen.

#### D.4 Pembuatan Larutan Buffer Sitrat pH 4,5

Larutan buffer sitrat pH 4,5 dibuat dengan cara mencampurkan larutan asam sitrat sebanyak 27,5 mL dengan larutan natrium sitrat sebanyak 22,5 mL. Larutan campuran tersebut diatur pH nya hingga menjadi 4,5

#### D.5 Pembuatan Larutan Stok STZ

Larutan stok STZ dibuat dengan cara padatan STZ sebanyak 325,9 mg dilarutkan dalam 4,870 mL larutan buffer sitrat pH 4,5. Larutan campuran tersebut divorteks hingga homogen dann disimpan pada temperatur 4 °C.

#### D.6 Perhitungan Dosis Larutan STZ

Larutan STZ yang digunakan untuk injeksi hewan coba diambil dari larutan stok STZ dan ditambahkan dengan buffer sitrat pH 4,5. Dosis yang digunakan pada hewan coba adalah 20 mg/kgBB. Contoh perhitungan volume larutan STZ yang dibutuhkan dalam injeksi hewan coba pada berat badan 185 g adalah :

$$\begin{aligned}
 \text{Volume campuran (STZ+buffer)} &= \frac{\frac{185 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 20 \text{ mg}}{0,033} \times 1 \mu\text{L} \\
 &= 110,30 \mu\text{L}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Volume STZ stok yang dibutuhkan} &= \frac{\frac{185 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 20 \text{ mg}}{0,067} \times 1 \mu\text{L} \\
 &= 54,33 \mu\text{L}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Volume buffer sitrat} &= \text{volume campuran} - \text{volume STZ stok} \\
 &= (110,30 - 54,33) \mu\text{L}
 \end{aligned}$$

$$= 55,97 \mu\text{L}$$

#### D.7 Pembuatan larutan DNS

NaOH, Na-K tartrat, kristal fenol Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> dimasukkan kedalam gelas kimia dan ditambahkan aquades secukupnya. Kemudian di stirer dan ditambahkan DNS sedikit demi sedikit hingga larut sempurna. Selanjutnya dipindahkan kedalam labu alas bulat 100 mL dan ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

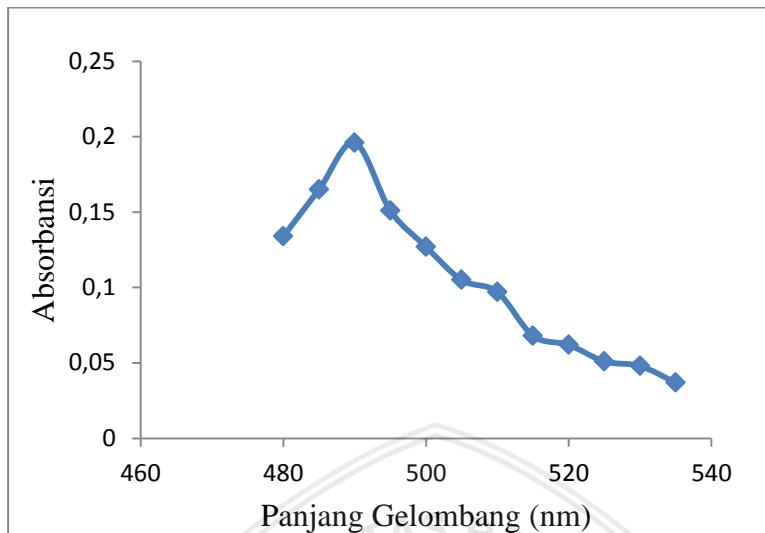
#### D.8 Pembuatan Substrat Amilum (1%)

Serbuk amilum ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dilarutkan dengan 25 mL air hangat dalam *beaker glass* selanjutnya dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquades hingga tanda batas.

#### LAMPIRAN E. Pengaruh pemberian ekstrak etanol akar pletekan terhadap aktivitas amilase

**Tabel E.1** Penentuan Panjang Gelombang Maksimum pada konsentrasi 300 ppm

$\lambda$ (nm)	Absorbansi	$\lambda$ (nm)	Absorbansi
480	0,134	510	0,097
485	0,165	515	0,068
490	0,196	520	0,062
495	0,151	525	0,051
500	0,127	530	0,048
505	0,105	535	0,037



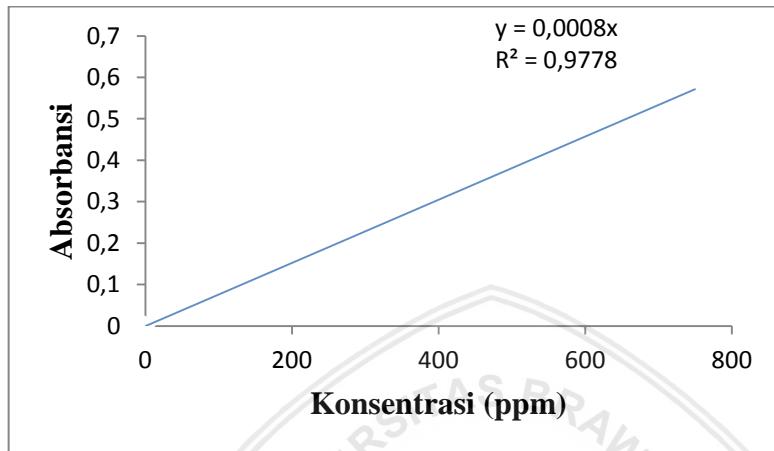
**Gambar E.1** Panjang Gelombang Maksimum Glukosa

#### LAMPIRAN F. Penentuan Kurva Baku Glukosa

**Tabel F.1** Absorbansi larutan standar glukosa pada berbagai konsentrasi

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0	0
100	0,064
150	0,107
200	0,136
250	0,169
300	0,192
350	0,203
400	0,269
450	0,321
500	0,371
550	0,421
600	0,469
650	0,511

700	0,565
750	0,613



**Gambar F.1** Kurva baku glukosa pada panjang gelombang maksimum 490 nm

#### LAMPIRAN G. Pengukuran Aktivitas Amilase

**Tabel G.1** Pengukuran Absorbansi Sampel

Kel	Tikus	A1	A2	A3	RATA-RATA
Negatif	1	0,184	0,186	0,184	0,185
	2	0,190	0,189	0,188	0,189
	3	0,189	0,191	0,190	0,190
	4	0,188	0,188	0,190	0,189
Positif	1	0,613	0,615	0,615	0,614
	2	0,625	0,622	0,624	0,624
	3	0,618	0,619	0,620	0,619
	4	0,621	0,621	0,623	0,622

Terapi 500 mg/kgBB	Terapi 250 mg/kgBB			
	1	0,297	0,298	0,298
	2	0,306	0,307	0,307
	3	0,300	0,302	0,301
		4	0,305	0,306
Terapi 375 mg/kgBB	1	0,394	0,393	0,393
	2	0,389	0,387	0,388
	3	0,395	0,395	0,395
	4	0,397	0,397	0,397
Terapi 500 mg/kgBB	1	0,487	0,487	0,487
	2	0,491	0,494	0,495
	3	0,489	0,490	0,491
	4	0,489	0,489	0,490

**Tabel G.2 Pengukuran aktivitas Amilase**

Kel	Tikus	[Glukosa]	Aktivitas Amilase ( $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$ )	Rata-rata aktivitas amilase ( $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$ )
Negatif	1	231,250	2,103	2,142
	2	236,250	2,153	
	3	237,500	2,164	
	4	236,250	2,149	
Positif	1	767,500	6,997	7,057
	2	780,000	7,103	
	3	773,750	7,050	
	4	773,750	7,080	
250 mg/kg	1	366,250	3,390	3,466
	2	383,750	3,493	

	3	376,250	3,428	
	4	381,250	3,477	
Terapi 375 mg/kgBB	1	491,250	4,477	4,477
	2	485,000	4,419	
	3	493,750	4,495	
	4	496,250	4,518	
	1	608,750	5,546	
	2	616,250	5,619	
Terapi 500 mg/kgBB	3	612,500	5,579	5,579
	4	611,250	5,573	

### G.3 Perhitungan konsentrasi glukosa

Berdasarkan persamaan regresi linier dari kurva baku glukosa diperoleh nilai  $y = 0,0008x$  yang digunakan untuk perhitungan aktivitas amilase pada semua nilai absorbansi. Nilai  $y$  pada persamaan tersebut adalah absorbansi sampel dan  $x$  adalah konsentrasi glukosa. Contoh perhitungan konsentrasi glukosa pada absorbansi 0,185 :

$$\begin{aligned}y &= 0,0008x \\0,185 &= 0,0008x \\x &= \frac{0,185}{0,0008} \\x &= 231,25 \mu\text{g/mL}\end{aligned}$$

### G.4 Perhitungan Aktivitas Amilase dalam Sampel

Contoh perhitungan aktivitas amilase dengan konsentrasi glukosa 230,833  $\mu\text{g/mL}$ .

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{[\text{Glukosa}]}{\text{Mr Glukosa}} \times \frac{v}{p \times q} \times fp$$

$$\text{Aktivitas amilase} = \frac{230,833 \mu\frac{g}{mL}}{180 \mu\frac{g}{\mu\text{mol}}} + \frac{100 \mu\text{L}}{50 \mu\text{L} \times 10 \text{ menit}} + 8,$$

$$= 2,103 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL.menit}}$$

## G.5 Presentase Kenaikan dan Penurunan Aktivitas Amilase

Kelompok positif

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas amilase (\%)} &= \frac{\text{rataan positif} - \text{rataan negatif}}{\text{rataan negatif}} \times 100 \\ &= \frac{(7,057 - 2,142) \mu\text{mol/mL.menit}}{2,142 \mu\text{mol/mL.menit}} \times 100 \\ &= 229,46 \% \end{aligned}$$

Kelompok terapi dosis 250 mg/kgBB

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas amilase (\%)} &= \frac{\text{rataan positif} - \text{rataan terapi } 250 \text{ mg/kgBB}}{\text{rataan positif}} \times 100 \\ &= \frac{(7,057 - 3,466) \mu\text{mol/mL.menit}}{7,057 \mu\text{mol/mL.menit}} \times 100 \\ &= 51,16 \% \end{aligned}$$

Kelompok terapi dosis 375 mg/kgBB

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas amilase (\%)} &= \frac{\text{rataan positif} - \text{rataan terapi } 375 \text{ mg/kgBB}}{\text{rataan positif}} \times 100 \\ &= \frac{(7,057 - 4,477) \mu\text{mol/mL.menit}}{7,057 \mu\text{mol/mL.menit}} \times 100 \\ &= 36,56 \% \end{aligned}$$

Kelompok terapi 500 mg/kgBB

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas amilase (\%)} \\ = \frac{\text{rataan positif} - \text{rataan terapi } 500 \text{ mg/kgBB}}{\text{rataan positif}} \times 100 \\ = \frac{(7,057 - 5,579) \mu\text{mol/mL.menit}}{7,057 \mu\text{mol/mL.menit}} \times 100 \\ = 20,94 \% \end{aligned}$$



## LAMPIRAN H. Hasil Uji Statistik Aktivitas Amilase

**Tabel H.1 Uji Homogenitas**

**Test of Homogeneity of Variances**

Aktivitas Amilase

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,657	4	15	,631

**Tabel H.2 Uji Statistik Anova**

**ANOVA**

Aktivitas Amilase

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	57,463	4	14,366	9293,234	,000
Within Groups	,023	15	,002		
Total	57,486	19			

**Tabel H.3 Uji Beda Nyata Jujur**

**Aktivitas Amilase**

Tukey HSD<sup>a</sup>

Parameter	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
kontrol negatif	4	2,14225				
terapi 250 mg/kgBB	4		3,44700			
terapi 375 mg/kgBB	4			4,47725		
terapi 500 mg/kgBB	4				5,57925	
kontrol positif	4					7,05750
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

**Tabel H.4 Uji Normalitas****Tests of Normality**

Parameter	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kadar amilase						
kontrol negatif	,349	4	.	,834	4	,179
kontrol positif	,188	4	.	,963	4	,797
terapi 250 mg/kgBB	,238	4	.	,940	4	,657
terapi 375 mg/kgBB	,248	4	.	,940	4	,653
terapi 500 mg/kgBB	,253	4	.	,961	4	,785

a. Lilliefors Significance Correction

**LAMPIRAN I. Pengaruh permberian ekstrak etanol akar pletekan terhadap aktivitas lipase****Tabel I.1 Aktivitas lipase**

Kelompok	Tikus	Vol. NaOH titrasi (mL)	Vol. NaOH blanko (mL)	Aktivitas enzim (U/mL)	Rata-rata
Negatif	1	1,1	0,1	8,333	8,958
	2	1,3	0,1	10,000	
	3	0,9	0,1	6,667	
	4	1,4	0,1	10,833	
Positif	1	5,5	0,1	45,000	43,125
	2	5	0,1	40,833	
	3	5,2	0,1	42,500	
	4	5,4	0,1	44,167	
Terapi	1	2,1	0,1	16,667	

dosis 250 mg/kgBB	2	2,2	0,1	17,500	16,042
	3	2	0,1	15,833	
	4	1,8	0,1	14,167	
Terapi dosis 375 mg/kgBB	1	3,1	0,1	25,000	25,208
	2	2,9	0,1	23,333	
	3	3,3	0,1	26,667	
	4	3,2	0,1	25,833	
Terapi dosis 500 mg/kgBB	1	4,6	0,1	37,500	36,458
	2	4,2	0,1	34,167	
	3	4,3	0,1	35,000	
	4	4,8	0,1	39,167	

## I.2 Perhitungan Presentase Kenaikan dan Penurunan Aktivitas Lipase

Kelompok positif :

$$\begin{aligned}
 \text{Aktivitas lipase (\%)} &= \frac{\text{rataan positif} - \text{rataan negatif}}{\text{rataan negatif}} \times 100 \\
 &= \frac{(43,125 - 8,958) U/mL}{8,958 U/mL} \times 100 \\
 &= 381,4 \%
 \end{aligned}$$

Kelompok terapi dosis 250 mg/kgBB :

$$\begin{aligned}
 \text{Aktivitas lipase (\%)} &= \frac{\text{rataan positif} - \text{rataan terapi } 250 \text{ mg/KgBB}}{\text{rataan positif}} \times 100 \\
 &= \frac{(43,125 - 16,042) U/mL}{43,125 U/mL} \times 100 \\
 &= 62,80 \%
 \end{aligned}$$

Terapi dosis 375 mg/kgBB :

$$\begin{aligned}
 & \text{Aktivitas lipase (\%)} \\
 & = \frac{\text{rataan positif} - \text{rataan terapi } 375 \text{ mg/KgBB}}{\text{rataan positif}} \times 100 \\
 & = \frac{(43,125 - 25,208) \text{ U/mL}}{43,125 \text{ U/mL}} \times 100 \\
 & = 41,55 \%
 \end{aligned}$$

Terapi dosis 500 mg/kgBB :

$$\begin{aligned}
 & \text{Aktivitas lipase (\%)} \\
 & = \frac{\text{rataan positif} - \text{rataan terapi } 500 \text{ mg/KgBB}}{\text{rataan positif}} \times 100 \\
 & = \frac{(43,125 - 36,458) \text{ U/mL}}{43,125 \text{ U/mL}} \times 100 \\
 & = 15,46 \%
 \end{aligned}$$

## LAMPIRAN J. Hasil Uji Statistik Aktivitas Lipase

**Tabel J.1 Uji Homogenitas**

### Test of Homogeneity of Variances

Aktivitas Lipase

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,840	4	15	,521

**Tabel J.2 Uji Statistik Anova**

### ANOVA

Aktivitas Lipase

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3171,408	4	792,852	245,522	,000
Within Groups	48,439	15	3,229		
Total	3219,847	19			

**Tabel J.3 Uji Beda Nyata Jujur****Aktivitas Lipase**Tukey HSD<sup>a</sup>

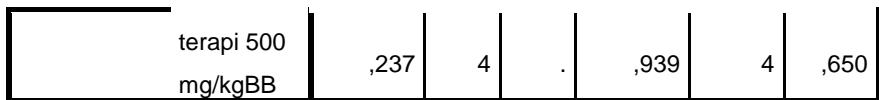
Parameter	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
kontrol negatif	4	8,95825				
terapi 250 mg/kgBB	4		16,04175			
terapi 375 mg/kgBB	4			25,20825		
terapi 500 mg/kgBB	4				36,45850	
kontrol positif	4					43,12500
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

**Tabel J.4 Uji Normalitas****Tests of Normality**

Parameter	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kadar lipase kentrol negatif	,214	4	.	,963	4	,798
kontrol positif	,214	4	.	,963	4	,798
terapi 250 mg/kgBB	,192	4	.	,971	4	,850
terapi 375 mg/kgBB	,192	4	.	,971	4	,850



a. Lilliefors Significance Correction

