

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP KADAR SGPT (*Serum Glutamic Pyruvic Transaminase*) DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR PADA TIKUS MODEL DIABETES MELITUS TIPE 2

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
PUTRI DWIARISHA
155130107111046



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN PEGAGAN
(*Centella asiatica*) TERHADAP KADAR SGPT (*Serum
Glutamic Pyruvic Transaminase*) DAN GAMBARAN
HISTOPATOLOGI HEPAR PADA TIKUS
MODEL DIABETES MELITUS TIPE 2**

Oleh:

**PUTRI DWIARISHA
155130107111046**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 18 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I



Dr. Sasangka Prasetyawan, MS
NIP. 19630404 198701 1 001

Pembimbing II

drh. Dyah Ayu OAP., M.Biotech
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc
NIP. 19631216 198803 1 002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Putri Dwiarisha
NIM : 155130107111046
Program Studi : Kedokteran Hewan
Penulisan Skripsi berjudul:

“Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Kadar SGPT (*Serum Glutamic Pyruvic Transaminase*) dan Gambaran Histopatologi Hepar pada Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2”

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 termaktub 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, 5 Agustus 2019

Yang menyatakan,

(Putri Dwiarisha)

NIM. 155130107111046

Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Kadar SGPT (*Serum Glutamic Pyruvic Transaminase*) dan Gambaran Histopatologi Hepar pada Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2

ABSTRAK

Diabetes Melitus (DM) tipe 2 merupakan penyakit yang terjadi akibat defisiensi atau ketidakefektifan dalam penggunaan insulin yang diproduksi oleh pankreas. DM tipe 2 yang berlangsung lama menyebabkan hiperglikemia dan peningkatan radikal bebas. Radikal bebas akan berdampak negatif terhadap organ-organ lain seperti hepar. Pemberian ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) diharapkan dapat mengurangi radikal bebas dan meningkatkan sensitivitas insulin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap kadar SGPT (*Serum Glutamic Pyruvic Transaminase*) dan gambaran histopatologi dari organ hepar. Dalam penelitian ini, pembuatan hewan DM tipe 2 dilakukan dengan pemberian pakan tinggi lemak sebanyak 40 gram/ekor/hari selama empat minggu dan pemberian *multiple low-dose streptozotocin* (STZ) dengan dosis 30 mg/kg BB sebanyak dua kali dengan jarak satu minggu secara intraperitoneal. Penelitian ini menggunakan 20 tikus yang dibagi secara acak kedalam 5 kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif (tikus sehat), kontrol positif (tikus DM tipe 2), dan kelompok terapi P1, P2, dan P3 dengan dosis 75, 150, dan 300 mg/kg BB ekstrak daun pegagan. Parameter yang digunakan adalah kadar SGPT dan gambaran histopatologi hepar. Kadar SGPT diukur dengan menggunakan spektrofotometri dan data dianalisis secara kuantitatif menggunakan uji *one way ANOVA* dan uji lanjutan Tukey dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Gambaran histopatologi hepar diamati dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) dan dianalisa secara kualitatif deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) dapat menurunkan kadar SGPT secara signifikan ($p<0,05$) sebesar 60% dan memperbaiki organ hepar dengan dosis efektif 150 mg/kg BB. Kesimpulan dari penelitian ini yaitu ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) dapat menurunkan kadar SGPT dan memperbaiki organ hepar pada tikus DM tipe 2.

Kata kunci : Diabetes melitus tipe 2, *C. asiatica*, SGPT, histopatologi hepar

The Effect of Giving *Centella asiatica* Leaf Extract on SGPT (*Serum Glutamic Pyruvic Transaminase*) Levels and Liver Histopathology Overview in the Diabetes Mellitus Type 2 Model Rat

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) type 2 is a disease caused by deficiency or ineffective of using insulin produced by the pancreas. Long-lasting DM type 2 can cause hyperglycemia and increase in free radicals. The free radicals will have a negative impact to the other organs such as the liver chronically. Giving pegagan (*Centella asiatica*) leaf extract is expected to reduce free radicals and improve insulin sensitivity. This study was aimed to determine the effect of pegagan (*C. asiatica*) leaf extract on SGPT (*Serum Glutamic Pyruvic Transaminase*) level and histopathology of liver. In this study, making DM type 2 animals was carried out by giving high fat diet as many as 40 g/rat/day for four weeks and inducing multiple low-dose streptozotocin (STZ) intraperitoneally at dose 30 mg/kg BW two times once a week. This study used 20 rats were divided randomly into 5 groups consist of negative control group (healthy rat), positive control group (rat model of DM type 2), and treatment group P1, P2, and P3 with doses therapy of 75, 150, and 300 mg/kg BB pegagan (*C. asiatica*) extract. The parameters were used SGPT level and histopathology liver. The SGPT level measured using spectrophotometer and data analyzed by one way ANOVA and follow by Tukey test with a confidence level of 95% ($\alpha = 0.05$). Histopathology liver showed by staining Hematoxilin Eosin (HE) and analyzed in qualitative and descriptive. The results showed that treatment of *C. asiatica* leaf extract significantly reduced SGPT level ($p < 0,05$) 60% and restore liver organ with 150 mg/kg BW as effective dose. It can be concluded that the treatment with *C. asiatica* leaf extract could decrease SGPT level and restore liver organ on DM type 2 rats.

Keywords: Diabetes mellitus type 2, *C. asiatica*, SGPT, Histopathology liver

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya penulis menyusun laporan tugas akhir dengan judul **“Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Kadar SGPT (*Serum Glutamic Pyruvic Transaminase*) dan Gambaran Histopatologi Hepar pada Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2”** sebagai tugas akhir/skripsi sebagai syarat kelulusan menjadi Sarjana Kedokteran Hewan.

Laporan skripsi ini disusun berdasarkan diskusi dengan berbagai pihak serta literatur yang penulis baca dari beberapa referensi. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Dr. Sasangka Prasetyawan, MS dan drh. Dyah Ayu OAP, M.Biotech selaku dosen pembimbing yang telah menyisihkan waktunya untuk membimbing penulis pada saat penulisan tugas akhir ini.
2. drh. Tiara Widyaputri, M.Si, Dhita Evi Aryani, S.Farm, Apt., M.Farm.Klin, dan drh. Widi Nugroho, Ph.D selaku dosen penguji atas segala ilmu, dukungan, serta saran dan masukan dalam penyempurnaan penulisan tugas akhir ini.
3. Dr.Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.
4. Ibu Agri Kaltaria Anisa, S.Farm. Apt selaku dosen pembimbing akademik dan pembimbing PKM dengan judul “Pemanfaatan Ekstrak Daun Pegagan terhadap Kadar Malondialdehid dan Aktivitas Superoxide Dismutase pada Tikus Model Diabetes Tipe 2”

5. Ayahanda Asril, Ibunda Risa Yudi Wati, Kakak Fadila Arisha, Adik Hanifah Triarisha dan keluarga besar tercinta yang selalu memberi kasih sayang, dorongan, dukungan dan doa untuk menyelesaikan studi penulis serta perhatiannya akan kebutuhan penulis baik secara moril maupun materi.
6. Seluruh sahabat khususnya Alvinda Ayu, Farisa Fitriana, Nenny Fitria, Annisa Novianti Arifah, dan Bekti Sri Utami atas doa dan semangat yang diberikan untuk penulis
7. Rekan seperjuangan Diabetes Melitus dan *C.asiatica* yaitu Aulia Azka, Ahlia Ummul, Fidia Hestikasari, dan Ika Marlindha Sari untuk waktu dan inspirasi yang diberikan untuk penulis.
8. Seluruh dosen dan civitas akademika yang telah membimbing, memberikan ilmu, dan mewadahi penulis selama menjalankan studi di Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
9. Seluruh kolegium Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, khususnya kepada teman-teman DNA, Kolegium FKH UB

Penulis sadar bahwa laporan ini masih jauh dari sempurna. Penulis berharap laporan ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca untuk itu saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Diabetes Melitus Tipe 2	7
2.2 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	8
2.3 Pakan Tinggi Lemak	10
2.4 Streptozotosin (STZ).....	11
2.5 Hepar.....	13
2.6 <i>Serum Glutamic Pyruvic Transaminase</i> (SGPT).....	16
2.7 Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	18
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	20
3.1 Kerangka Konsep.....	20
3.2 Hipotesis Penelitian	23
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN.....	24
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	24
4.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	24
4.3 Rancangan Penelitian.....	25
4.4 Sampel Penelitian.....	25
4.5 Variabel Penelitian.....	26
4.6 Prosedur Penelitian	27
4.6.1 Perawatan Subjek Penelitian	27
4.6.2 Pembuatan Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2.....	27
4.6.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Pegagan.....	28
4.6.4 Pengukuran Kadar SGPT	29
4.6.5 Pembuatan Preparat Histopatologi Hepar	30
4.6.6 Pengamatan Preparat Histopatologi Hepar	31
4.7. Analisis Data.....	32



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	33
5.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan terhadap Kadar SGPT (<i>Serum Glutamic Pyruvic Transaminase</i>) Tikus Model DM Tipe 2.....	33
5.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan terhadap Histopatologi Hepar	39
BAB 6 PENUTUP.....	44
6.1 Kesimpulan	44
6.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN.....	50



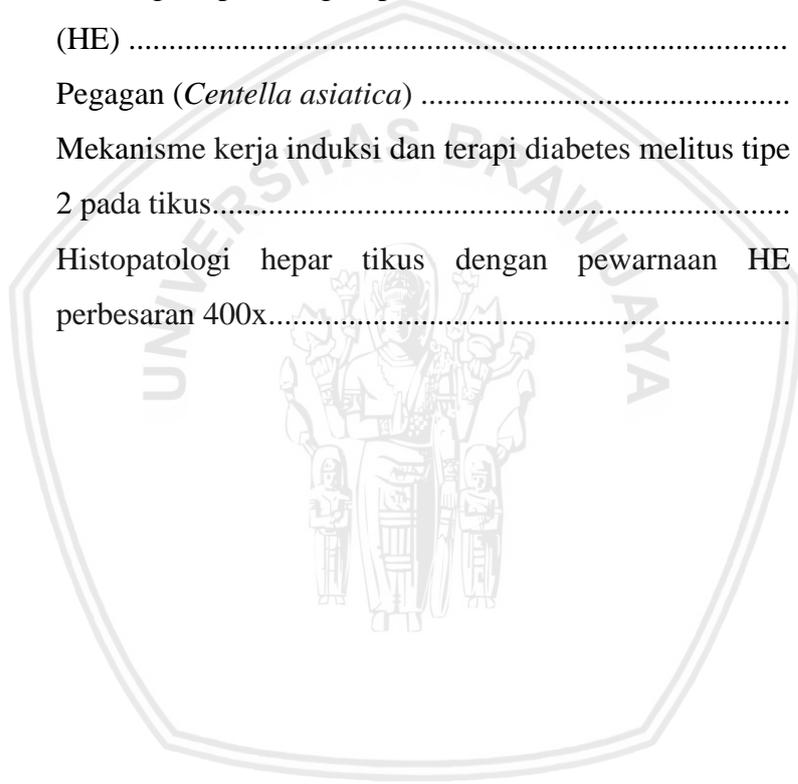
DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
5.1	Rata-rata Kadar SGPT.....	34



DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	10
2.2	Mekanisme STZ.....	12
2.3	Anatomi hepar tikus.....	14
2.4	Histologi hepar dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE)	15
2.5	Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	18
3.1	Mekanisme kerja induksi dan terapi diabetes melitus tipe 2 pada tikus.....	20
5.1	Histopatologi hepar tikus dengan pewarnaan HE perbesaran 400x.....	39



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Laik etik	51
2	Uji Kualitatif Flavonoid Ekstrak Etanol Pegagan.....	52
3	Uji Kuantitatif Flavonoid Ekstrak Etanol Pegagan.....	53
4	Rancangan Perlakuan.....	55
5	Kerangka Operasional Penelitian.....	57
6	Komposisi Pakan Tinggi Lemak.....	58
7	Perhitungan Dosis STZ.....	59
8	Perhitungan Dosis Ekstrak Pegagan.....	62
9	Pengukuran Kadar SGPT.....	63
10	Pembuatan Preparat Histopatologi Organ Hepar.....	64
11	Hasil Test Glukosa.....	66
12	Hasil SGPT.....	67
13	Uji Statistik SGPT.....	68
14	Perhitungan Persentase Peningkatan dan Penurunan Kadar SGPT.....	71

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

µm	: mikrometer
µL	: mikroliter
kg/BB	: kilogram per Berat Badan
mL	: milliliter
mg	: milligram
rpm	: Rotations per minute
DM	: Diabetes Melitus
DNA	: <i>Deoxyribnucleid Acid</i>
GLUT	: <i>Glucose Transporter</i>
HFD	: <i>High Fat-Diet</i>
IRS	: <i>Insulin Receptor Substrate</i>
NO	: <i>Nitrit Oxide</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
PI3-K	: <i>Phosphatidylinositol-3 Kinase</i>
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
SGPT	: <i>Serum Glutamic Pyruvic Transaminase</i>
STZ	: <i>Streptozotocin</i>
TTGO	: Tes Toleransi Glukosa Oral
WHO	: <i>World Health Organization</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes Melitus (DM) adalah suatu penyakit kronis yang terjadi karena pankreas tidak menghasilkan cukup insulin (hormon yang mengatur gula darah), atau ketika tubuh tidak dapat secara efektif menggunakan insulin yang dihasilkan sehingga terjadinya peningkatan konsentrasi glukosa dalam darah (WHO, 2016). Diabetes melitus sangat rentan terhadap gangguan fungsi yang bisa menyebabkan kegagalan pada organ mata, ginjal, hepar, saraf, jantung dan pembuluh darah. Diabetes melitus diklasifikasikan menjadi dua kategori yaitu, DM tipe 1 yang disebabkan karena destruksi sel β pankreas sehingga terjadi defisiensi insulin absolut dan DM tipe 2 disebabkan karena resistensi insulin yang disertai dengan penurunan kemampuan sel β pankreas untuk mensekresi insulin yang bersifat relatif (Dipiro *et al.*, 2009).

Secara global, jumlah penderita diabetes melitus mengalami peningkatan signifikan dari tahun ke tahun. Diabetes Atlas edisi ke-8 yang diterbitkan oleh Federasi Diabetes Internasional 2017 menyatakan bahwa 425 juta dari total populasi seluruh dunia. Berdasarkan data terbaru Riset Kesehatan Dasar 2018, angka prevalensi diabetes melitus di Indonesia mengalami peningkatan cukup signifikan selama lima tahun terakhir. Di tahun 2013, angka prevalensi diabetes pada orang dewasa mencapai 6,9 persen, dan di tahun 2018 angka terus melonjak menjadi 8,5 persen. Data tersebut juga mengungkapkan bahwa Indonesia menempati peringkat ke-6 sebagai jumlah penderita diabetes

dewasa tertinggi di dunia dengan total lebih dari 10,3 juta orang setelah negara China, India, Amerika, Brazil, dan Mexico. Angka ini diprediksi akan terus mengalami peningkatan dan mencapai 16,7 juta pada tahun 2045.

Kejadian diabetes melitus juga dapat terjadi pada hewan. *The Center for Disease Control and Prevention* (CDCP), menyatakan bahwa berdasarkan hasil pemeriksaan dokter hewan di Amerika terdapat sekitar 1 dari 400 anjing dan 1 dari 800 kucing didiagnosis terjangkit diabetes melitus (Wardhana, 2010). Penyakit diabetes melitus pada kucing dan anjing di laporkan mengalami peningkatan 32% pada anjing dan 16% pada kucing sejak 2006 dan kejadian ini terus meningkat hingga 79,7% pada anjing dan 18% pada kucing ditahun 2015 (Banfield Pet Hospital, 2016).

Diabetes melitus tipe 2 (*Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus*) terjadi akibat ketidakmampuan tubuh untuk merespon dengan wajar terhadap aktivitas insulin yang dihasilkan pankreas (resistensi insulin), sehingga tidak tercapai kadar glukosa yang normal dalam darah (Maulana, 2009).

Pada kondisi diabetes, hepar tidak dapat menggunakan glukosa sebagai penghasil energi, sehingga terjadinya pemecahan lemak (lipolisis) jaringan adiposa untuk menghasilkan energi yang dibutuhkan. Lipolisis akan meningkatkan sirkulasi asam lemak bebas, yang kemudian diambil oleh hati sebagai sumber energi. Asam lemak yang melebihi kadar atau batas dapat menimbulkan akumulasi (penumpukan) asam lemak di hepar. Asam lemak dihepar juga bisa menyebabkan pembentukan radikal bebas yang menyebabkan peroksidasi lipid. Pengaruh dari proses ini adalah degenerasi dan nekrosis sel

hepatosit (Tolman, 2006). Kerusakan pada hepar dapat dilihat dengan melakukan pengamatan histopatologi hepar dan aktivitas *Serum Glutamic Pyruvate Transaminase* (SGPT), karena sel hati yang mengalami kerusakan akan menyebabkan enzim transaminase yang spesifik berada di hati akan keluar dan masuk ke peredaran darah, sehingga dengan pemeriksaan biokimia pada serum timbul kenaikan SGPT (Sujono *et al.*, 2015).

Berbagai upaya dilakukan untuk menanggulangi diabetes, seperti pengaturan pola makan dan olahraga teratur, penggunaan obat antidiabetes oral misalnya golongan sulfonil urea dan biguanida, serta suntikan insulin (Sunarsih *et al.*, 2007). Insulin dan obat-obatan sintetik yang beredar dipasaran relatif mahal serta memiliki efek samping. Oleh karena itu, perlu adanya pengembangan strategi pengobatan baru seperti agen hipoglikemik yang berasal dari tumbuhan seperti yang diketahui memiliki efek samping yang lebih sedikit. Zat yang terkandung dalam tanaman yang diduga sebagai antihiperlikemik adalah flavonoid, forskolin, saponin dan lain sebagainya. Menurut laporan informasi etnobotani dunia, hampir 800 tanaman mungkin memiliki potensi *antidiabetes* (Kemala, 2016).

Pegagan (*Centella asiatica*) adalah salah satu tumbuhan herbal yang dapat tumbuh di negara tropis seperti Indonesia. Menurut Coskun *et al* (2005), pegagan (*Centella asiatica* Urban) mempunyai aktivitas sebagai antioksidan yang mampu menekan radikal bebas. Menurut Winarsih (2007) quersetin merupakan senyawa flavanoid yang berpotensi sebagai antioksidan. Potensi tersebut ditunjukkan oleh posisi gugus hidroksilnya yang mampu langsung

menangkap radikal bebas, maka sel-sel yang telah dirusak oleh radikal bebas memperoleh kesempatan untuk meregenerasi diri.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui adanya pengaruh ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica*) terhadap kadar *Serum Glutamic Pyruvic Transaminase* (SGPT) dan gambaran histopatologi jaringan hepar pada tikus model diabetes melitus tipe 2.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan berikut :

- 1) Apakah pemberian ekstrak etanol pegagan dapat menurunkan kadar SGPT pada tikus model diabetes melitus tipe 2?
- 2) Apakah pemberian ekstrak etanol pegagan dapat memperbaiki gambaran histopatologi hepar pada tikus model diabetes melitus tipe 2?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka penelitian ini dibatasi pada :

- 1) Hewan coba yang digunakan adalah tikus jantan galur Wistar dengan umur 6-8 minggu dan berat badan 100-150 gram. Penggunaan hewan coba telah lolos sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (KEP-UB) dengan no. 927-KEP-UB (**Lampiran 1**).

- 2) Pembuatan tikus model diabetes melitus tipe 2 dilakukan dengan cara pemberian pakan tinggi lemak sebanyak 40 gram setiap hari berturut-turut selama 4 minggu (Holmes *et al.*, 2015) dan injeksi Streptozotocin *multiple low-dose* diberikan sebanyak 2 kali dengan selang satu minggu secara intraperitoneal dengan dosis 30 mg/kg BB (Skovso, 2014).
- 3) Konfirmasi kadar glukosa untuk dinyatakan diabetes melitus tipe 2 pada penelitian ini dilakukan menggunakan alat digital yaitu glukometer dan dinyatakan diabetes melitus tipe 2 apabila kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dL.
- 4) Simplisia pegagan diperoleh dari UPT Materia Batu yang telah memperoleh keterangan Determinasi dan ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmakologi FK UB menggunakan etanol 96%. Pemberian terapi ekstrak etanol pegagan selama 1 minggu dengan dosis bervariasi yaitu 75, 150, 300 mg/kg BB.
- 5) Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar SGPT dan gambaran histopatologi hepar menggunakan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE).

1.4 Tujuan Penelitian

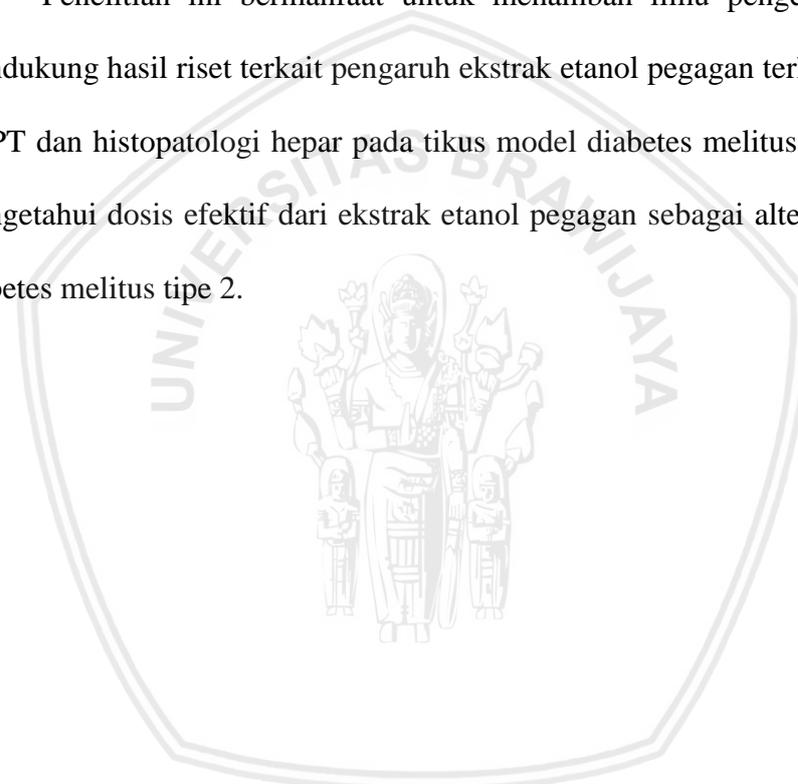
Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

- 1) Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol pegagan dalam menurunkan kadar SGPT pada tikus model diabetes melitus tipe 2.

- 2) Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol pegagan dalam memperbaiki gambaran histopatologi hepar pada tikus model diabetes melitus tipe 2.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk menambah ilmu pengetahuan dan mendukung hasil riset terkait pengaruh ekstrak etanol pegagan terhadap kadar SGPT dan histopatologi hepar pada tikus model diabetes melitus tipe 2 serta mengetahui dosis efektif dari ekstrak etanol pegagan sebagai alternatif terapi diabetes melitus tipe 2.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Melitus Tipe 2

Diabetes Melitus (DM) merupakan suatu kelompok penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kinerja insulin atau keduanya dan didiagnosis dengan mengamati peningkatan kadar glukosa dalam darah (ADA, 2010). Insulin merupakan hormon yang mengatur kadar gula darah. Meningkatnya kadar gula darah atau hiperglikemia merupakan efek yang umum dari diabetes yang tidak terkontrol dan dapat menyebabkan kerusakan yang serius terhadap banyak sistem tubuh terutama sistem saraf dan pembuluh darah (WHO, 2009).

DM tipe 2 terjadi karena sel-sel sasaran insulin gagal atau tak mampu merespon insulin secara normal. Keadaan ini disebut sebagai “Resistensi Insulin”. Selain resistensi insulin, pada penderita DM tipe 2 dapat juga menimbulkan gangguan sekresi insulin dan produksi glukosa hepatic yang berlebihan. Namun demikian, tidak terjadi pengrusakan sel-sel β Langerhans secara autoimun sebagaimana yang terjadi pada DM tipe 1 (Depkes, 2005). Patogenesis resistensi insulin difokuskan pada defek sinyal Proinsulin-3-kinase, yang akan mengurangi translokasi GLUT4 ke membran plasma. Seperti diketahui, ikatan insulin dan reseptornya menyebabkan translokasi GLUT4 terhadap sel membran yang akan memfasilitasi pengambilan glukosa oleh sel. Diduga pengurangan sintesis dan translokasi GLUT4 pada otot dan sel-sel lemak menjadi penyebab dasar dari insulin resisten yang terdapat pada obesitas

dan juga pada DM tipe 2. Polimorfisme pada IRS-1 (*Insuline Reseptor Substrat*) dapat berhubungan dengan intoleransi glukosa, peningkatan kemungkinan polimorfisme pada molekul post reseptor merupakan kombinasi untuk menciptakan keadaan resistensi insulin (Sugondo *et al*, 2009).

Penderita DM tipe 2 juga mengalami produksi glukosa hepatic secara berlebihan tetapi tidak terjadi kerusakan pada sel-sel beta langerhans seperti pada DM tipe 1. Keadaan defisiensi insulin pada penderita DM tipe 2 umumnya hanya bersifat relatif. Defisiensi insulin akan terjadi seiring dengan perkembangan DM tipe 2. Sel-sel beta langerhans akan menunjukkan gangguan sekresi insulin fase pertama yang berarti sekresi insulin gagal mengkompensasi resistensi insulin. Perkembangan DM tipe 2 yang tidak ditangani dengan baik akan menyebabkan kerusakan sel-sel beta langerhans pada tahap selanjutnya. Kerusakan sel-sel beta langerhans secara progresif dapat menyebabkan keadaan defisiensi insulin sehingga penderita membutuhkan insulin endogen. Resistensi insulin dan defisiensi insulin adalah 2 penyebab yang sering ditemukan pada penderita DM tipe 2 (Fitriyani, 2012).

2.2 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) atau yang dikenal sebagai *Norway rat* merupakan hewan percobaan yang sering digunakan pada penelitian biomedis dan pengujian untuk mempelajari pengaruh obat-obatan, toksisitas, metabolisme, embriologi maupun dalam mempelajari tingkah laku. Hal ini dikarenakan genetik yang terkarakteristik dengan baik, galur yang bervariasi

dan tersedia dalam jumlah yang banyak. Tikus untuk kepentingan penelitian atau laboratorium merupakan jenis albino yang kehilangan pigmen melaninnya, sifat tersebut menurun pada anak-anaknya (Barnett dan Anthony, 2002). Taksonomi dari tikus putih adalah sebagai berikut (Maley dan Komasa, 2003):

Kingdom	: Animalia
Divisi	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Subfamili	: Murinae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Galur tikus yang sering digunakan untuk penelitian adalah galur Wistar. Pada **Gambar 2.1** memperlihatkan ciri-ciri galur Wistar, yaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit, telinga tebal dan pendek dengan rambut halus, mata berwarna merah, dan ekornya tidak pernah lebih panjang dari tubuhnya. Bobot badan tikus jantan pada umur dua belas minggu mencapai 240 gram sedangkan pada betina mencapai 200 gram. Tikus memiliki lama hidup berkisar antara 4–5 tahun dengan berat badan umum tikus jantan berkisar

antara 267–500 gram dan betina 225–325 gram. Galur ini berasal dari peternakan Institut Wistar pada tahun 1906 (Sirois, 2005).



Gambar 2.1 Tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Sirois, 2005)

2.3 Pakan Tinggi Lemak

Pakan tinggi lemak/ *High Fat Diet* (HFD) sering digunakan dalam pembuatan hewan model dalam penelitian penyakit gangguan metabolik yang disertai resistensi insulin seperti diabetes melitus tipe 2. Pakan tinggi lemak mengandung lemak hingga 58% jika dibandingkan pakan standar pada tikus dimana kalori yang terkandung tersusun atas 26% protein, 63% karbohidrat dan 11% lemak (King, 2012). Komposisi umum dari pakan tinggi lemak adalah 25% protein, 17% karbohidrat dan 58% lemak (Srinivasan *et al.*, 2005).

Pemberian pakan tinggi lemak menyebabkan resistensi insulin akibat dari penumpukan lemak visceral. Peningkatan massa lemak visceral ini menyebabkan peningkatan *Free Fatty Acids* (FFA) dalam plasma menuju hepar (Skovo, 2014). Menurut Sulistyoningrum (2010), akumulasi asam lemak dan metabolitnya didalam plasma akan menyebabkan aktivasi jalur serin/threonin kinase. Aktivasi jalur ini menyebabkan hambatan fosforilasi

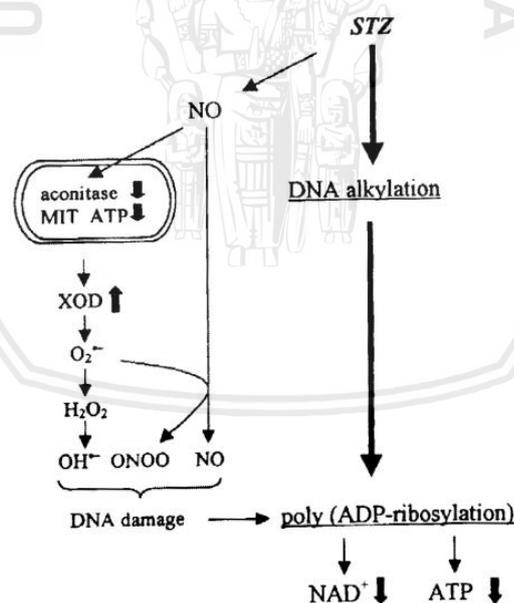
gugus tirosin seperti pada mekanisme kerja insulin yang normal sehingga terjadi resistensi insulin. Kondisi resistensi insulin menyebabkan tidak teraktivasinya jalur *Phosphatidylinositol-3 Kinase* (PI-3K) dan tidak menstimulasi proses translokasi (*Glucose Transporter*) GLUT dari dalam sel menuju permukaan untuk melakukan *uptake* glukosa ke dalam sel, sehingga terjadi peningkatan kadar gula dalam darah (Gao *et al.*, 2004).

2.4 Streptozotosin (STZ)

Streptozotosin (STZ) atau 2-deoksi-2-[3-(metil-3-nitrosoureido)-D-gluko piranose] adalah salah satu agen diabetogenik dengan kemampuan toksiknya yang dapat menghancurkan sel β pankreas. Secara struktur, STZ adalah derivat N-nitrosurea dari D-glukosamin yang diisolasi dari *Streptomyces achromogenes* (Tormo *et al.*, 2006). Biasanya zat ini digunakan untuk menginduksi hewan percobaan menjadi mirip dengan kondisi diabetes baik DM tipe 1 maupun DM tipe 2. Pembuatan DM tipe 2 dilakukan dengan injeksi STZ setelah pemberian pakan tinggi lemak dengan pemberian dosis rendah (25-45 mg/kg pada tikus) secara intravena atau intraperitoneal (Raza dan John, 2013).

Mekanisme STZ dalam kerusakan DNA sel β pankreas dapat dilihat pada **Gambar 2.2**. Saat STZ berada dalam sel, akan meningkatkan guanilil siklase dan menambah formasi cGMP dan membebaskan nitrit oksida. Nitrit oksida merupakan stres oksidatif yang dapat merusak sel. Kemudian adanya defosforilasi ATP meningkatkan substrat xantin oksidase dimana sel β sangat

peka terhadap enzim ini. Xantin oksidase akan memproduksi hidrogen peroksida dan radikal hidroksil. Akhirnya gabungan antara nitrit oksida dan macam-macam zat oksigen reaktif tersebut mengakibatkan fragmentasi DNA. Selain itu, STZ dapat merusak DNA dengan proses alkilasi DNA yang akan membentuk ion karbonium (CH_3^+) kemudian mengaktifkan enzim poly ADP-ribose synthetase (PARP). Dengan adanya aktivasi dari PARP, akan menyebabkan deplesi NAD^+ dan persediaan ATP. Penurunan ATP pada sel β pankreas mempengaruhi sintesis insulin. Apabila proses ini berlangsung terus menerus, maka dapat menyebabkan kerusakan pada sel β pankreas (Eleazu *et al*, 2013).



Gambar 2.2 Mekanisme STZ (Eleazu *et al*, 2013)

Reaksi STZ terhadap sel- β pankreas disertai dengan perubahan karakteristik pada insulin darah dan konsentrasi glukosa yang menyebabkan hiperglikemia dan menurunnya level insulin dalam darah. STZ mempengaruhi

oksidasi glukosa dan menurunkan biosintesis dan sekresi insulin (Firdaus, 2016).

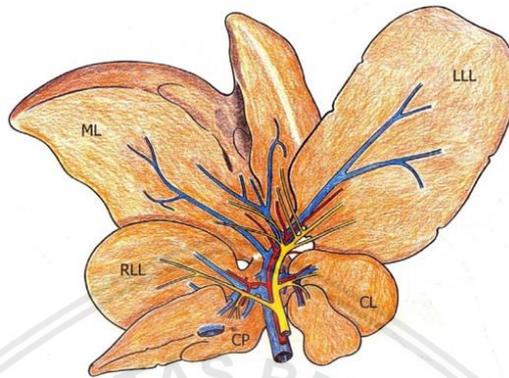
2.5 Hepar

Hepar sebagai kelenjar terbesar di dalam tubuh mempunyai fungsi yang sangat bervariasi. Tiga fungsi dasar hepar adalah membentuk dan mensekresikan empedu ke dalam saluran intestinal; berperan pada berbagai metabolisme yang berhubungan dengan karbohidrat, lipid dan protein; menyaring darah, menyingkirkan bakteri dan benda asing yang masuk ke dalam darah (Snell, 2012).

Hepar berada didalam rongga perut, terletak disebelah kanan, tepat dibawah diafragma berwarna coklat kemerahan. Hepar tikus rata-rata memiliki berat 10 g dengan berat badan tikus rata-rata 250 g atau sekitar 3% dari berat badan tubuhnya. Berbeda dengan manusia, anjing, dan babi, tikus tidak mempunyai empedu, sama halnya dengan kuda dan rusa. Namun secara fisiologis, fungsinya sama seperti hepar manusia yaitu metabolisme energi, mengubah zat buangan dan bahan racun untuk diekskresikan, menghasilkan enzim glikogenik dan sekresi garam empedu (Martins dan Neuhaus, 2007).

Hepar pada tikus terdiri dari 4 lobus yaitu lobus kanan atau lobus dextra, lobus kiri atau lobus sinistra, lobus medial dan lobus kaudal (**Gambar 2.3**). Lobus dextra terbagi menjadi dua bagian yaitu lobus superior dextra dan lobus inferior dextra, lobus kaudal terbagi menjadi dua yaitu lobus kaudal superior dan lobus kaudal inferior, lobus medial terbagi menjadi dua bagian yaitu lobus

medial dextra dan lobus medial sinistra, sedangkan lobus sinistra hanya terbagi menjadi satu bagian (Martins dan Neuhaus, 2007).

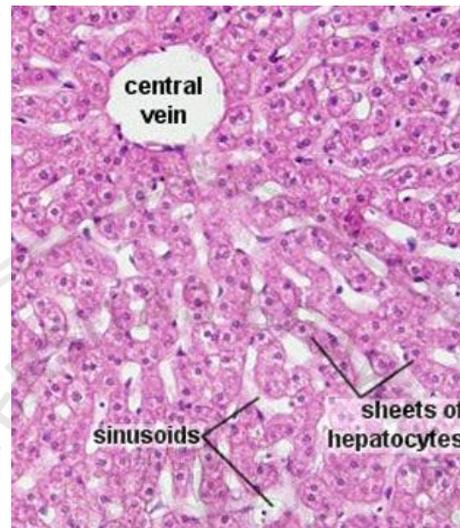


Gambar 2.3 Anatomi hepar tikus (Martin dan Neuhaus, 2007)

Secara histologi (**Gambar 2.4**), hepar dibagi menjadi lobus dan dibagi lagi menjadi lobulus oleh jaringan ikat yang disebut kapsula Gibson. Lobulus hepar terdiri dari beberapa sinusoid bersatu pada vena sentralis pada bagian tengah. Vena sentralis ini tersusun atas sel-sel endotel. Di daerah antara lobulus dapat ditemukan portal triad yang terdiri dari vena porta, arteri hepatica, dan duktus biliaris (Gartner *et al*, 2012). Hepatosit berbentuk polihedral dengan diameter 20-30 μm dengan susunan dari perifer ke medial menuju vena sentralis. Diantara dua barisan hepatosit terbentuk sebuah saluran yang disebut kanalikuli biliaris. Kanalikuli ini tidak memiliki endotel. Hepatosit memiliki nukleus yang berbentuk bulat dan besar yang letaknya di tengah sel (Kuehnel, 2002).

Pada hepar terdapat aliran darah yang dibagi dalam unit struktural yang disebut asinus hepatic. Asinus hepatic terbagi menjadi 3 zona: zona 1 terletak paling dekat dengan traktus portal sehingga paling banyak menerima darah

kaya oksigen, sedangkan zona 3 terletak paling jauh dan hanya menerima sedikit oksigen. Zona 2 atau zona intermediet berada diantara zona 1 dan 3. Zona 3 ini paling mudah terkena jejas iskemik (Junqueira dan Carneiro, 2007).



Gambar 2.4 Histologi hepar dengan pewarnaan hematoksilin eosin (HE) (Kuehnel, 2002)

Hepar merupakan organ yang terlibat dalam metabolisme zat makanan serta sebagian besar obat dan toksikan. Sebagian besar toksik memasuki tubuh melalui sistem gastrointestinal kemudian diserap dan masuk ke dalam peredaran darah. Aliran darah yang membawa toksik tersebut melewati sel hepar secara perlahan dan menimbulkan kerusakan (Maharani, 2007). Beberapa jenis kerusakan hepar yang terjadi yaitu :

1) Degenerasi

Degenerasi sel sering diartikan sebagai kehilangan struktur normal sel sebelum kematian sel. Dalam patologi dapat didefinisikan secara luas sebagai kehilangan struktur dan fungsi normal, biasanya progresif yang tidak ditimbulkan oleh induksi radang dan neoplasia. Degenerasi sel terkadang

merupakan indikasi gangguan metabolisme yang meluas. Jenis umum degenerasi sel disebut perubahan melemak. Disini globuli lemak (terutama trigliserida) dideposisikan pada sitoplasma dalam jumlah besar. Hal ini terjadi pada kondisi diabetes melitus, malagizi, iskhemik dan anemi hebat.

2) Nekrosis

Nekrosis hati adalah kematian sel hati. Kematian sel terjadi bersama dengan pecahnya membran plasma. Tidak ada perubahan ultrastruktural membran yang dapat dideteksi sebelum pecah, namun ada beberapa perubahan yang mendahului kematian sel. Perubahan morfologik awal antara lain berupa edema sitoplasma, dilatasi retikulum endoplasma dan disagregasi polisom. Terjadi akumulasi trigliserid sebagai butiran lemak dalam sel. Perubahan yang terjadi merupakan pembengkakan mitokondria progresif dengan kerusakan kista, pembengkakan sitoplasma, penghancuran organel dan inti dan pecahnya membran plasma.

2.6 *Serum Glutamic Pyruvic Transaminase (SGPT)*

Serum Glutamic Pyruvic Transaminase (SGPT) disebut juga *Alanine Aminotransferase (ALT)* merupakan sekelompok enzim yang bekerja sebagai katalisator dalam proses pemindahan gugus amino dari alanin ke α -ketoglutarat untuk menghasilkan glutamat dan piruvat. Enzim ini juga berperan pada proses glukoneogenesis dengan memfasilitasi sintesis glukosa dari bahan nonkarbohidrat. SGPT adalah indikator yang peka pada kerusakan hati pada cedera sel hepar, jika terjadi kerusakan membran sel dan organel yang akan

menyebabkan enzim intrasel masuk ke dalam pembuluh darah sehingga kadar enzim yang meningkat dalam darah dapat diukur. Nilai normal kadar SGPT yaitu 17,5-30,2 U/L. SGPT paling banyak terdapat dalam sel hati, yaitu pada bagian sitoplasma. Enzim ini juga ditemukan pada otot skelet dan jantung, namun aktifitasnya lebih rendah (Nugrahani dan Shofiah, 2011).

Pemeriksaan faal hati secara sederhana dapat digunakan untuk mendapat informasi mengenai beberapa jenis disfungsi hati, salah satunya penanda kerusakan sel hati yaitu pemeriksaan kadar *Serum Glutamic Pyruvic Transaminase* (SGPT) (Kosasih, 2008). Pengukuran kadar SGPT dengan menggunakan metode kinetik yang direkomendasikan oleh *International Federation of Clinical Chemistry*. Adanya enzim SGPT dalam serum yang diperiksa akan mengubah L-alanin dan 2-oxoglutarat menjadi glutamate dan piruvat. Piruvat yang terbentuk akan dijadikan substrat oleh enzim laktat dehidrogenase yang akan direduksi menjadi laktat dengan adanya NADH yang akan teroksidasi menjadi NAD⁺. Oksidasi NADH menjadi NAD⁺ diukur sebagai penurunan absorbansi yang sebanding dengan aktivitas SGPT sampel (Sari, 2016). Menurut Kosasih (2008) kondisi yang meningkatkan kadar SGPT yaitu:

- a) Peningkatan 3-10 kali normal: infeksi mononuklear, hepatitis kronis aktif, sumbatan empedu ekstra hepatic
- b) Peningkatan 1-3 kali normal: pankreatitis, perlemakan hati.

2.7 Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan tumbuhan tropis dengan daerah penyebaran cukup luas, dari dataran rendah sampai dataran tinggi, hingga 2.500 m di atas permukaan laut. Pegagan dapat ditemukan di daerah perkebunan, ladang, tepi jalan, pematang sawah, ataupun di ladang yang agak basah (Sutardi, 2016). Bentuk pegagan (*C. asiatica*) dapat dilihat pada **Gambar 2.5**.



Gambar 2.5 Pegagan (*Centella asiatica*) (Tjitrosoepomo, 2005)

Menurut Tjitrosoepomo (2005), klasifikasi dari pegagan adalah sebagai berikut:

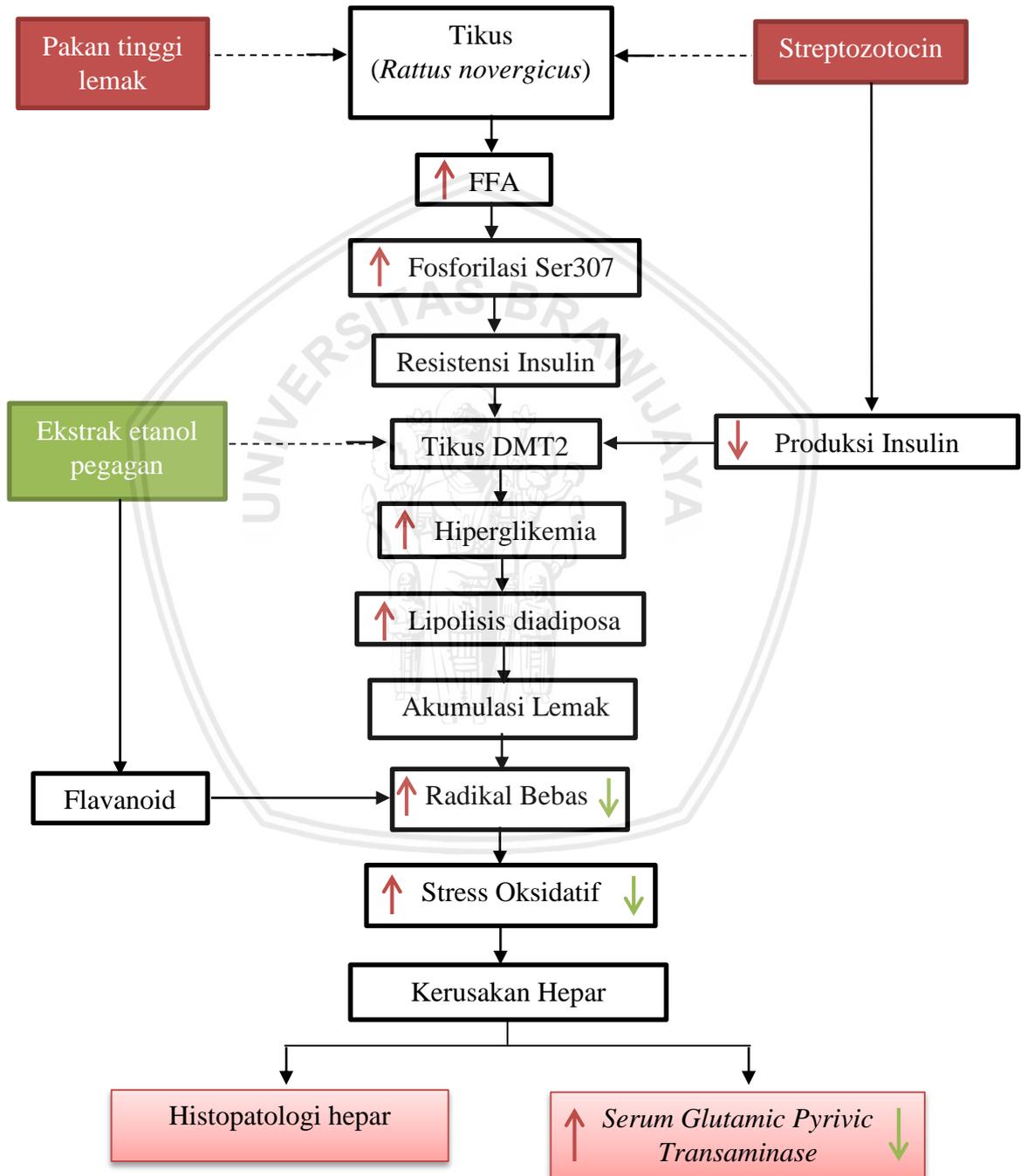
Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Sub Kelas	: Dialypetalae
Bangsa	: Umbelliflorae
Genus	: Centella
Spesies	: <i>Centella asiatica</i>

Menurut Winarto dan Surbakti (2003) pada pegagan (*Centella asiatica*) mengandung berbagai bahan aktif meliputi: 1) triterpenoid saponin, 2) triterpenoid genin, 3) minyak essensial, 4) flavonoid, 5) fitosterol, dan bahan aktif lainnya. Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman pegagan. Flavonoid adalah salah satu bentuk dari polifenol. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik dengan struktur kimia polifenol dalam bentuk C₆-C₃-C₆. Kerangka flavonoid terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, dan cincin tengah C yang berupa heterosiklik yang mengandung oksigen (Redha, 2010).

Flavonoid merupakan senyawa fenol yang berfungsi sebagai inhibitor enzim alfa-glukosidase. Flavonoid agen potensial yang digunakan untuk terapi diabetes melitus karena secara relevan inhibitor enzim alfa-glukosidase mengurangi pencernaan karbohidrat kompleks dan absorbsinya pada usus, sehingga dapat mengurangi peningkatan kadar glukosa (Pereira *et al.*, 2011). Aktivitas antioksidan flavonoid adalah dengan mekanisme berikut: (1) mengikat radikal bebas seperti senyawa oksigen reaktif dan senyawa nitrogen reaktif; (2) menghambat enzim yang berperan dalam produksi radikal bebas; (3) mengatur dan mempertahankan antioksidan (Ali, 2011).

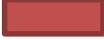
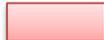
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Mekanisme kerja induksi dan terapi diabetes melitus tipe 2 pada tikus

Keterangan :

-  Perlakuan induksi diabetes melitus
-  Perlakuan terapi diabetes melitus
-  Parameter yang diamati
-  Efek induksi pakan tinggi lemak dan STZ
-  Efek terapi ekstrak pegagan
-  Induksi pada tikus

Tikus diberikan pakan tinggi lemak selama 28 hari untuk memicu terjadinya resistensi insulin. Pemberian pakan tinggi lemak dapat meningkatkan penumpukan lemak visceral, dimana peningkatan masa lemak visceral menyebabkan peningkatan asam lemak bebas (*Free Fatty Acid* = FFA). Meningkatnya FFA plasma akan menurunkan sensitivitas kerja reseptor insulin yang terdapat dalam jaringan akibat fosforilasi Serine 307 pada IRS. Akibatnya, akan terjadi penurunan aktivitas PI3-K yang seharusnya teraktivasi oleh IRS dalam merangsang translokasi GLUT menuju permukaan sel untuk melakukan *uptake* glukosa. Jika hal tersebut terjadi secara terus menerus maka akan terjadi resistensi insulin sehingga glukosa dalam darah tidak dapat ditransport ke dalam jaringan dan menyebabkan hiperglikemia.

Pemberian streptozotocin (STZ) dengan dosis rendah sebanyak dua kali dengan interval satu minggu akan menyebabkan kerusakan *reversible* pada sel β pankreas. Kerusakan pada sel β pankreas yang ditimbulkan akibat injeksi STZ ini terjadi melalui alkilasi DNA sel β oleh donor NO dari STZ (Nugroho, 2006). Kerusakan pada sel β pankreas berefek pada penurunan produksi produksi insulin. STZ juga menyebabkan terjadinya resistensi reseptor insulin

karena meningkatkan ROS (*Reactive Oxygen Species*) sehingga mengaktivasi kasein kinase 2 menjadi retromer, kemudian retromer akan mentransfer GLUT ke lisosom, sehingga GLUT akan terdegradasi dan menyebabkan resistensi insulin (Hurrelle and Hsu, 2017). Terjadinya resistensi insulin dan menurunnya produksi insulin memicu terjadinya kondisi hiperglikemia.

Kondisi hiperglikemia menyebabkan glukosa tidak dapat digunakan sebagai penghasil energi. Sehingga untuk memenuhi kebutuhan energi terjadilah proses pemecahan trigliserida (TG) pada jaringan adiposa menjadi asam lemak dan gliserol. Asam lemak kemudian masuk ke hepar untuk diesterifikasi menjadi TG. Kondisi resistensi insulin juga dapat mengganggu kerja enzim *lipoprotein lipase* (LPL) yang mengakibatkan TG tidak dapat keluar dari sel hepar dan terjadilah penumpukan lemak dihepar. Penumpukan lemak akan meningkatkan radikal bebas sehingga terjadi peristiwa stress oksidatif. Stres oksidatif merupakan peristiwa dimana radikal bebas yang berupa molekul reaktif, muncul melalui suatu reaksi peroksidasi lipid membran dan sitosol yang mengakibatkan terjadinya reaksi asam lemak sehingga merusak membran dan organel sel dan menyebabkan berbagai gangguan fungsi tubuh pada organ hepar (Adjie, 2008). Apabila terjadi kerusakan hepar, maka *Serum Glutamic Pyruvate Transaminase* (SGPT) di dalam sel hepar akan masuk kedalam peredaran darah karena terjadi perubahan permeabilitas membran sel sehingga kadar SGPT didalam darah akan meningkat (Sujono *et al.*, 2015).

Pada penelitian ini digunakan ekstrak etanol pegagan, dimana pegagan mengandung senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid diduga berperan dalam

penghambatan peroksidasi lipid karena senyawa tersebut memiliki kemampuan menangkap radikal bebas. Flavonoid bekerja dengan mendonasikan sebuah atom (H) dari gugus hidroksil (OH) fenolik pada saat bereaksi dengan radikal bebas sehingga terbentuk radikal fenoksil flavonoid yang memiliki reaktifitas lebih rendah. Radikal fenoksil flavonoid memiliki ikatan rangkap terkonjugasi sehingga dapat menstabilkan strukturnya untuk menghilangkan efek radikal bebas (Amic *et al.*, 2003). Diharapkan dengan kandungan flavonoid yang terdapat didalam pegagan dapat menghambat radikal bebas sehingga dapat berpengaruh dengan menurunnya dari stress oksidatif dan terjadinya penurunan peroksidasi lipid sehingga kadar SGPT turun dan memacu perbaikan sel hepatosit pada hewan model diabetes melitus tipe 2 yang diberikan ekstrak etanol pegagan.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

- 1) Ekstrak etanol pegagan dapat menurunkan kadar SGPT pada tikus model diabetes melitus tipe 2 hasil induksi pakan tinggi lemak dan STZ.
- 2) Ekstrak etanol pegagan dapat memperbaiki histopatologi pada hepar tikus model diabetes melitus tipe 2 yang diinduksi pakan tinggi lemak dan STZ.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April sampai Juni 2018. Pemeliharaan hewan coba bertempat di Laboratorium Fisiologi Hewan UIN Maliki Malang, pengujian kadar SGPT dan pembuatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya, Malang.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus, alat sonde, tempat air minum dan pakan, timbangan digital, neraca analitik digital, *refrigerator*, tabung falcon 15 mL, *micropipet*, *microtube pipette tip*, *vortex*, *centrifuge*, tabung reaksi, spuit *tuberculin* 1 cc, mortar, spatula, *water bath*, oven, gunting, pinset, tabung venoject non-EDTA, *object glass*, *cover glass*, *glucose test kit*, mikrotom, spektrofotometer UV-Vis, *automatic tissue processor Tissue Tek Xpress x50*, mikroskop cahaya, dan kamera Optilab *Advance Plus*.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain wistar 20 ekor, pakan standar, pakan tinggi lemak, Streptozotocin (STZ), aquades, buffer sitrat 0,1 M, daun pegagan, etanol 96%,

SGPT reagen kit, PFA 4%, paraffin, xylol, alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, alkohol absolut, dan Mayer *Hematoxyllin-Eosin*.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan bersifat eksperimental. Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu :

- K (-) : Tikus tidak diinduksi DM tipe 2 dan tidak diberi terapi ekstrak etanol pegagan
- K (+) : Tikus diinduksi DM tipe 2 dan tidak diberi terapi ekstrak etanol pegagan
- P1 : Tikus diinduksi DM tipe 2 dan diberi terapi ekstrak etanol pegagan dengan dosis 75 mg/kg BB
- P2 : Tikus diinduksi DM tipe 2 dan diberi terapi ekstrak etanol pegagan dengan dosis 150 mg/kg BB
- P3 : Tikus diinduksi DM tipe 2 dan diberi terapi ekstrak etanol pegagan dengan dosis 300 mg/kg BB

4.4 Sampel Penelitian

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain wistar dengan berat tikus 100-150 gram, berumur 6-8 minggu dan merupakan tikus aktif. Penelitian ini bersifat

eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan estimasi sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan dari rumus di atas yaitu jumlah kelompok perlakuan disimbolkan dengan p, dan jumlah sampel atau ulangan yang diperlukan disimbolkan dengan n. berdasarkan perhitungan diatas, maka lima kelompok perlakuan akan memerlukan jumlah total sampel sebanyak 20 ekor tikus atau ulangan minimal dalam setiap kelompok yaitu empat kali.

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang dapat diamati pada penelitian ini yaitu :

- Variabel bebas : dosis streptozotosin, berat pakan tinggi lemak, dosis ekstrak etanol pegagan
- Variabel tergantung : kadar SGPT dan histopatologi hepar
- Variabel kendali : jenis kelamin tikus, berat badan tikus, dan umur tikus

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Perawatan Subjek Penelitian

Tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan sebanyak 20 ekor umur 6 minggu dengan berat 100-150 gram diaklimatisasi terlebih dahulu selama tujuh hari dengan pemberian pakan standar dan minum secara *ad libitum*. Komposisi pakan terdiri dari 11% lemak, 26% protein dan 63% karbohidrat (King, 2012). Tikus ditaruh dalam kandang individu dengan suhu ruang 23-25 °C. Tikus dikelompokkan menjadi lima kelompok, yaitu: tikus normal (kontrol negatif), tikus DM tipe 2 (kontrol positif), kelompok P1 (tikus DM tipe 2 + pemberian ekstrak etanol pegagan dosis 75 mg/kg BB), kelompok P2 (Tikus DM tipe 2 + pemberian ekstrak etanol pegagan dosis 150 mg/kg BB), kelompok P3 (Tikus DM tipe 2 + pemberian ekstrak etanol pegagan dosis 300 mg/kg BB). Pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan P1 sampai dengan P3 diberikan pakan tinggi lemak selama empat minggu sehari sekali dengan berat pakan 40 gram (Zhang *et al.*, 2008).

4.6.2 Pembuatan Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2

Induksi diabetes melitus tipe 2 dilakukan dengan pemberian pakan tinggi lemak dan induksi streptozotocin. Pakan tinggi lemak dapat menyebabkan terjadinya resistensi insulin sedangkan STZ menyebabkan menurunnya fungsi sel β pankreas dan resistensi insulin yang dapat menimbulkan hiperglikemia. Pakan tinggi lemak memiliki komposisi 58% lemak, 17% karbohidrat, dan 25% protein (King, 2012). Pakan tinggi lemak

pada tikus diberikan sebanyak 40 g/hari/ekor selama 4 minggu (Nugroho, 2006).

Pemberian STZ diberikan satu kali minggu selama 2 minggu dengan dosis 30 mg/kg BB secara intraperitoneal (IP). STZ merupakan sediaan serbuk sehingga perlu diencerkan terlebih dahulu dengan buffer sitrat 0,1 M pH 4,5. Pengukuran kadar glukosa pada tikus menggunakan alat glukometer dengan pengambilan darah pada ujung ekor dilakukan ketika sebelum dan setelah induksi STZ sehingga diketahui kadar glukosa dan setelah hewan coba terkena diabetes melitus tipe 2. Pengukuran kadar glukosa juga dilakukan setelah 7 hari pemberian terapi ekstrak daun pegagan yang bertujuan untuk mengetahui kondisi apakah tikus mengalami penurunan kadar glukosa atau tidak. Pada hewan coba seperti tikus yang memiliki kadar glukosa normal berkisar antara 50-135 mg/dL. Tikus dapat dinyatakan diabetes melitus tipe 2 apabila nilai kadar glukosa ≥ 200 mg/dL (Perkeni, 2011).

4.6.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Pegagan

Ekstrak etanol pegagan dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Berdasarkan literatur (Kumar and Gupta, 2003), proses pembuatan ekstrak etanol pegagan dapat dilakukan dengan 2 langkah kerja, yaitu:

1. Proses Ekstraksi

Daun pegagan dilakukan penyortiran dan dibersihkan dari debu yang masih melekat. Selanjutnya, daun pegagan dikeringkan dengan cara

dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40-60°C. Setelah itu proses ekstraksi dimulai dengan menggiling daun pegagan yang telah kering menjadi serbuk halus (*simplisia*). Daun pegagan yang sudah kering dihaluskan dengan menggunakan blender, kemudian ditimbang dengan timbangan analitik sebanyak 100 gram. Daun pegagan yang sudah kering sebanyak 100 gram tersebut dimasukkan dalam abu Erlenmayer ukuran 1L, kemudian ditambahkan dengan etanol 96% sampai volume 900 mL dan dikocok sampai benar-benar tercampur (± 30 menit). Terakhir campuran didiamkan 1 malam sampai mengendap.

2. Proses Evaporasi

Lapisan atas campuran etanol diambil dan dimasukkan dalam labu evaporasi pada evaporator. Kemudian *water bath* diisi dengan air sampai penuh dan semua rangkaian alat dipasang termasuk: *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (diatur sampai suhu 90°C) dan disambungkan dengan aliran listrik. Lalu larutan etanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu dan ditunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ sampai 2 jam). Kemudian hasil ekstraksi dimasukkan dalam botol dan disimpan pada *refrigerator*.

4.6.4 Pengukuran Kadar SGPT

Pengukuran kadar SGPT diperlukan sampel darah dari hewan coba. Sampel darah diambil dari jantung sebanyak ± 3 mL. Kemudian darah ditampung ke dalam tabung *venoject* tanpa antikoagulan. Sampel darah

disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Serum diperoleh dari hasil sentrifugasi digunakan untuk mengukur kadar SGPT. Kadar SGPT dapat dilihat berdasarkan reaksi enzimatik menggunakan reagen kit Dyasis® SGPT (reagen 1) TRIS pH 7,15 sebanyak 140 mmol/L, L-alanine 700 mmol/L, dan LDH (*laktase dehidrogenase*) ≥ 2300 U/L; reagen SGPT (reagen 2) 2-oksoglutarat 85 mmol/L dan NADH 1 mmol/L. Larutan reagen 1 dan 2 diambil dengan perbandingan 4:1 kemudian dicampurkan hingga homogen. Pengujian dilakukan dengan mencampurkan serum sebanyak 60 μ L dan 600 μ L reagen monoreagen kemudian divortex dan diinkubasi pada suhu kamar selama 1 menit, selanjutnya dilakukan pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 340 nm.

4.6.5 Pembuatan Preparat Histopatologi Hepar

Tahap pembuatan sediaan histopatologi dilakukan dengan metode Kiernan. Fiksasi jaringan dengan cara merendam dalam larutan PFA 10% selama 18-24 jam, kemudian dipotong dengan ketebalan 2 mm agar dapat dimasukkan dalam kaset dan diberi kode. Jaringan dimasukkan kedalam *automatic tissue processor Tissue Tek Xpress x50* selama 90 menit. Setelah itu, kaset diangkat dari *automatic tissue processor*. Proses selanjutnya adalah proses infiltrasi yang dilakukan dalam paraffin cair dan proses embedding kedalam blok paraffin. Pemotongan dilakukan dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 3-5 μ m. jaringan yang terpotong diletakkan dalam objek gelas dan dimasukkan kedalam oven suhu 70-80 °C selama 30 menit.

Kemudian dilakukakan deparafinisasi dengan memasukkan jaringan ke dalam larutan xylol I dan II masing-masing 20 menit. Dilanjutkan dengan proses rehidrasi menggunakan alkohol absolut, 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing 3 menit. Kemudian preparat dicuci dengan air mengalir selama 15 menit.

Tahapan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE) preparat dilakukan sebagai berikut: pewarnaan hematoksin selama 10-15 menit, selanjutnya dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Setelah itu dicelupkan kedalam alkohol asam 1% sebanyak 2-5 celup. Kemudian dilakukan pewarnaan eosin selama 10-15 menit. Dilakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat dari rendah ke tinggi yaitu 70%, 80%, 90%, 95%, dan alkohol absolut (I, II, dan III) masing-masing 2 menit. Dilakukan clearing dengan xylol I,II, dan III selama 3 menit lalu dilakukan mounting dengan Entellan dan ditutup dengan cover glass.

4.6.6 Pengamatan Preparat Histopatologi Hepar

Preparat histopatologi organ hepar yang telah dibuat kemudian diamati secara visual dengan menggunakan mikroskop cahaya mulai dari perbesaran lemah 100x hingga 1000x. Pengambilan gambar histopatologi menggunakan kamera *Optilab Advance Plus* pada perbesaran gambar 400x. Pengamatan yang dilakukan yaitu melihat perubahan susunan dan kerusakan struktural dari sel hepar.

4.7 Analisis Data

Data pada penelitian ini berupa kuantitatif dan kualitatif. Kadar SGPT dianalisa secara kuantitatif menggunakan *Statistical Product of Service Solution* (SPSS) 22.0 *for Windows* dengan uji oneway ANOVA pada tingkat kepercayaan 95%, dengan syarat distribusi data normal dan homogen. Sedangkan untuk gambaran histopatologi hepar dianalisis secara kualitatif dengan melihat perubahan sel hepatosit yang disajikan secara deskriptif.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

Diagnosa diabetes melitus tipe 2 pada penelitian ini dengan melakukan tes toleransi glukosa oral (TTGO). Tes toleransi glukosa oral dapat mengidentifikasi seberapa baik tubuh mampu mengatur tingkat insulin dan glukosa darah tinggi. Pada tes ini, dilakukan pemeriksaan glukosa darah 2 jam setelah pemberian larutan glukosa sebanyak 1,75 g/kg BB (Hardjono, 2007). Hewan model dengan pemberian pakan tinggi lemak dan streptozotosin dapat dinyatakan DM tipe 2 apabila hasil pemeriksaan TTGO ≥ 200 mg/dL. Pada penelitian ini, pengukuran tes toleransi glukosa oral dilakukan pada hari ke-35 dengan hasil terlampir (**Lampiran 11**).

5.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan terhadap Kadar SGPT (*Serum Glutamic Pyruvic Transaminase*) Tikus Model DM Tipe 2

Serum Glutamic Piruvyc Transaminase (SGPT) merupakan enzim dari kelompok transaminase yang mengkatalisis perpindahan gugus alfa amino dari alanin dan asam α -ketoglutarat membentuk piruvat dan asam glutamat. SGPT banyak terdapat pada sitoplasma sel hepar. Pada dasarnya SGPT bekerja dalam cairan intraseluler, akan tetapi ketika terjadinya kerusakan sel maka SGPT akan masuk kedalam peredaran darah sehingga kadar SGPT didalam darah akan meningkat (Sujono *et al*, 2015).

Hasil kadar SGPT pada tikus model DM tipe 2 dengan pemberian pakan tinggi lemak dan induksi STZ dan setelah mendapat terapi ekstrak etanol pegagan (*C. asiatica*) disajikan dalam **Tabel 5.1**

Tabel 5.1. Rata-rata kadar SGPT

Perlakuan	Rata-rata kadar SGPT (U/L) \pm SD	Kadar SGPT (%)	
		Peningkatan berdasarkan kontrol negatif	Penurunan berdasarkan kontrol positif
Kontrol negatif (K -)	32 \pm 7.52 ^a	-	-
Kontrol positif (K +)	112.75 \pm 6.02 ^d	252%	-
P1 (75 mg/kg BB)	73.25 \pm 6.39 ^c		35%
P2 (150 mg/kg BB)	44.75 \pm 7.93 ^{ab}		60%
P3 (300 mg/kg BB)	54.75 \pm 6.99 ^b		51%

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan

Berdasarkan hasil analisis uji *one way* ANOVA dan uji *Tukey* pada **Tabel 5.1** menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol pegagan pada tikus model DM tipe 2 dengan pemberian pakan tinggi lemak dan STZ mampu menurunkan kadar SGPT secara signifikan ($p < 0,05$) dan menunjukkan perbedaan yang nyata. Analisis statistik kadar SGPT kelompok tikus sehat (K-) jika dibandingkan dengan kelompok tikus DM tipe 2 (K+) menunjukkan hasil yang berbeda nyata, yang ditandai dengan perbedaan notasi uji *Tukey*.

Rata-rata kadar SGPT pada kelompok K- sebesar 32 U/L. Menurut Nugrahani dan Shafiah (2011), kadar SGPT normal pada tikus yaitu 17,5-30,2 U/L. Tikus kelompok K- memiliki nilai SGPT yang berada sedikit diatas batas normal, tetapi masih bisa dikatakan normal karena peningkatan nilai tidak terlalu besar. Dalam kondisi normal sel memiliki kemampuan untuk menjaga hemostasis, tetapi dalam proses adaptasi fisiologi sel dapat memberikan respon

yang berlebih untuk mempertahankan bentuk normal sel sehingga sel yang tidak dapat beradaptasi akan mengalami kerusakan. Kerusakan sel mengakibatkan enzim SGPT keluar dari sel menuju pembuluh darah (Vallabhajosula, 2009). SGPT pada K- dapat digunakan sebagai acuan keberhasilan terapi untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol pegagan mampu menekan kenaikan kadar SGPT didalam darah.

Pada kelompok K+ menunjukkan hasil kadar SGPT yang berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan kelompok K-, P1, P2, dan P3 dan mengalami peningkatan terhadap K- sebesar 252%. Peningkatan kadar SGPT didalam darah ini disebabkan karena tikus penderita diabetes tidak mampu memobilisasi glukosa di dalam darah dan mengakibatkan terjadinya gangguan metabolisme sel. Glukosa dalam darah tidak dapat digunakan sebagai sumber energi. Sehingga untuk memenuhi kebutuhan energi, sel akan memperoleh energi dari sumber lain yaitu oksidasi lemak pada jaringan adiposa. Penumpukan lemak akan meningkatkan radikal bebas dihepar. Radikal bebas yang jumlahnya berlebihan akan berikatan makromolekul dan dapat menyebabkan kerusakan dan kematian sel (Wresdiati 2005). Perusakan oleh radikal bebas didahului oleh kerusakan membran sel akibat adanya ikatan kovalen antara radikal bebas dengan komponen-komponen membran, oksidasi pada komponen membran sel, proses peroksidasi lipid. Hasil peroksidasi lipid membran oleh radikal bebas berefek langsung terhadap kerusakan membran sel yang menyebabkan terjadinya perubahan permeabilitas membran sel sehingga SGPT di dalam sel hepar akan

masuk kedalam peredaran darah dan kadar SGPT meningkat (Sujono *et al*, 2015).

Pada hasil uji Tukey kelompok terapi ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica*) (P1, P2 dan P3) menunjukkan hasil yang berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok tikus model DM tipe 2 (K+) yang ditunjukkan dengan perbedaan notasi pada kelompok perlakuan. Perbedaan yang signifikan tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica*) memberikan pengaruh yang nyata dalam menurunkan kadar SGPT. Perbandingan persentasi kadar SGPT juga dilakukan untuk mengetahui kelompok perlakuan terbaik dalam mencegah kerusakan organ hepar yang dilihat dari penurunan kadar SGPT didalam serum.

Hasil statistika pada kelompok P1 dengan pemberian dosis ekstrak etanol pegagan 75 mg/kg BB dibandingkan dengan K+ dan K- menunjukkan hasil yang berbeda signifikan ($p < 0,05$) dan mengalami penurunan terhadap K+ sebesar 35% dengan hasil uji SGPT sebesar 73.25 U/L. Penurunan kadar SGPT pada kelompok ini menunjukkan hasil paling kecil apabila dibandingkan dengan kelompok terapi lainnya. Kecilnya presentasi penurunan kadar SGPT pada P1 diduga karena dosis yang diberikan selama 7 hari ini belum mampu untuk mengikat radikal bebas secara keseluruhan didalam hepar, sehingga masih terdapat radikal bebas yang reaktif yang dapat menyebabkan perubahan permeabilitas membran sel yang mengakibatkan SGPT di dalam sel hepar akan masuk kedalam peredaran darah (Kemala, 2016).

Pada kelompok P2 dengan pemberian dosis ekstrak etanol pegagan 150 mg/kg BB dibandingkan dengan K+ menunjukkan hasil yang berbeda signifikan ($p < 0,05$) dan mengalami penurunan terhadap K+ sebesar 60% dengan hasil uji SGPT sebesar 44.75 U/L. Apabila P2 dibandingkan dengan K- menunjukkan hasil tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$). Dari hasil data statistik tersebut dapat disimpulkan bahwa kelompok P2 dengan pemberian dosis ekstrak etanol pegagan 150 mg/kg BB merupakan dosis efektif karena persentasi penurunan kadar SGPT terhadap K+ paling tinggi dibanding P1 dan P3 dan memiliki hasil statistika tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan K- yang merupakan acuan keberhasilan terapi dalam menekan kenaikan kadar SGPT didalam darah. Hal ini dikarenakan kandungan flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol daun pegagan pada dosis 150 mg/kg BB memiliki konsentrasi yang lebih optimal dan penyerapan ekstrak diusuk juga memiliki keefektifan yang lebih optimum sehingga dapat menurunkan kadar SGPT.

Sedangkan pada kelompok P3 dengan dosis pemberian ekstrak etanol pegagan 300 mg/kg BB dibandingkan dengan K+ dan K- menunjukkan hasil yang berbeda signifikan ($p < 0,05$) dan mengalami penurunan terhadap K+ sebesar 51% dengan nilai hasil uji SGPT sebesar 54.75 U/L. Menurut Iswara (2010), suatu ekstrak bahan antioksidan yang diberikan dalam konsentrasi yang terlalu tinggi pada tubuh akan kehilangan sifat antioksidannya dan berubah menjadi prooksidan. Prooksidan adalah senyawa yang dapat mengoksidasi senyawa seperti lipid secara berlebih dalam membran sel, sehingga produknya

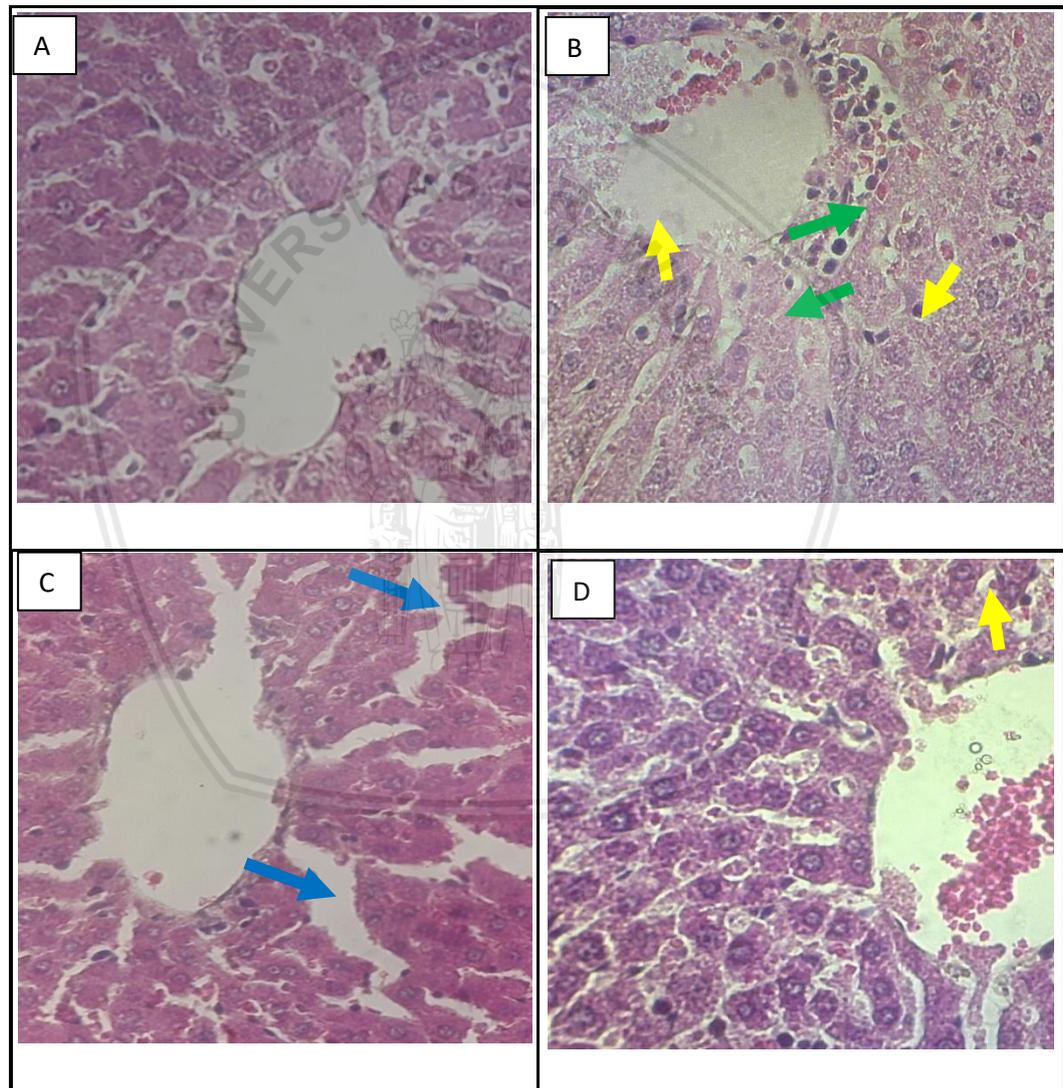
dapat menimbulkan beberapa penyakit degeneratif (Cotelle, 2001). Adanya efek ini dapat menyebabkan penurunan kadar SGPT pada hewan coba dengan dosis ekstrak pegagan 300 mg/kg BB lebih kecil jika dibandingkan dengan hewan coba yang diberi ekstrak pegagan dengan dosis ekstrak pegagan 150 mg/kg BB.

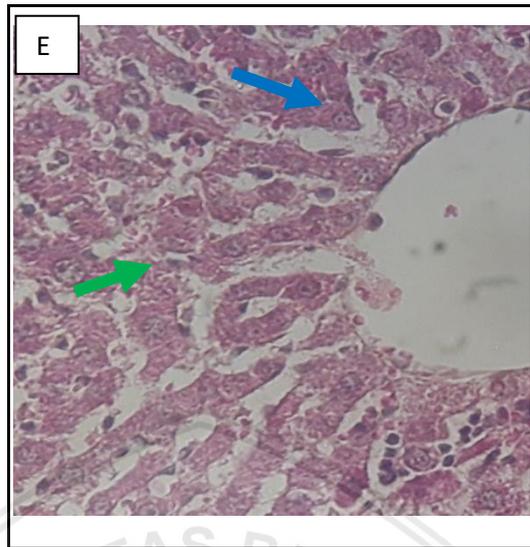
Penurunan kadar SGPT disebabkan oleh kemampuan flavanoid pada daun pegagan (*C.asiatica*) yang berfungsi sebagai antioksidan sehingga dapat menetralsir radikal bebas akibat akumulasi lemak pada organ hepar. Flavanoid berperan sebagai antioksidan yang memiliki kemampuan mengikat radikal bebas dan menghambat terjadinya peroksidasi lipid. Menurut Zhang *et al* (2008), antioksidan menetralkan radikal bebas dengan cara melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif.

Mekanisme kerja flavanoid (FI-OH) sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogen (H) dari gugus (OH) kepada radikal bebas (R*) sehingga flavanoid berubah menjadi radikal fenoksis flavanoid (FIO*) yaitu $(FI - OH + R^* \rightarrow FIO^* + RH)$. Radikal fenoksis flavanoid (FIO*) yang terbentuk akan diserang kembali oleh radikal bebas (R*) sehingga membentuk radikal fenoksis flavanoid yang kedua (FIO*) karena radikal fenoksis flavanoid memunyai ikatan rangkap terkonjugasi maka dapat menyeimbangkan dengan cara delokalisasi elektron sehingga menjadi senyawa kuinon yang stabil (Rahmah, 2012).

5.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan terhadap Histopatologi Hepar

Berikut adalah gambaran dari hasil penelitian berupa histopatologi dari organ hepar tikus DM tipe 2 yang diinduksi dengan pakan tinggi lemak dan streptozotosin (**Gambar 5.1**) menggunakan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE).





Gambar 5.1 Histopatologi hepar tikus dengan pewarnaan HE perbesaran 400x.

Keterangan: - (→) terjadinya pelebaran sinusoid
 - (→) terjadinya nekrosis
 - (→) terjadinya degenerasi lemak

Gambaran histopatologi hepar **A** (kontrol negatif) merupakan tikus sehat yang memiliki sel hepar normal yang terdiri dari dua komponen utama yaitu sel hepatosit dan sinusoid. Sel hepatosit dengan satu inti atau beberapa inti ditengah sel berbentuk polygonal dan ruang sinusoid yang berbentuk irregular. Nukleus terlihat sangat jelas struktur dan batasnya. Permukaan setiap sel hepatosit berhubungan dengan sinusoid atau hepatosit lainnya (Gartner *et al*, 2012).

Gambar **B** merupakan gambaran histopatologi dari hepar tikus kontrol positif atau tikus yang mengalami DM tipe 2, ditunjukkan dengan terjadinya degenerasi lemak dan nekrosis. Degenerasi lemak pada sel hepatosit gambar **B** berupa akumulasi lemak didalam sitoplasma yang membuat inti sel hepatosit bergeser ketepi. Akumulasi lemak ini terjadi karena peningkatan *intake* gliserol dan asam lemak kedalam hepar akibat kondisi resistensi insulin yang

menyebabkan terjadinya peningkatan lipolisis pada jaringan adiposa. Kondisi resistensi insulin juga dapat mengganggu kerja enzim *lipoprotein lipase* (LPL) yang mengakibatkan TG tidak dapat keluar dari sel hepar dan terjadilah penumpukan lemak dihepar. Ciri nekrosis pada gambar **B** tampaknya sel hepar tanpa pulasan inti (kariolisis). Nekrosis ini terjadi karena penumpukan lemak yang menyebabkan pembentukan *reactive oxidants* dan menginduksi reaksi peroksidasi pada lemak yang menyebabkan kerusakan oksidatif.

Pada kelompok perlakuan 1 (**C**), merupakan tikus DM tipe 2 dan diberi ekstrak pegagan dengan dosis sebesar 75 mg/kg BB, terjadinya pelebaran sinusoid. Menurut Oktavianti (2005), pelebaran sinusoid terjadi karena adanya penumpukan lemak pada sel hepar akibat resistensi insulin yang menyebabkan terjadinya perubahan susunan sel dan menyebabkan bentuk sinusoid tampak melebar.

Pada kelompok perlakuan 2 (**D**), merupakan tikus DM tipe 2 dan diberi ekstrak pegagan dengan dosis 150 mg/kg BB. Pada kelompok ini, gambaran histopatologi organ hepar hanya terjadi perlemakan hepar. Perlemakan hepar ditunjukkan dengan vakuola kosong didalam sitoplasma hepar. Proses perlemakan ini bersifat *reversible* dan disebabkan oleh pengeluaran transfer lipid dari dalam sel terhambat dan ketidakseimbangan sintesis dan juga pelepasan trigliserida oleh sel parenkim ke sirkulasi (Fransisco *et al.*, 2018).

Sedangkan kelompok perlakuan 3 (**E**) merupakan kelompok tikus DM tipe 2 dan diberi ekstrak pegagan dengan dosis 300 mg/kg BB. Berdasarkan gambaran histopatologi dari kelompok P3 masih terdapat sedikitnya pelebaran

sinusoid dan terjadinya kariolisis. Pelebaran sinusoid terjadi karena adanya penumpukan lemak pada sel hepar akibat resistensi insulin. Nekrosis terjadi karena meningkatnya radikal bebas akibat akumulasi lemak pada organ hepar. Menurut Umniyah (2007) radikal bebas akan menyerang membran sel yang tersusun atas fosfolipid sehingga menyebabkan gangguan permeabilitas membran sel. Permeabilitas membran sel terganggu dapat meningkatkan influks kalsium yang berasal dari ekstrasel ataupun dari mitokondria dan retikulum endoplasma. Peningkatan influks kalsium mengaktifkan enzim perusak seperti protease yang dapat merusak DNA. Ketika DNA rusak poliribosom meningkat dan terjadi pengosongan NAD yang mengakibatkan sintesis ATP terhambat. Penghambatan pembentukan ATP menyebabkan nekrosis pada sel.

Pada hasil uji kuantitatif flavanoid pada ekstrak etanol pegagan diketahui bahwa ekstrak tersebut memiliki kandungan flavanoid 5% (**Lampiran 3**). Flavanoid yang berfungsi sebagai antioksidan pada pegagan akan melengkapi sistem pertahanan tubuh untuk menangkal radikal bebas sehingga dapat membatasi kerusakan yang diakibatkan. Sistem pertahanan antioksidan bekerja dengan cara berinteraksi langsung dengan radikal bebas untuk mencegah pembentukan senyawa oksigen reaktif, atau mengubah senyawa reaktif menjadi kurang reaktif (Winarsih, 2007). Proses mekanisme penetralan radikal bebas oleh antioksidan digolongkan menjadi dua, yaitu mekanisme *Hydrogen Atom Transfer* (HAT) dan *Electron Transfer* (ET). Reaksi HAT terjadi dengan cara antioksidan (AH) akan memberikan salah satu

atom hidrogen (H) kepada radikal bebas (X^*) sehingga akan terbentuk senyawa radikal yang tidak reaktif (XH). Sementara itu reaksi ET terjadi akibat reaksi reduksi oksidasi (redoks) antara radikal (X^*) dengan antioksidan (AH) akan menghasilkan produk stabil (XH) dan air (H_2O). Pada kondisi radikal bebas yang tidak reaktif, sel hepatosit dapat meregenerasi diri. Regenerasi diperlukan untuk menggantikan sel yang mengalami kerusakan pada organ. Menurut Michalopoulos (2007) proses regenerasi pada hepatosit terjadi dengan cara menggandakan diri yang ditandai dengan adanya sel binukleat pada hepatosit.

Berdasarkan pengamatan histopatologi organ hepar pada kelompok terapi memiliki kerusakan lebih sedikit jika dibandingkan dengan kontrol positif. Hal ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak pegagan dapat memperbaiki kerusakan pada histopatologi hepar. Pemberian dosis efektif kelompok terapi ditunjukkan pada kelompok P2 dengan pemberian dosis pegagan sebesar 150 mg/kg BB yang memiliki kerusakan paling sedikit dibandingkan kelompok P1 dan P3. Kandungan flavonoid dalam ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) pada P2 memiliki kemampuan penyerapan ekstrak pada usus paling baik sehingga dapat bekerja lebih cepat dalam memperbaiki kerusakan di hepar.

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka didapatkan kesimpulan yaitu :

1. Pemberian ekstrak etanol pegagan dapat menurunkan kadar SGPT dengan dosis efektif 150 mg/kg BB pada tikus model DM tipe 2.
2. Pemberian ekstrak etanol pegagan dapat memperbaiki organ hepar dengan dosis efektif sebesar 150 mg/kg BB pada tikus model DM tipe 2.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah didapatkan, perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai kandungan lain dari ekstrak pegagan yang berpengaruh terhadap penurunan kadar SGPT dan memperbaiki organ hepar pada tikus model DM tipe 2.

DAFTAR PUSTAKA

- ADA [American Diabetes Association]. 2010. *Clinical Practice Recommendations: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classifications of Diabetes Mellitus Diabetes Care*. USA.
- Adjie, D. 2008. *Hubungan Konsentrasi Malondialhedia, Glukosa, dan Total Kolesterol pada Tikus yang Diinjeksikan dengan Streptozotocin* [Tesis]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Gajah Mada.
- Ali, G. 2011. Flavonoids and Phenolic Acids: Role and Biochemical Activity in plants and Human. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(31): 697–703.
- Amic, D., D. Beslo, N. Trinajstic, and Davidovic. 2003. Structure-Radical Scavenging Activity Relationship of Flavonoids. *Croatia Chemica Acta* 76: 55-61.
- Banfield Pet Hospital. 2016. *State of Pet health 2016 Report*. Banfield Pet Hospital, USA. 2-13.
- Barnett, S. and Anthony. 2002. *The Story of Rats: Their Impact on Us and Our Impact on Them*. Crows Nest NSW, New York.
- Coskun, O., M. Kanter, A. Korkmaz, and S. Oter. 2005. Quercetina a Flavonoid Antioxidant, Prevent and Protects Streptozotocin Induced Oxidative Stress and Beta Cell Damage in Rat Pancreas. *Pharmacol Research* 51(2): 117-123.
- Cotelle, N. 2001. Role of flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Med Chem* 1(6) : 569- 590.
- Depkes [Departemen Kesehatan]. 2005. *Pharmaceutical Care untuk Penyakit Diabetes Melitus*. Jakarta. 14-22.
- Dipiro, J.T., Wells, B.G., Schwinghammer, T.L., Dipiro, C.V. 2009. *Pharmacotherapy handbook Seven Edition*, The McGraw-Hill Companies, United States of America.
- Eleazu, C.O., K.C. Eleazu, and S. Chukwuma. 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* 12: 60.



- Firdaus, Rimbawan, S.A. Marliyati, dan K. Roosita. 2016. Model Tikus Diabetes Yang Diinduksi Streptozotocin-Sukrosa Untuk Pendekatan Penelitian Diabetes Melitus Gestasional. *Jurnal Mkmi* 12(1): 29-34.
- Fitriyani. 2012. *Faktor Risiko Diabetes Melitus Tipe 2 di Puskesmas Kecamatan Citangkil dan Puskesmas Kecamatan Pulo Merak Kota Cilegon* [Skripsi]. Fakultas Kesehatan Masyarakat. Universitas Indonesia.
- Francisco J.S., L. Waldo, J. Garcia, L. Isadora, and S. Karin. 2018. Histopathological and immunohistochemical characterisation of hepatic granulomas in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice: a time-course study. *Parasites Vector J* 11(73):1-9.
- Gao, Z., X. Zhang, A. Zuberi, D. Hwang, M. J. Quon, M. Lefevre, dan J. Ye. 2004. Inhibition of Insulin Sensitivity by Free Fatty Acids Requires Activation of Multiple Serine Kinases in 3T3-L1 Adipocytes. *Molecular Endocrinology* 18(8):2024-2034.
- Gartner, L.P. Hiatt, dan J.L. Strum. 2012. *Biologi Sel dan Histologi*. Edisi ke-6. Binarupa Aksara Publisher, Jakarta.
- Hardjono, H. 2007. *Interpretasi Hasil Tes Laboratorium Diagnostik*. Hasanuddin University Press, Makassar.
- Holmes, A., L. J. Coppey, E. P. Davidson, and M. A. Yorek. 2015. Rat Models of Diet Induced obesity and High Fat/Low Dose Steptozotocin Type 2 Diabetes: Effect of Reversal of High Fat Diet Compared to Treatment with Enalapril or Menhaden Oil on Glucose Utilization and Neuropathic Endpoints. *Journal of Diabetes Research*. 2015:8.
- Hurrle, S. and W. H. Hsu. 2017. The Etiology of Oxidative Stress in Insulin Resistance. *Biomedical Journal* 40: 257-262.
- Iswara, R.A.F.W. 2010. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun *Cyclea barbata L.Miers* terhadap motilitas Spermatozoa Mencit BALB C Jantan yang dipapar Asap Rokok [Skripsi]. Universitas Dipenogoro
- Junqueira, L.C. dan J. Carneiro. 2007. *Histologi Dasar*. Edisi 10. EGC, Jakarta.
- Kemala. 2016. *Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Bangunbangun (Plectrahthus amboinicus Lour Spreng) Terhadap Berat Badan, Kadar Sgpt, Sgot, dan Gambaran Histologi Hati Tikus Putih (Rattus norvegicus) Diabetik yang Diinduksi Aloksan* [Skripsi]. Jurusan Biologi. Universitas Negri Medan.
- King, A.F.J. 2012. The Use of Animal Models in Diabetic Research. *British Journal of Pharmacy* 166: 877-894.

- Kosasih, E.N. 2008. *Tafsiran Hasil Pemeriksaan Laboratorium Klinik*. KARISMA Publishing Group, Jakarta.
- Kuehnel, W. 2002. *Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy*. 4 th Edition. Thieme, Germany.
- Kumar M.H. and Y.K. Gupta. 2003. Effect of *Centella asiatica* on Cognition and Oxidative Stress in An Intracerebriventricular Streptozotocin Model of Alzheimer's Disease in Rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 30: 336-342.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Airlangga University Press, Surabaya.
- Maharani, P. 2007. Histopatologi Organ Hati dan Mata pada Tikus Penderita Diabetes Melitus Eksperimental [Sripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Maley, K., and L. Komasara L. 2003. *Introduction to Lab Animal* http://www.medaille.edu/vmacer/120_lab_rodentlab1.htm. [26 Januari 2019].
- Martins, P.N.A, and P. Neuhaus. 2007. Surgical Anatomy of the Liver, Hepatic Vasculature and Bile Ducts in the Rat. *Liver International*. 27(3): 92-384.
- Maulana, M. 2009. *Mengenal Diabetes Melitus: Panduan Praktis Menangani Penyakit Kencing Manis*. Penerbit Kata Hati, Yogyakarta.
- Michalopoulos, G.K. 2007. Liver Regeneration. *Journal Cell Physiol* 213 (2): 286-300.
- Nugrahani, D.A. dan Sofiah, V. 2011. Analisis Sgpt-Sgot Ekstrak Etanol Daging Buah Pare (*Momordica Charantia L.*) pada Tikus Jantan Putih Galur Wistar. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian* 2(1): 43-49.
- Nugroho, A.E. 2006. Hewan Percobaan Diabetes Mellitus: Patologi dan Mekanisme Aksi Diabetogenik. *Biodiversitas* 7(4): 378-382.
- Oktavianti, R. 2005. *Struktur Hepar Mencit (Mus musculus L.) setelah Pemberian Aspartam Secara Oral*. *Enviro*: 5: 30-31.
- Pereira D.F., L.H. Cazarolli, C. Lavado, V. Mengatto, M.S. Figueiredo, A. Guedes, M.G. Pizzolatti, and F.R. Silva. 2011. Effects of Flavonoids on α -

Glucosidase Activity: Potential Targets for Glucose Homeostasis. *Journal Nutrition* 27(11): 1161- 1167.

Perkeni [Perkumpulan Endokrinologi Indonesia]. 2011. *Konsensus Diabetes Mellitus Tipe 2 Indonesia*.

Rahmah, N.L. 2012. The Potency of Sargassum Duplicatum Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy in *Rattus norvegicus*. *Journal of Life Sciences* 6: 144-145.

Raza, H. and A. John. 2013. Streptozotocin-Induced Cytotoxicity, Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Human Hepatoma HepG2 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 5751-5767.

Redha, A. 2010. Flavonoids: Structure, Antioxidative Properties and Its Role in Biological Systems. *Jurnal Berlian* 9(2):196–202.

Sari, P.A.M. 2016. *Ketoksikan Akut Kombinasi Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (Hibiscus sabdariffa L.) dan Daun Belanda (Guazuma ulmifolia lamk.) dengan Parameter Kadar SGOT dan SGPT Tikus Putih Jantan (Rattus norvegicus) [Skripsi]*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.

Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine*. Mosby. Inc, USA.

Skovso, S. 2014. Modeling Type 2 Diabetes in Rats Using High Fat Diet and Streptozotocin. *Journal of Diabetes Investigation*. 5: 349-358.

Snell, R.S. 2012. *Anatomi Klinis Berdasarkan Sistem*. EGC, Jakarta.

Srinivasan, K., B. Viswanad, L. Asrat, C. L. Kaul dan P. Ramarao. 2005. Combination of High-Fat Diet-Fed and Low-Dose Streptozotocin-Treated Rat: A Model for Type 2 Diabetes and Pharmacological Screening. *Pharmacological Research* 52: 313-320.

Sugondo, S., P. Soewondo, dan I. Subekti. 2009. *Penatalaksanaan Diabetes Melitus Terpadu*. Edisi Ke-2. Universitas Indonesia Press, Jakarta.

Sujono, A.T., S.W. Arifah, D. Muhammad, T.D.K. Ika, dan S. Andi. 2015. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Meniran (*Phyllanthus Niruri L*) Selama 90 Hari Terhadap Fungsi Hati Tikus. *Journal University Research Colloquium*. 136-142.

Sulistyoningrum, E. 2010. Tinjauan Molekular dan Aspek Klinis Resistensi Insulin. *Mandala of Health* 4(2): 131-138.

Sunarsih, E.S., Djatmika., dan R.S. Utomo. 2007. Pengaruh Pemberian Infusa Umbi Gadung terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Tikus Putih Jantan

Diabetes yang di Induksi Aloksan. *Majalah Farmasi Indonesia* 18 : 29-33

- Sutardi. 2016. Kandungan Bahan Aktif Tanaman Pegagan dan Khasiatnya untuk Meningkatkan Sistem Imun Tubuh. *Jurnal Litbang Pertanian* 35(3): 121-130.
- Tjitrosoepomo, G. 2005. *Taksonomi Tumbuhan Obat-obatan*. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Tolman, K. 2006. *Spectrum of Liver Disease in Type 2 Diabetes and Management of Patients with Diabetes and Liver Disease*. [http:// care.diabetesjournals.org/cgi/30/3/734](http://care.diabetesjournals.org/cgi/30/3/734). [26 Januari 2019].
- Tormo, M.A., I.E. Gil, A.R. Tejada, and J.E. Campillo. 2006. *White Bean Amylase Inhibitor Administered Orally Reduces Glycaemia*.
- Vallabhajosula, S. 2009. *Molecular Imaging Radiopharmaceuticals for PET and SPECT*. Springer, New York.
- Wardhana, A. 2010. Pemberian Jintan Hitam (*Nigella sativa*) sebagai Tindakan Prefentif Meningkatkan Kadar Glukosa Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinjeksi Aloksan. *Artikel Ilmiah*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- WHO [World Health Organization]. 2009. *Diabetes*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>. [1 Februari 2019].
- WHO [World Health Organization]. 2016. *Global Report on Diabetes*. World Health Organization Library Catalog. 21-25.
- Winarsih, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius, Yogyakarta.
- Winarto, W.R. dan M. Surbakti. 2003. *Khasiat dan Manfaat Pegagan*. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Wresdiati, T. dan Astawan. 2005. Deteksi Secara Imunohistokimia antioksidan dan Super Oksida Dismutase (SOD) Pada Jaringan Tikus Hiperkolesteromia yang Diberi Pakan Rumput Laut. *Laporan Penelitian*. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Zhang, M., X. Yan, J. Li, Z.G. Xu, and L. Chen. 2008. The Characterization of High-Fat Diet and Multiple low-Dose Streptozotocin Induced Type 2 Diabetic Rat Model. *Hindawi Publising Corporation Experimental Reseach* 1-9.