

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN PEGAGAN  
(*Centella asiatica*) TERHADAP KADAR *BLOOD UREA NITROGEN*  
(BUN) DAN HISTOPATOLOGI GINJAL TIKUS YANG  
DIINDUKSI DENGAN STREPTOZOTOCIN  
DAN HFD (*High Fat Diet*)**

**SKRIPSI**

Oleh :  
**AHLIA UMMUL MASLAKAH**  
**155130101111007**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

repository.ub.ac.id

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN PEGAGAN  
(*Centella asiatica*) TERHADAP KADAR *BLOOD UREA NITROGEN*  
(BUN) DAN HISTOPATOLOGI GINJAL TIKUS YANG  
DIINDUKSI DENGAN STREPTOZOTOCIN  
DAN HFD (*High Fat Diet*)**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :  
**AHLIA UMMUL MASLAKAH**  
**155130101111007**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella Asiatica*) Terhadap Kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN) Dan Histopatologi Ginjal Tikus Yang Diinduksi Dengan Streptozotocin Dan HFD (*High Fat Diet*)**

Oleh :

**AHLIA UMMUL MASLAKAH**  
155130101111007

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
Pada tanggal 30 April 2019  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II



**Prof. Ir. Hendrawan S., M.Rur.Sc, PhD**  
NIP. 19530602 198003 1 003

**drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P. 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 : Ahlia Ummul Maslakah

NIM : 155130101111007

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

“Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella Asiatica*) Terhadap Kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN) Dan Histopatologi Ginjal Tikus Yang Diinduksi Dengan Streptozotocin Dan HFD (*High Fat Diet*)”

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat 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, 02 Mei 2019

Yang menyatakan,

(Ahlia Ummul Maslakah)

NIM. 155130101111007

repository.ub.ac.id

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella Asiatica*) Terhadap Kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN) Dan Histopatologi Ginjal Tikus Yang Diinduksi Dengan Streptozotocin Dan HFD (*High Fat Diet*)**

**ABSTRAK**

Diabetes mellitus tipe 2 adalah gangguan metabolisme yang ditandai dengan adanya resistensi insulin dan penurunan fungsi sel  $\beta$  pankreas. Kondisi DM Tipe 2 yang berlangsung lama dapat menyebabkan komplikasi ke berbagai organ seperti ginjal karena kondisi hiperglikemia dan peningkatan radikal bebas. Pegagan (*C. asiatica*) adalah salah satu tanaman yang digunakan sebagai obat herbal karena mengandung flavonoid yang mampu mengurangi radikal bebas dan dapat meningkatkan sensitivitas insulin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek terapi ekstrak daun pegagan. Tikus DM Tipe 2 dihasilkan dengan induksi 40 gram/ekor/hari HFD dan induksi streptozotocin dosis 30 mg/Kg BB secara intraperitoneal. Penelitian ini menggunakan 28 tikus yang dibagi secara acak kedalam 7 kelompok perlakuan, yaitu Kontrol Negatif, Kontrol Positif, kelompok P1 (75mg/kgBB), P2 (150 mg/kg BB), P3 (300 mg/kg BB), P4 (600 mg/kg BB) dan P5 (1200 mg/kg BB) dengan masing-masing 4 ulangan. Sampel darah diambil melalui vena *coccygea* pada hari ke-1, ke-35 dan ke-43 untuk mengukur kadar glukosa dan semua tikus dieutanasi pada hari ke-43 sejak percobaan pertama dan sampel darah diambil secara *intracardial* untuk pengukuran kadar BUN. Parameter yang digunakan adalah kadar BUN yang dan gambaran histopatologi ginjal. Analisis data BUN menggunakan uji *One Way ANOVA* dan uji lanjutan Tukey dengan tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha=0.05$ ). Hasil penelitian menunjukkan terapi ekstrak daun pegagan mampu menurunkan kadar BUN secara signifikan ( $p<0.05$ ) dan mampu memperbaiki kerusakan glomerulus ginjal yang dibuktikan dengan tidak terbentuknya *glomerulosclerosis* dan berkurangnya kematian sel berupa piknosis dan karioreksis pada glomerulus. Dosis terbaik dari penelitian ini adalah 150 mg/kg BB, sehingga dapat disimpulkan bahwa terapi ekstrak daun pegagan dapat menurunkan kadar BUN dan memperbaiki kerusakan ginjal pada tikus DM Tipe 2.

**Kata Kunci** : DM Tipe 2, ekstrak daun pegagan, HFD, histopatologi ginjal, kadar BUN, streptozotocin.

repository.ub.ac.id

**The Effect Of Ethanol Extracted Gotu Kola (*Centella asiatica*) Administration On BUN (*Blood Urea Nitrogen*) And Histopathology Of Rat Kidney Induced by Streptozotocin And HFD (*High Fat Diet*)**

**ABSTRACT**

Type 2 diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by insulin resistance and pancreatic  $\beta$  cell dysfunction. Chronic Type 2 DM has been considered as an ethiology of serious complication and damage of essential organ such as kidney. Such a damage is generally attributed to prolong hyperglycemia and increase levels of free radical in the circulating blood. Gotu kola is one of the few plants utilized as herbal medicine because it contains flavonoid which can decrease the amount free radicals and increase insulin sensitivity to suffer from type 2 DM. The research is aims to discover the therapeutic effect of ethanol extracted gotu kola. The rats induced with 40 grams/rat/day of HFD and induced with streptozotocin 30 mg/kg BW intraperitoneally. A total of 28 rats were divided randomly into 7 group treatments, that is negative control, positive control, and group P1 (75mg/kg BW), P2 (150 mg/kg BW), P3 (300 mg/kg BW), P4 (600 mg/kg BW) and P5 (1200 mg/kg BW) with 4 replicates each. Blood samples were taken through the coccygeal vein on days 1<sup>st</sup>, 35<sup>th</sup> and 43<sup>th</sup> to measure glucose concentrations dan all rats were euthanized at 43 days since the on set of experiment and blood samples were taken intracardially for BUN. The parameters of this study are BUN concentrations and renal histopathology. The data of BUN level is analyzed using One Way ANOVA test and Tukey test with a confidence level of 95% ( $\alpha = 0.05$ ). The results showed that the treatment with gotu kola extract significantly reduced BUN concentrations ( $p < 0.05$ ) and could restore renal glomerular damage as shown by no formation of glomerulosclerosis and reduced glomerular cell necrosis such as picnosis and karyorrhesis. The most promising dose demonstrated by the dose of 150 mg/kg BW. In conclusion, ethanol extracted gotu kola maybe considered as alternative herbal medicine to decelerate BUN concentrations in type 2 DM patient with concomitant restoring effect of kidney histopathology.

**Keywords:** BUN levels, gotu kola ethanol extract, HFD, kidney histopathology, STZ, Type 2 DM.



## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan berkat dan anugrah-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul **“Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella Asiatica*) Terhadap Kadar Blood Urea Nitrogen (BUN) Dan Histopatologi Ginjal Tikus Yang Diinduksi Dengan Streptozotocin Dan HFD (*High Fat Diet*)”** ini dapat terselesaikan. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof.Ir.Hendrawan S.,M.Rur.Sc.PhD selaku dosen pembimbing I yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, motivasi dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini
2. drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P., M.Biotech selaku dosen pembimbing II yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, , dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
3. Ibu Dhita Evi Aryani. S.Farm, Apt., M.Farm.Klin selaku dosen penguji I yang telah meluangkan waktu dan memberikan masukan serta arahan kepada penulis dalam penyempurnaan proposal skripsi ini.
4. drh. Aldila Noviatry, M.Biomed selaku dosen penguji II yang telah meluangkan waktu dan memberikan masukan serta arahan kepada penulis dalam penyempurnaan proposal skripsi ini.

5. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku dekan Fakultas Kedokteran Hewan Univesitas Brawijaya
6. Ayahanda Markuat dan Ibunda Sutrismi, kedua orang tua tercinta serta adik laki-laki Abdul Hamid Ahsani Taqwim yang senantiasa memberikan dorongan, semangat dan doa yang tiada henti demi keberhasilan penulis.
7. Kelompok Penelitian “Diabetes Mellitus” Aca, Fidia, Ika, Putri, Junda yang selalu memberikan support, keceriaan, serta kerjasama yang baik selama penelitian berlangsung.
8. Teman-teman rekan sejawat “Kos Abah” Yuni, Leny, Nury yang telah banyak menemani dikala suka, duka serta memberikan banyak dukungan berupa semangat, motivasi, keceriaan serta do’a dalam menyelesaikan tugas skripsi.
9. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan namanya satu persatu yang turut serta dalam memberi motivasi, dukungan serta do’a kepada penulis.
10. Teman-teman Kedokteran Hewan 2015 khususnya kelas Decode yang selalu memberikan semangat, inspirasi dan keceriaan.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan hasil dari penelitian ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang, 10 Februari 2019

Penulis



## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN</b> .....	<b>xiii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
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
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>7</b>
2.1 Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) .....	7
2.1.1 Kandungan Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) .....	8
2.2 Hewan Coba Tikus ( <i>Rattus Novergicus</i> ) DM tipe 2 .....	10
2.3 Diabetes Mellitus Tipe 2 .....	11
2.4 Ginjal .....	13
2.5 <i>Blood Urea Nitrogen</i> (BUN) .....	16
2.6 Bahan Induksi .....	18
2.6.1 Pakan Tinggi Lemak .....	18
2.6.2 <i>Streptozotocin</i> (STZ) .....	20
<b>BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> .....	<b>23</b>
3.1 Kerangka Konseptual .....	23
3.2 Hipotesis Penelitian .....	26
<b>BAB IV METODE PENELITIAN</b> .....	<b>27</b>
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	27
4.2 Alat dan Bahan .....	27
4.3 Rancangan Penelitian .....	28
4.4 Sampel Penelitian .....	28
4.5 Variabel Penelitian .....	29
4.6 Tahapan Penelitian .....	29
4.6.1 Persiapan Hewan Coba .....	28
4.6.2 Prosedur Pembuatan Hewan Model DM2 .....	29
4.6.3 Pembuatan Ekstrak Ethanol Daun Pegagan .....	31
4.6.4 Pengambilan Organ Ginjal Tikus .....	32
4.6.5 Pembuatan Preparat Histopatologi .....	32



4.6.6 Pengukuran kadar BUN.....	33
4.6.7 Pengamatan Preparat Histopatologi Ginjal .....	34
4.7 Analisis Data.....	34
<b>BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>36</b>
5.1 Pengaruh Ekstrak Pegagan Terhadap Kadar Glukosa.....	36
5.2 Pengaruh Ekstrak Pegagan Terhadap Kadar BUN.....	40
5.3 Pengaruh Ekstrak Pegagan Terhadap Histopatologi Ginjal .....	45
<b>BAB VI PENUTUP .....</b>	<b>52</b>
6.1 Kesimpulan .....	52
6.2 Saran .....	52
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>53</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>61</b>



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1. Tabel Kadar Glukosa .....	37
2. Tabel Kadar BUN .....	40



## DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	<i>Centella asiatica</i> .....	7
2.2	Struktur Kimia Kuersetin.....	9
2.3	Makroskopis Ginjal Tikus Putih .....	14
2.4	Mikroskopis nefron ginjal normal pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin</i> (HE) perbesaran 400X .....	15
2.5	Mikroskopis nefron ginjal kondisi diabetes mellitus pewarnaan HE mengalami hipertrofi di sel tubulus perbesaran 400X.....	16
2.5	Mekanisme resistensi insulin yang ditimbulkan oleh FFA .....	19
2.6	Fase reaksi glukosa darah setelah induksi STZ.....	21
2.7	Mekanisme STZ dalam kerusakan DNA sel $\beta$ pancreas .....	22
2.8	Gambar Histopatologi Ginjal .....	46



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Sertifikat Laik Etik .....	62
2. Sertifikat Uji Fitokimia .....	63
3. Sertifikat Uji Determinasi .....	64
4. Sertifikat Uji Kuantitatif Flavonoid.....	65
5. Pembuatan Larutan STZ.....	67
5.1 Pembuatan Larutan Buffer Sitrat pH 4,5 .....	67
5.2 Pembuatan Larutan Streptozotocin.....	67
6. Perhitungan Dosis Ekstrak Ethanol Daun Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) .....	68
7. Rancangan Perlakuan .....	70
8. Kerangka operasional .....	72
9. Anatomi Tikus .....	73
9.1 Pengambilan Organ Ginjal pada Hewan Coba .....	73
10. Metode pembuatan preparat HE .....	74
11. Metode Pengukuran Kadar BUN.....	75
12. Data kadar Glukosa .....	76
13. Statistik Kadar BUN .....	77
13.1 Uji Normalitas .....	77
13.3 Uji Deskriptif.....	78
13.4 Uji Homogenitas.....	78
13.3 Uji ANOVA.....	80
13.5 Tukey Test .....	81
14. Statistik Kadar Glukosa.....	81
13.1 Uji Normalitas .....	81
13.5 Uji Deskriptif.....	81
13.6 Uji Homogenitas.....	82
13.3 Uji ANOVA.....	82
13.5 Tukey Test .....	83



## DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Keterangan
ADP	<i>Adenosinediphosphate</i>
AGEs	<i>Advanced Glycation End-products</i>
BUN	<i>Blood Urea Nitrogen</i>
DAG	<i>Diacylglycerol</i>
dL	<i>desiliter</i>
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
FFA	<i>Free Fatty Acid</i>
GDM	<i>Gestasional Diabetes Mellitus</i>
GFR	<i>Glomerulo Filtration Rate</i>
GLDH	<i>Glutamate dehydrogenase</i>
GLUT	<i>Glucose Transporter</i>
HE	<i>hematoxylin eosin</i>
HFD	<i>high fat-diet</i>
IGT	<i>Impaired Glucose Tolerance</i>
IKK	<i>Inhibitor <math>\kappa</math>B Kinase</i>
IRS	<i>Insulin Receptor Substrate</i>
JNK	<i>c-JUN NH<sub>2</sub>-Terminal Kinase</i>
Kg	<i>Kilogram</i>
MCP-1	<i>monosit chemoattractant protein-1</i>
Mg	<i>milligram</i>
ml	<i>mililiter</i>
Na	<i>Natrium</i>
NADH	<i>Nicotinamide Adenin Dinucleotide</i>
P1-3K	<i>Phosphatidylinositol-3 Kinase</i>
PFA	<i>paraformaldehyde</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
RAL	<i>Rancangan Acak Lengkap</i>
ROS	<i>reactive oxygen spesies</i>
STZ	<i>streptozotocin</i>
TRIS	<i>Trishydroxymethylaminomethane</i>
TTGO	<i>Toleransi Glukosa Oral</i>



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus (DM) merupakan suatu gangguan klinis dan genetik yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa atau hiperglikemia dalam darah (Maureen, 2004). Jumlah penderita diabetes menurut data WHO diprediksikan meningkat dari 2.8% pada tahun 2000 menjadi 4.4% pada tahun 2030 dan diperkirakan masih akan terus meningkat setiap tahunnya (Wild *et al.*, 2004). Pada umumnya, Diabetes Mellitus diklasifikasikan menjadi beberapa kategori yaitu, DM tipe 1 yang disebabkan karena destruksi sel  $\beta$  pankreas sehingga terjadi defisiensi insulin dan DM tipe 2 disebabkan karena dua hal yaitu (1) resistensi insulin dan (2) Penurunan kemampuan sel  $\beta$  pankreas untuk mensekresi insulin sebagai respon terhadap kelebihan glukosa (Dipiro *et al.*, 2009).

Diabetes melitus adalah penyakit metabolik yang kini sering terjadi pada hewan seperti anjing dan kucing. Terjadi kenaikan laporan kasus DM pada tahun 2011 di Amerika Serikat, pada anjing sebanyak 32% dan kucing sebanyak 16% jika dibandingkan dengan tahun 2006 (Banfield Pet Hospital, 2016). Salah satu peningkatan prevalensi diabetes melitus yang sering terjadi diantara hewan yaitu anjing dengan DM tipe 2. Penyakit DM pada anjing memiliki gejala yang sama dengan penyakit DM pada manusia. Pada umumnya, anjing yang lebih tua mempunyai kecenderungan untuk bertambah berat badannya, karena tenaga yang dibebankan pada pankreas lebih besar.

Diabetes melitus tipe 2 diawali dengan peningkatan kadar gula darah (hiperglikemik) (Dipiro *et al.*, 2009). Penyakit hiperglikemia pada anjing mengakibatkan adanya pembentukan radikal bebas yang akan memicu munculnya beberapa komplikasi kronik, baik mikroangiopati maupun makroangiopati (Rehman *et al.*, 2005). Peningkatan glukosa pada penderita DM yang mempunyai predisposisi genetik yang merupakan faktor utama ditambah faktor lainnya yang dapat menimbulkan nefropati. Glukotoksisitas terhadap membran dapat melalui jalur metabolik yang diawali dengan hiperglikemia. Kondisi kelebihan glukosa menyebabkan glukosa dapat bereaksi secara proses non enzimatik dengan asam bebas menghasilkan AGE's (*Advanced Glycosilation End-Products*).

Produk AGE's dapat merusak sel, karena mengganggu struktur protein intrasel dan ekstrasel seperti kolagen. Adanya penimbunan AGE's dalam jangka panjang juga akan merusak membran basalis dan mesangium yang menyebabkan gangguan hemodinamik dan hipertrofi yang mendukung adanya hiperfiltrasi glomerulus (Chin, 2014). Hiperfiltrasi akan menyebabkan terjadinya filtrasi protein meningkat sehingga akan terjadi akumulasi protein dalam sel epitel dan menyebabkan pelepasan sitokin inflamasi seperti endotelin-1, osteoponin dan monosit *chemoattractant* protein-1 (MCP-1) yang menyebabkan kerusakan tubulus dan terjadi *renal injury*.

Salah satu parameter untuk mengetahui kerusakan ginjal dapat dilihat dengan pemeriksaan kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN). Peningkatan BUN umumnya menunjukkan penurunan pada fungsi ginjal (Horne and Swearingen,

2001). Menurut Vetlearn (2011) beberapa kondisi yang dapat menyebabkan kadar BUN meningkat yaitu dehidrasi infeksi ginjal, gagal ginjal dan penyakit toksik pada ginjal.

Pengobatan DM tipe 2 yang telah banyak digunakan yaitu obat-obatan kimia seperti glibenklamid, namun penggunaan obat dalam jangka panjang akan menimbulkan efek yang membahayakan bagi tubuh. Oleh karena itu, dibutuhkan suatu alternatif pengobatan yang dapat berkhasiat mengobati serta memiliki efek samping yang rendah. Di Indonesia, tanaman herbal akhir-akhir ini telah banyak dikembangkan menjadi obat herbal, karena selain berkhasiat untuk mengobati, pemberian herbal juga dapat memberikan efek samping yang lebih rendah dibandingkan dengan obat-obatan kimia, salah satu tanaman yang berpotensi untuk dijadikan obat herbal adalah tanaman pegagan.

Pegagan merupakan tanaman obat yang mengandung senyawa aktif seperti flavonoid dan triterpenoid glikosida terutama asiatikosida, asam asiatik, asam madekasik dan madekasosida (Hashim *et al.*, 2011). Berdasarkan hasil penelitian Hakim (2010), didapatkan bahwa kandungan flavonoid dalam ekstrak dan hasil rebusan daun pegagan dengan dosis 300 mg/kg BB berpengaruh terhadap perbaikan histologi pankreas yang diinduksi aloksan dan dapat meningkatkan kadar antioksidan. Adanya antioksidan dalam daun pegagan diharapkan dapat mengendalikan radikal bebas yang dapat merusak sel seperti organ sel ginjal dan juga dapat mengurangi kondisi komplikasi dari diabetes mellitus. Triterpenoid herba pegagan dapat digunakan sebagai obat diabetes mikroangiopati dengan meningkatkan mikrosirkulasi dan menurunkan permeabilitas pembuluh darah

kapiler (Jamil *et al.*, 2007). Berdasarkan latar belakang tersebut, tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui adanya pengaruh ekstrak etanol daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap kadar BUN dan histopatologi ginjal pada tikus model DM tipe 2.

## 1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah dari penelitian ini yaitu :

1. Apakah terjadi penurunan kadar BUN pada tikus model DM Tipe 2 hasil induksi STZ (*Streptozotocin*) dan HFD (*High Fatty Diet*) yang diterapi dengan ekstrak etanol pegagan (*C.asiatica*) terhadap tikus kontrol positif DM Tipe 2 ?
2. Apakah terdapat perbaikan gambaran histopatologi organ ginjal tikus model DM Tipe 2 hasil induksi STZ yang diterapi dengan ekstrak etanol pegagan (*C.asiatica*) terhadap tikus kontrol positif DM Tipe 2 ?

## 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih (*R. norvegicus*) jantan strain *Wistar* yang didapat dari Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dengan umur 2-3 bulan dan berat badan antara 150-200 gram. Penggunaan hewan coba telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No. 927-KEP-UB.

2. Hewan model DM tipe 2 dibuat dengan pemberian STZ pada hewan coba dengan dosis 30 mg/kg BB secara *intraperitoneal*, selama dua minggu dengan dua kali injeksi, dan juga pakan HFD (*High Fat Diet*) dengan pemberian 40 gram/ekor/hari selama 4 minggu.
3. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologi organ ginjal berupa perubahan struktur jaringan ginjal menggunakan pewarnaan HE (*Hematoxylin Eosin*) yang dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UB dan kadar BUN menggunakan metode spektrofotometri yang diuji di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran UB.
4. Pakan tinggi lemak (HFD) diperoleh dari Biosains Universitas Brawijaya.
5. Simplisia pegagan diperoleh dari UPT Materia Medica Batu yang telah memperoleh keterangan Determinasi dan ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmakologi FK UB menggunakan ethanol 96%.
6. Ekstrak etanol daun pegagan dengan dosis 75 mg/kg BB, 150 mg/kg BB tikus; 300 mg/kg BB tikus; 600 mg/kg BB tikus dan 1200 mg/kg BB tikus diberikan secara oral dengan menggunakan spuit (sonde lambung).

#### 1.4 Tujuan Penelitian

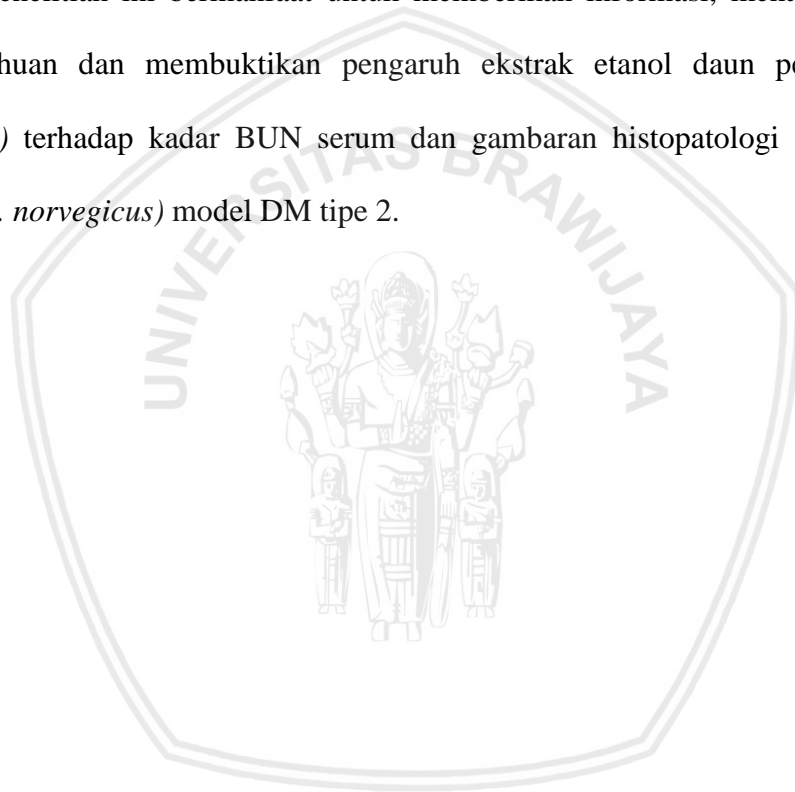
Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap kadar BUN serum pada tikus (*R. norvegicus*) model DM tipe 2.

2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap gambaran histopatologi organ ginjal tikus (*R. norvegicus*) model DM Tipe 2 hasil induksi STZ.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi, menambah ilmu pengetahuan dan membuktikan pengaruh ekstrak etanol daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap kadar BUN serum dan gambaran histopatologi ginjal pada tikus (*R. norvegicus*) model DM tipe 2.





## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

Pegagan adalah salah satu tumbuhan herbal yang dapat tumbuh di negara tropis seperti Indonesia. Pegagan merupakan tanaman rumput-rumputan yang belum banyak dibudidayakan dan hanya tumbuh liar di pekarangan rumah dan hutan (Wijayakusuma *et al.*, 1994). Pegagan ini berasal dari Asia tropik, tumbuh di tanah yang agak lembab, cukup sinar atau agak terlindung dari sinar matahari serta dapat ditemukan di daerah dataran rendah sampai dengan dataran dengan ketinggian 2.500 meter dpl (Hyene 1987; Dalimartha 2000; Januwati dan Yusron 2005). Bentuk dan morfologi pegagan (*C. asiatica*) dapat dilihat pada (**Gambar 2.1**).



**Gambar 2.1** *Centella asiatica* (Sutardi, 2009)

Klasifikasi tanaman pegagan yaitu (Winarto, 2003) :

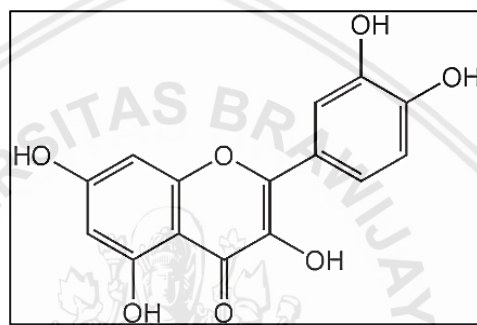
Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledone

Ordo : Umbiliferae  
Genus : Centella  
Spesies : *Centella asiatica*

### 2.1.1 Kandungan Pegagan (*Centella asiatica*)

Komponen bioaktif yang terdapat dalam tanaman pegagan adalah asiatikosida, tankunisida, isotankunisida, madekasosida, brahmosida, brahminosida, asam brahmik, asam madasiatik, mesoinositol, sentelosida, karotenoid, hidrokotilin, vellarin, tanin serta garam mineral seperti kalium, natrium, magnesium, kalsium dan besi (Wijayakusuma *et al.* 1994; Lasmadiwati *et al.* 2004), fosfor, minyak atsiri (1%), pektin (17.25%), asam amino, vitamin B, zat pahit vellarine dan zat samak (Dalimartha, 2006). Asiatikosida asam asiatik madekasida, dan madekasosida termasuk golongan triterpenoid. Senyawa Triterpenoid merupakan senyawa yang paling penting dalam tanaman pegagan. Triterpenoid berfungsi untuk meningkatkan fungsi mental dan memberi efek menenangkan. Senyawa ini juga dapat merevitalisasi pembuluh darah sehingga dapat memperlancar peredaran darah menuju otak. Asiatikosida merupakan bagian dari triterpenoid yang berfungsi menguatkan sel-sel kulit dan meningkatkan perbaikannya, menstimulasi sel darah dan sistim imun serta sebagai antibiotik alami. Brahmosida adalah senyawa yang berfungsi memperlancar aliran darah dan merupakan protein penting bagi sel otak. Herba pegagan juga dapat digunakan sebagai obat diabetes mikroangiopati dengan meningkatkan mikrosirkulasi dan menurunkan permeabilitas pembuluh darah kapiler (Jamil *et al.*, 2007).

Flavonoid juga merupakan komponen bioaktif tanaman pegagan yang bermanfaat bagi manusia. Menurut James *et al.*, (2008) kandungan yang paling banyak terdapat pada ekstrak daun pegagan adalah flavonoid jenis kuersetin. Kuersetin adalah senyawa kelompok flavonol terbesar yang berada dalam jumlah sekitar 60-75% dari flavonoid. Tiga gugus dari struktur kuersetin (**Gambar 2.2**) yang membantu dalam menjaga kestabilan dan bertindak sebagai antioksidan.



**Gambar 2.2** Struktur Kuersetin

Antioksidan ini mempunyai aktivitas menetralkan radikal bebas sehingga mencegah kerusakan oksidatif pada sebagian besar biomolekul dan menghasilkan proteksi terhadap kerusakan oksidatif secara signifikan (Rahmadani, 2009). Flavonoid juga memiliki sifat antihiperlikemia yaitu menurunkan konsentrasi glukosa darah, meningkatkan konsentrasi serum insulin, meningkatkan perbaikan atau proliferasi sel  $\beta$  pankreas, serta meningkatkan efek hormon insulin dan adrenalin (Rianti, 2013).

Menurut Prabowo (2002), Pegagan (*C. asiatica*) merupakan tanaman obat yang sedang dikembangkan sebagai obat tradisional, salah satunya sebagai antidiabetes. Pegagan dapat meningkatkan *uptake glucose* dengan meningkatkan respon reseptor insulin sehingga dapat digunakan sebagai obat antidiabetes mellitus tipe 2 (Vohra *et al.*, 2011 dalam Brinkhaus *et al.*, 2000).

## 2.2 Hewan Coba Tikus (*Rattus Novergicus*) DM Tipe 2

Hewan coba merupakan hewan yang dipelihara untuk digunakan sebagai hewan model untuk mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian dan pengamatan penelitian. *R. norvegicus* digunakan dalam setiap penelitian karena memiliki keunggulan berupa kadar amino, sistem metabolisme dan organnya hampir sama dengan manusia sehingga memudahkan dalam penelitian. Ciri-cirinya adalah rambut berwarna putih, mata merah, panjang tubuh total 440 mm, panjang ekor 205 mm dan pada usia dewasa berat badannya kisaran 100-150 gram. Adapun sistem klasifikasi *R. norvegicus* menurut Myers and Armitage (2004), adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Tikus putih (*R. norvegicus*) model DM tipe 2 dihasilkan dengan kombinasi gabungan antara pakan tinggi lemak (*High Fat-Diet* = HFD) dan STZ (Holmes, 2015). Pemberian pakan tinggi lemak akan menimbulkan keadaan hiperinsulinemia pada tikus yang akan berlanjut pada resistensi insulin dan intoleransi glukosa. Keadaan tersebut kemudian diperparah dengan induksi STZ

yang merupakan senyawa toksin bagi sel  $\beta$  pankreas dan menyebabkan penurunan fungsional signifikan pada sel  $\beta$  pankreas. Kombinasi pakan tinggi lemak dan STZ akan memunculkan kejadian patologis yang mirip dengan kondisi DM tipe 2 pada manusia dalam jangka waktu yang lebih pendek (King, 2012; Skovso, 2014).

### 2.3 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus adalah suatu gangguan metabolisme yang ditandai oleh hiperglikemia maupun abnormalitas dalam metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. Ketidaknormalan tersebut dapat terjadi karena penurunan sekresi insulin, penurunan sensitivitas insulin atau keduanya. Komplikasi kronis mikrovaskuler, makrovaskuler, dan neuropati juga dapat terjadi (Dipiro *et al.*, 2009). Menurut Rehman (2005), kadar gula yang tinggi (Hiperglikemia) akan menyebabkan terjadinya berbagai komplikasi kronik, baik mikroangiopati maupun makroangiopati.

Diabetes Mellitus dapat dibagi menjadi 2 tipe utama yaitu Diabetes Mellitus Tipe 1 (DM Tipe 1) dan Diabetes Mellitus Tipe 2 (DM Tipe 2). Selain dua tipe utama DM yang telah disebutkan, terdapat tipe diabetes lain seperti yaitu, *Impaired Glucose Tolerance (IGT)*, *Gestasional Diabetes Mellitus (GDM)* serta diabetes tipe lain yang disebabkan beberapa penyebab seperti zat kimia atau obat-obatan dan penyakit eksokrin pankreas (Depkes, 2005; WHO, 2016).

Diabetes mellitus tipe 1 terjadi akibat adanya kerusakan sel  $\beta$  pankreas pada pulau langerhans yang berfungsi untuk memproduksi hormon insulin. Penderita penyakit DM Tipe 1 akan mengalami defisiensi hormon insulin sehingga glukosa darah tidak dapat memasuki sel tubuh yang menyebabkan terjadinya

hiperglikemia. Kerusakan sel  $\beta$  pankreas dapat diakibatkan penyakit autoimun yang menyebabkan destruksi sel  $\beta$  pankreas. Faktor genetik adalah faktor pemicu terjadinya penyakit DM tipe 1.

Diabetes Mellitus tipe 2 merupakan penyakit yang heterogen, karena banyak faktor yang berpengaruh. Obesitas merupakan penyebab tertinggi terjadinya DM tipe 2, penyebab-penyebab yang lain adalah umur, rendahnya aktivitas fisik, hipertensi dan displidemia. Penyakit ini ditandai dengan adanya gangguan metabolik yaitu gangguan fungsi sel  $\beta$  pankreas dan resistensi insulin di jaringan perifer seperti jaringan otot dan jaringan lemak, dan juga resistensi insulin di hati (Tjandrawinata, 2016). Disamping resistensi insulin, pada penderita DM Tipe 2 dapat juga timbul gangguan sekresi insulin dan produksi glukosa hepatic yang berlebihan. Namun demikian, tidak terjadi pengrusakan sel-sel  $\beta$  Langerhans secara autoimun sebagaimana yang terjadi pada DM Tipe 1. Dengan demikian defisiensi fungsi insulin pada penderita DM Tipe 2 hanya bersifat relatif, tidak absolut (Depkes, 2005).

Kadar glukosa yang meningkat diatas normal dapat dijadikan acuan dalam mendiagnosa penyakit diabetes mellitus. Pada hewan coba seperti tikus yang memiliki kadar glukosa normal berkisar antara 50-135 mg/dL (Johnson-delaney dan Harrison, 1996), diagnosa diabetes mellitus dapat ditegakkan berdasarkan salah satu kriteria berikut ini (Anita, 2015; Etuk, 2010):

1. Kadar glukosa darah sewaktu  $> 200$  mg/dL atau kadar glukosa puasa  $> 140$  mg/dL

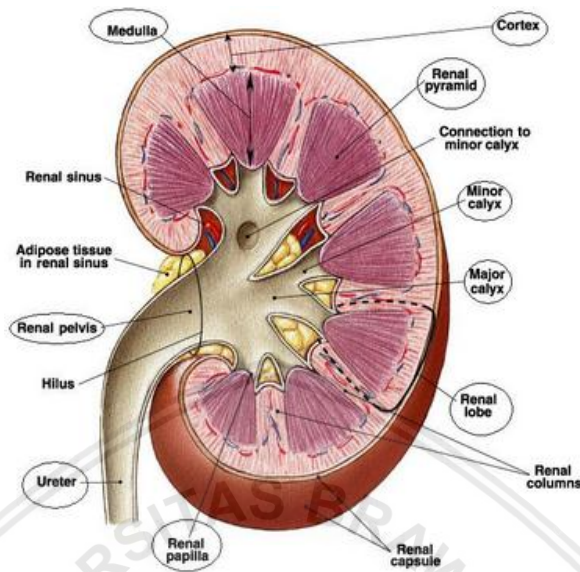


2. Pada Tes Toleransi Glukosa Oral (TTGO), kadar glukosa darah yang terukur 2 jam setelah pemberian beban glukosa adalah  $> 200$  mg/dL
3. Dijumpainya glukosuria

#### 2.4 Ginjal

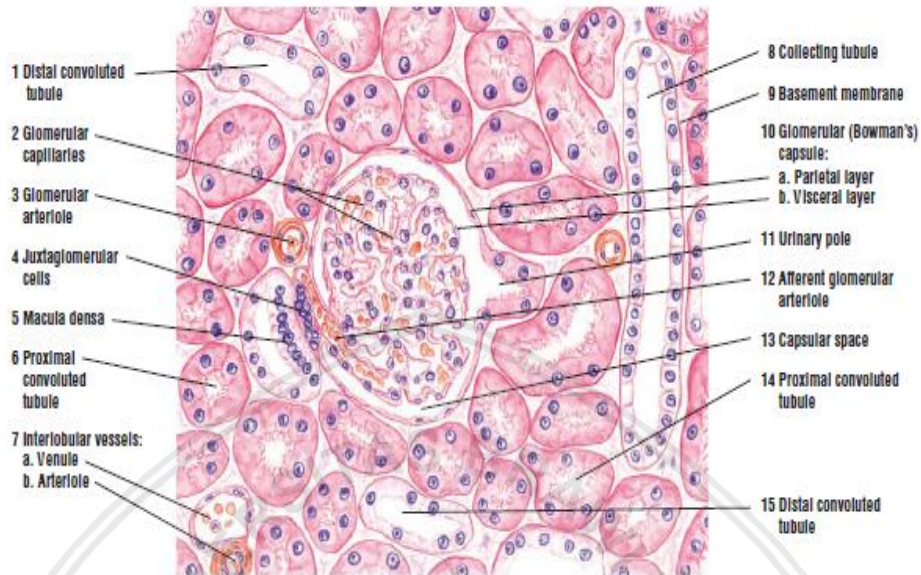
Ginjal merupakan salah satu organ vital tubuh. Fungsi ginjal yaitu mengekskresikan zat sisa metabolisme seperti urea, asam urat kreatinin, mengatur volume plasma darah dan jumlah air di dalam tubuh, menjaga tekanan osmosis dengan cara mengatur ekskresi *Natrium* (Na), mengatur pH plasma dan cairan tubuh dengan mengekskresikan urin. Fungsi ginjal dapat menurun jika terjadi gangguan dari faktor prerenal dan postrenal. Faktor prerenal meliputi obstruksi aliran urin pada saluran urin bawah (Dharmawan, 2002)

Ginjal tikus terletak retroperitoneal pada dinding abdomen masing-masing di sisi kanan dan kiri columna vertebralis setinggi *vertebrae thoracalis* 12 sampai *vertebrae lumbalis* 3. Masing-masing ginjal memiliki *facies anterior* dan *facies posterior*, *margo medialis* dan *margo lateralis*, *ekstremitas superior* dan *inferior*. Kedua ureter mengalirkan urin dari kedua ginjal ke *vesika urinaria*. Bagian *cranial* ureter yang lebar yakni pelvis renalis terjadi karena persatuan dua atau tiga *calices renalis mayors* yang masing-masing menghimpun dua atau tiga *calices renalis minors*. Kedua glandula *suprarenalis* (adrenal) masing-masing terletak pada bagian *craniomedial* ginjal. Ginjal disirkulasi darah oleh arteri renalis, sedangkan glandula *suprarenalis* disirkulasi oleh arteri *suprarenalis* (Coca, 2009). **Gambar 2.3** merupakan gambaran makroskopis ginjal pada tikus.



**Gambar 2.3** Gambaran Makroskopis ginjal tikus (Confer,2003)

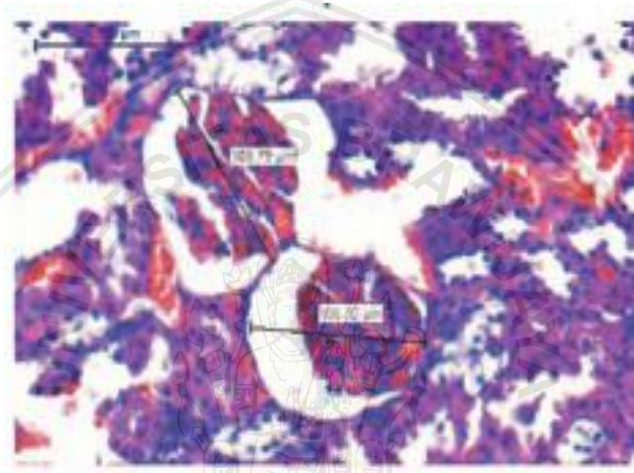
Unit fungsional ginjal terkecil yang mampu menghasilkan urin disebut Nefron. Tiap ginjal bisa tersusun atas 1 juta nefron yang saling disatukan oleh jaringan ikat. Nefron ginjal terbagi 2 jenis, nefron kortikal yang terletak di korteks ginjal mempunyai *loop of henle* sedikit masuk medula dan memiliki kapiler peritubular, dan nefron jukstamedulari yang terletak di persimpangan korteks dan medula mempunyai *loop of henle* panjang ke dalam medulla dan memiliki *Vasa Recta*. *Vasa Recta* adalah susunan kapiler yang panjang mengikuti bentuk tubulus dan lengkung Henle. Secara makroskopis, korteks ginjal akan terlihat berbintik-bintik karena adanya glomerulus, sementara medula akan terlihat bergaris-garis karena adanya *lop of henle* dan tubulus kolektivus. Glomerulus yang terdiri dari sel-sel podosit. Glomerulus berfungsi mengalirkan limbah nitrogen dari hasil metabolisme protein seperti *Blood Urea Nitrogen* (BUN) dan aliran darah untuk dikeluarkan dalam bentuk urin. (**Gambar 2.4**) (Wells, 1997).



**Gambar 2.4** Mikroskopis nefron ginjal normal pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) perbesaran 400X (Eroschenko, 2007).

Secara mikroskopis ginjal terdapat beberapa bagian untuk membentuk satuan unit fungsional yang disebut nefron. Terdiri atas : a. *Renal Corpuscle*, b. *Renal Tubule* dan c. *Renal Blood Supply*. *Renal Corpuscle* terdiri atas sekumpulan kapiler dengan sel epitel yang disebut glomerulus yang dikelilingi Kapsula bowman dimana mempunyai lapisan dalam disebut *visceral layer* dan lapisan luar disebut *parietal layer*. Kapsul bowman terdiri atas sel epitel pipih selapis. Kapiler glomerulus terdiri atas sel endotelial (*simple squamus*), lamina basalis, *podocyte cells* dan *mesangial cells*. *Renal corpuscle* adalah segmen awal setiap nefron. Filtrasi darah di ginjal melalui glomerulus dan hasil filtrasi memasuki *urinary Poe* kemudian berlanjut di tubulus ginjal. Filtrasi darah di glomerulus difasilitasi oleh sel-sel endotelial yang berpori dan sangat permeabel terhadap banyak zat dalam darah kecuali elemen-elemen besar seperti protein plasma (Eroschenko, 2007).

Pada kondisi Diabetes mellitus, perubahan pertama yang terlihat pada ginjal adalah pembesaran ukuran ginjal dan hiperfiltrasi pada glomerulus. Glukosa yang difiltrasi akan direabsorpsi oleh tubulus ginjal dan sekaligus membawa natrium bersamaan dengan efek insulin yang merangsang reabsorpsi tubulus natrium sehingga menyebabkan volume ekstra sel meningkat dan terjadilah hiperfiltrasi pada glomerulus (Fahrianti *et al.*, 2015).



**Gambar 2.5** Mikroskopis glomerulus ginjal -kondisi diabetes mellitus pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) mengalami hipertrofi glomerulus. Perbesaran 200X (Susilorini, 2013).

## 2.5 *Blood Urea Nitrogen* (BUN)

*Blood Urea Nitrogen* (BUN) adalah hasil katabolisme protein yang dihasilkan oleh tubuh. Pengukuran BUN merupakan estimasi akurat seberapa baik filtrasi ginjal bekerja dan digunakan sebagai indikator untuk mengetahui terjadinya gangguan pada ginjal. Gangguan pada ginjal ditunjukkan dengan peningkatan kadar BUN dalam darah. Peningkatan kadar BUN terjadi karena urea yang seharusnya dikeluarkan melalui urin, masuk lagi ke dalam peredaran darah (Alunat dkk., 2014).

Menurut Schrier (2008), BUN secara bebas disaring, tidak disekresikan, tetapi diserap kembali oleh tubulus ginjal. Reabsorpsi urea tergantung aliran urin sehingga urea lebih banyak diserap pada tingkat aliran urin yang lebih rendah. Kadar BUN diperiksa melalui serum yang diukur dengan metode spektrofotometri dengan alat spektrofotometer. Pengukuran berdasarkan reaksi enzimatik dengan diasetil monoksim yang memanfaatkan enzim urease yang sangat spesifik terhadap urea. Standar normal kadar BUN pada tikus 15-21 mg/dL (Laksmi *et al.*, 2014).

Fungsi ginjal sebagai filtrasi dapat berkurang atau rusak disebabkan karena adanya gangguan pada ginjal dan aliran urin, sehingga terdapat urea, kreatinin dan produk-produk nitrogen lainnya sisa dari metabolisme protein yang tertahan didalam serum darah sehingga menyebabkan perubahan umum didalam tubuh antara lain : penurunan pH darah (metabolisme asidosis), perubahan ion plasma, azotemia atau uremia dan hipertensi. Perubahan-perubahan yang terjadi akibat konsentrasi ureum yang tinggi dalam darah antara lain adalah peningkatan permeabilitas vaskular, akibat kerusakan endotel dan jaringan sub endotel pada arteri dan endokardium. Lesio arteri ini dikenal dengan *mucoarteritis* terlihat sebagai penebalan fokal dari dinding pembuluh darah. Kerusakan komponen dinding pembuluh darah dapat menimbulkan bentukan trombosis. Peningkatan permeabilitas vaskular menyebabkan timbulnya edema. Peningkatan permeabilitas vaskular akibat uremia biasanya menimbulkan endapan fibrin. Akumulasi dan endapan fibrin pada kantung perikardium dapat menimbulkan perikarditis fibrinosa (Pasaribu, 2001).



## 2.6 Bahan Induksi

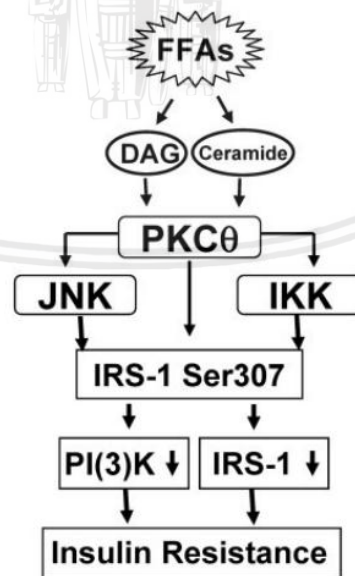
### 2.6.1 Pakan Tinggi Lemak

Komposisi nutrisi pada pakan yang diberikan pada hewan coba sering digunakan sebagai pemicu penyakit metabolik dalam penelitian yang berhubungan dengan penyakit gangguan metabolik seperti obesitas dan diabetes, yang juga berhubungan dengan kejadian penyakit kardiovaskular (Ble-Castillo *et al.*, 2012). Berbagai macam gangguan metabolik lainnya yang dapat ditimbulkan oleh pakan tinggi lemak antara lain *polyphagia*, berkurangnya aktivitas lipolisis pada jaringan adiposa, penurunan sekresi dan atau sensitivitas leptin, gangguan metabolisme pada mitokondria dan resistensi insulin (Coelho *et al.*, 2011).

Pakan tinggi lemak mengandung kalori yang berasal dari 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). Lama pemberian pakan tinggi lemak untuk membuat tikus model DM tipe 2 dapat disesuaikan dengan tujuan penelitian. Pemberian pakan tinggi lemak selama 2 minggu dapat memunculkan resistensi insulin pada tikus yang merupakan gejala patofisiologis awal pada DM tipe 2 (Skovso, 2014).

Pakan tinggi lemak dapat menimbulkan keadaan resistensi insulin melalui peningkatan kadar asam lemak bebas atau *Free Fatty Acid* (FFA) yang berakibat pada terjadinya fosforilasi terhadap Serine 307 pada *Insulin Receptor Substrate* (IRS). IRS merupakan molekul protein yang berperan dalam proses sinyal

intraselular terhadap respon insulin (Regensteiner *et al.*, 2009). FFA mengaktifkan isoenzim dari Protein Kinase C (PKC) seperti PKC  $\theta$  melalui peningkatan pembentukan *Diacylglycerol* (DAG) dan Ceramide, dan kemudian aktivasi dari PKC  $\theta$  memicu aktivasi dari *Inhibitor  $\kappa$ B Kinase* (IKK) dan *c-JUN NH<sub>2</sub>-Terminal Kinase* (JNK). Selanjutnya, aktivasi dari IKK dan JNK akan menimbulkan fosforilasi Serine 307 (Ser307) pada protein IRS yang menyebabkan terjadinya degradasi protein IRS dan penurunan sensitivitas pada reseptor insulin (**Gambar 2.6**). Penurunan aktivitas IRS berhubungan dengan penurunan aktivitas *Phosphatidylinositol-3 Kinase* (PI-3K) dalam 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; Ragheb dan Medhat, 2011).



**Gambar 2.6** Mekanisme resistensi insulin yang ditimbulkan oleh FFA

(Gao *et al.*, 2004).



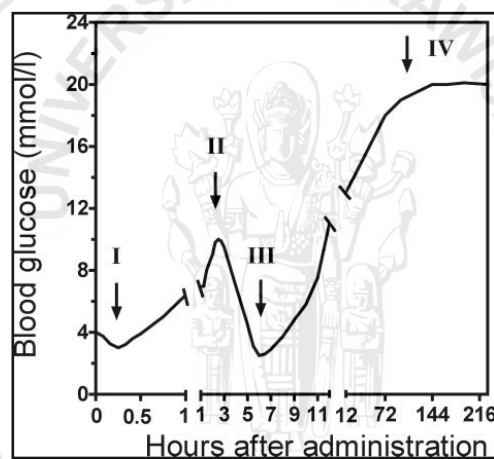
### 2.6.2 Streptozotocin (STZ)

Streptozotocin (STZ) atau *2-Deoxy-2-[[[(methylnitrosoamino)-carbonyl] amino]-D-glucopyranose* adalah salah satu agen diabetogenik dengan kemampuan toksiknya yang dapat mendestruksi sel  $\beta$  pankreas. Secara struktur, STZ adalah derivat *N-nitrosurea* dari *D-glukosamin* yang diisolasi dari *Streptomyces achromogenes* (Raza, 2013). STZ ini dapat disebut juga sebagai salah satu agen anti-neoplastik sintetik yang digunakan untuk obat kemoterapi pada kanker, khususnya kanker pulau Langerhans pankreas (Akbarzadeh, 2007).

Streptozotocin sering digunakan untuk menginduksi DM tipe 1 maupun DM tipe 2. STZ dapat digunakan dengan atau tanpa kombinasi senyawa lain dalam menginduksi DM tipe 1 atau DM tipe 2. DM tipe 1 dapat diinduksi sebanyak 1 kali injeksi pada rodentia dengan dosis tinggi (50-100 mg/kg pada tikus dan 130-150 mg/kg pada mencit) atau dengan dosis yang lebih rendah secara berulang (Islas-Andrade *et al.*, 2000; Ventura *et al.*, 2011). Sedangkan DM tipe 2 dapat diinduksi dengan banyak macam cara antara lain injeksi STZ setelah pemberian nicotinamide, pemberian pakan tinggi lemak yang diikuti pemberian injeksi STZ dosis rendah (25-45 mg/kg pada tikus) dan injeksi STZ saat periode neonatus (Wu dan Yan, 2015; Zhang *et al.*, 2008).

Streptozotocin masuk ke dalam sel  $\beta$  pankreas melalui GLUT 2 dan STZ masuk ke sitosol menuju mitokondria. Di dalam mitokondria, STZ menghambat siklus krebs. Gangguan pada siklus krebs menyebabkan penurunan produksi ATP

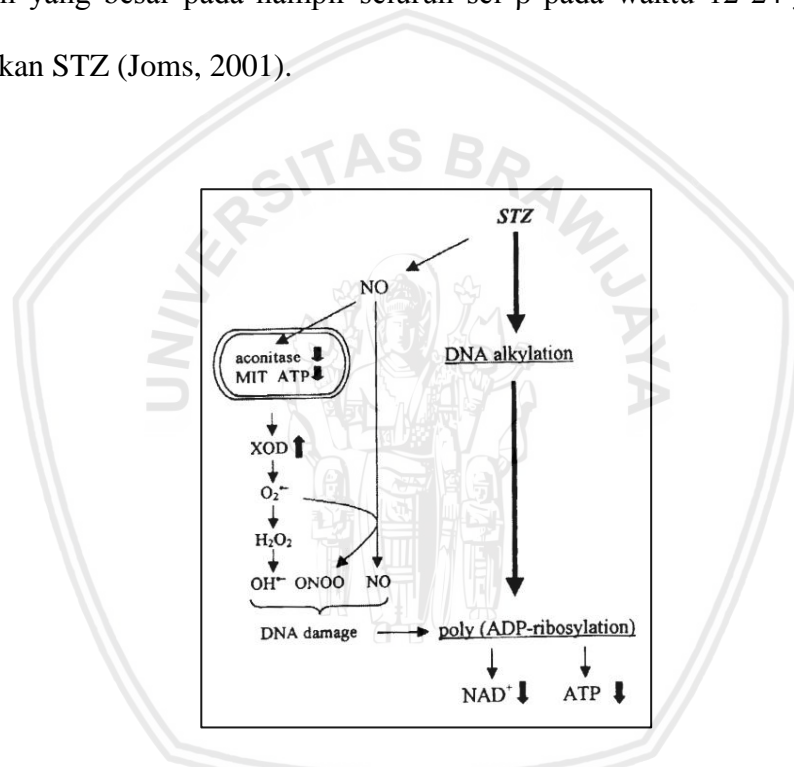
(Mythilli, 2004). Penurunan ATP pada sel  $\beta$  pankreas mempengaruhi sintesis insulin. Selain itu, STZ menginduksi pelepasan nitrit oksida (NO) dan *reactive oxygen species* (ROS). NO dan ROS dapat menyebabkan kematian sel dengan merusak struktur DNA sel  $\beta$  Pankreas (Gardner, 2007). STZ juga berperan dalam alkilasi sel  $\beta$ . Alkilasi meningkatkan stres oksidatif di sel  $\beta$  dan mengganggu sinyal untuk metabolisme mitokondria sel  $\beta$  (Szkudelski, 2001). Apabila proses ini berlangsung terus menerus, maka dapat menyebabkan nekrosis pada sel  $\beta$  pankreas.



**Gambar 2.7.** Fase reaksi glukosa darah setelah induksi STZ (fase II-IV) (Szkudelski, 2001)

Terdapat 3 fase setelah penyuntikan STZ intraperitoneal pada hewan coba sampai dengan terjadinya hiperglikemi. Fase pertama dimulai dengan terjadinya peningkatan glukosa darah 1 jam setelah penyuntikan. Fase ini menunjukkan penurunan konsentrasi insulin pada pembuluh darah (Mythilli, 2004). Fase ini berlangsung selama 2 sampai 4 jam. Fase kedua terjadi hipoglikemi yang berlangsung 4 sampai dengan 8 jam setelah penyuntikan. Pemberian konsentrat glukosa diperlukan untuk mencegah terjadinya kematian akibat hipoglikemi.

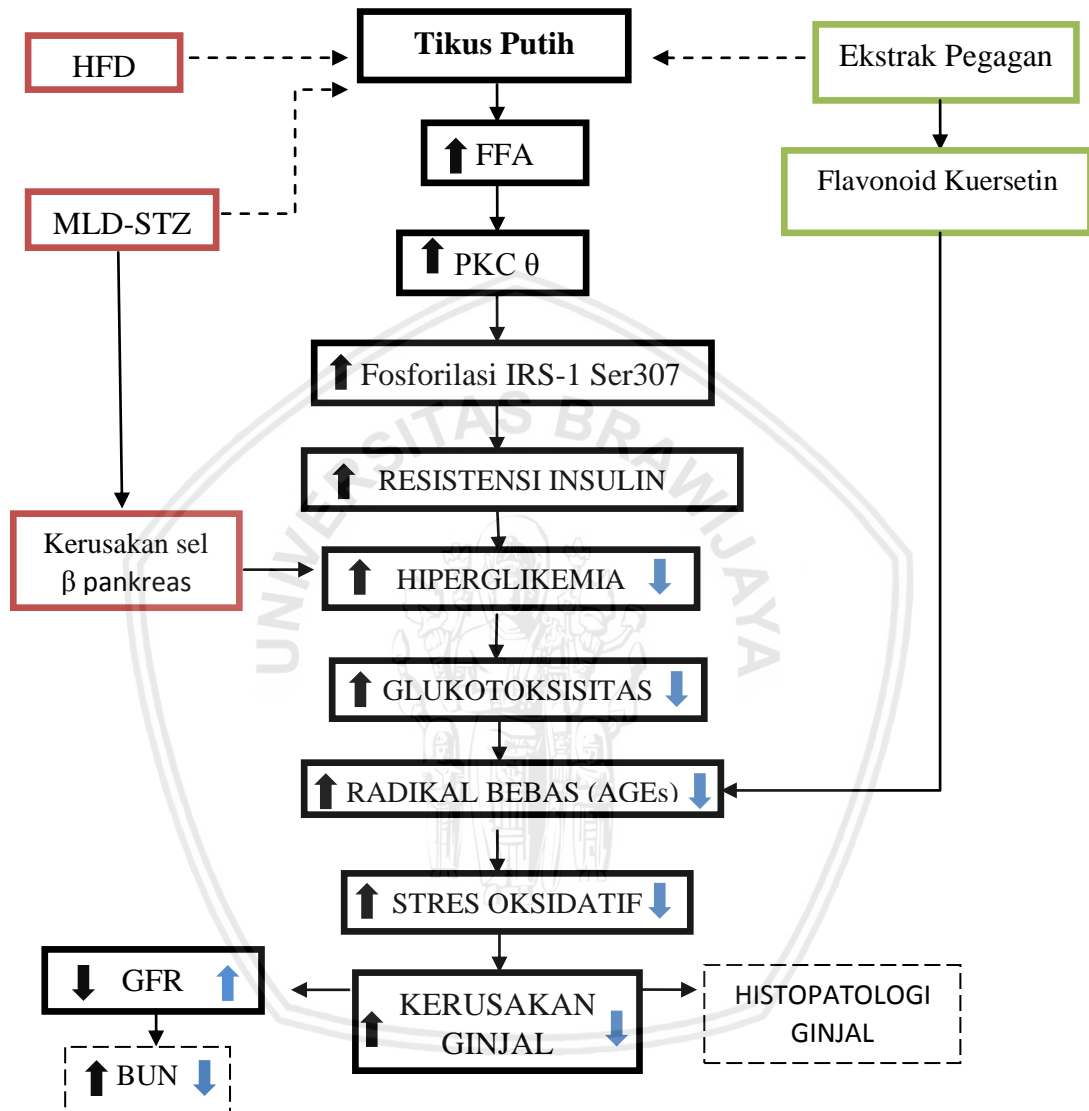
Hipoglikemi terjadi karena pecahnya sel  $\beta$  yang mengandung insulin. Pecahnya sel dipicu oleh toksisitas STZ (Szkudelski, 2001). Insulin akan beredar ke pembuluh darah dan berikatan dengan reseptor di sel adiposa dan otot, menyebabkan penurunan glukosa darah dengan cepat. Pada fase keempat terjadi hiperglikemi yang permanen. Pada pemeriksaan secara morfologi ditemukan kerusakan yang besar pada hampir seluruh sel  $\beta$  pada waktu 12-24 jam setelah penyuntikan STZ (Joms, 2001).



**Gambar 2.8** Mekanisme STZ dalam kerusakan DNA sel  $\beta$  pankreas (Szkudelski, 2001).

**BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

**3.1. Kerangka Konsep**



**Gambar 3.1.** Mekanisme kerja induksi dan terapi DMT2 pada tikus

Keterangan:

- ↑ : efek induksi (HFD dan STZ)
- ↓ : efek terapi *centella asiatica*
- ⬜ : parameter yang diamati
- ⬜ (green) : Terapi DM Tipe 2
- ⬜ (red) : Induksi DM Tipe 2
- - - - : Induksi pada tikus

Pemberian pakan tinggi lemak dalam jangka panjang akan memicu terjadinya resistensi insulin. Meningkatnya kadar asam lemak bebas (*Free Fatty Acid* = FFA) akan menurunkan sensitivitas kerja reseptor insulin yang terdapat dalam jaringan akibat fosforilasi Serine 307 pada IRS (*Insulin Reseptor Substrate*). Akibatnya, akan terjadi penurunan aktivitas PI3-K yang seharusnya teraktivasi oleh IRS dalam merangsang translokasi GLUT menuju permukaan sel untuk melakukan pengambilan glukosa. Jika hal tersebut terjadi secara terus menerus maka akan terjadi resistensi insulin sehingga glukosa dalam darah tidak dapat ditransport ke dalam jaringan. Kemudian STZ diberikan untuk mempercepat proses terjadinya diabetes mellitus tipe 2. STZ merupakan senyawa yang bersifat toksik terhadap sel  $\beta$  pankreas sehingga akan menurunkan produksi insulin. Selain menurunkan produksi insulin, STZ juga menyebabkan terjadinya resistensi reseptor insulin karena meningkatkan ROS sehingga mengaktivasi kasein kinase 2 menjadi retromer, kemudian retromer akan mentransfer GLUT-4 ke lisosom, sehingga GLUT-4 akan terdegradasi dan menyebabkan resistensi insulin (Hurrell and Hsu, 2017). Terjadinya resistensi insulin dan menurunnya produksi insulin merupakan kondisi awal dari DM Tipe 2.

Resistensi insulin adalah kondisi ketidakmampuan insulin untuk menstimulasi ambilan glukosa ke jaringan dan menghambat pengeluaran glukosa dari hati sehingga akan menyebabkan terjadinya hiperglikemia. Tingginya kadar gula akibat resistensi insulin dan penurunan produksi insulin akan menimbulkan glukotoksisitas dan mempengaruhi fungsi sebagian besar organ dan jaringan dalam tubuh. Meningkatnya konsentrasi glukosa dalam jangka panjang juga dapat

memicu proses glikasi lipid dan protein yang mengakibatkan peningkatan AGE's (*Advanced Glycation End-products*).

Interaksi antara AGE's dalam sirkulasi dengan RAGE's (*Receptor for Advanced Glycation End-products*) akan meningkatkan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) intraseluler. Peningkatan ROS pada kondisi hiperglikemia dapat memicu terjadinya ikatan ROS dengan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) pada *fosfolipid bilayer* sehingga terjadi peroksidasi lipid dan merusak struktur membran sel pada ginjal (Kamble *et al*, 2015). Produksi radikal bebas (AGE's) juga dapat merusak sel karena dapat mengganggu protein intrasel dan ekstrasel, salah satunya yaitu agen dapat merusak membran basalis dan mesangium sehingga terjadi hiperfiltrasi pada glomerulus. Hiperfiltrasi glomerulus ini akan menyebabkan filtrasi terhadap protein meningkat, sehingga akan terjadi akumulasi protein pada sel epitel dan menyebabkan pelepasan sitokin inflamasi seperti endotelin-1, osteoponin dan monosit *chemoattractant* protein-1 (MCP-1) yang menyebabkan kerusakan sel tubulus dan glomerulus sehingga terjadi *renal injury*. Adanya kerusakan saluran urin terutama ginjal akan berakibat pada penurunan *Glomerulo Filtrate Rate* (GFR) sehingga kemampuan ekskresi ureum menurun yang menyebabkan kadar BUN dalam darah akan tinggi.

Pemberian ekstrak etanol pegagan yang memiliki kandungan senyawa aktif seperti flavonoid dapat berfungsi sebagai *scavenger* radikal bebas sehingga flavonoid secara bertahap mampu mereduksi radikal bebas dan mengurangi kondisi stres oksidatif. Penurunan kondisi stress oksidatif mampu membantu proses proliferasi dan perbaikan sel seperti sel pada glomerulus ginjal sehingga

filtrasi pada ginjal dapat berlangsung normal kembali yang dapat ditunjukkan dengan penurunan kadar BUN. Triterpenoid glikosida terutama asiatikosida, asam asiatik, dan madekasosida dalam ekstrak pegagan juga dapat mengendalikan kondisi hiperkolesterolemia dan hipertrigliseridmia sebagai komplikasi dari diabetes mellitus. Herba pegagan juga dapat meningkatkan *uptake glucose* dengan meningkatkan respon reseptor insulin sehingga dapat digunakan sebagai obat antidiabetes mellitus tipe 2.

### 3.2. Hipotesis Penelitian

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

1. Terapi ekstrak etanol daun pegagan (*C. asiatica*) mampu menurunkan kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN) pada tikus *R. norvegicus* model DM Tipe 2 hasil induksi STZ dan HFD.
2. Terapi ekstrak etanol daun pegagan (*C. asiatica*) mampu memberikan pengaruh perbaikan pada gambaran histopatologi ginjal pada tikus *R. norvegicus* model DM Tipe 2 hasil induksi STZ dan HFD.



## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April hingga bulan Juni 2018. Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Islam Negeri, pengujian kadar BUN serum di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan pembuatan preparat histopatologi di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

### 4.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain kandang individu tikus (*individually ventilated cages*), alat penggilingan pakan, timbangan digital, neraca analitik digital, baskom, spatula, *refrigerator*, tabung Falcon 15 mL, *microtube*, *pipette tip*, *micropipette*, *multichannel pipette*, *vortex*, *centrifuge*, spuit Tuberculin 1 cc, sonde lambung tikus, *glucose test kit*, *microhematocrit*, mortar, spektrofotometer, tabung reaksi, mikrotom, mikroskop cahaya, kamera Optilab *Advance Plus* dan oven.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih, pakan standar, pakan tinggi lemak, Streptozotocin (STZ), aquades, asam sitrat 0.2 M, natrium sitrat 0.2 M, Pewarna HE, reagen 1 (*Trishydroxymethylaminomethane* (TRIS), *Adenosinediphosphate* (ADP), *Urease*, *Glutamate dehydrogenase* (GLDH)) dan reagen 2 (*Nicotinamide Adenin Dinucleotide* (NADH)), tabung

venoject non-EDTA, daun pegagan (*Centella asiatica*), parafin, *object glass* dan *cover glass*, xylol, alkohol asam 1% dan alkohol (70%, 80%, 90%, 95% dan alkohol absolut).

#### 4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), yaitu membagi subjek menjadi tujuh kelompok secara acak. Setiap kelompok terdiri dari empat tikus. Kelompok K(-) adalah tikus sehat sebagai kontrol negatif, kelompok K(+) adalah tikus yang dibuat sakit DM Tipe 2 tanpa terapi (kontrol positif), kelompok P1, P2, P3, P4, P5 (kelompok terapi) adalah kelompok tikus yang dibuat sakit DM Tipe 2 dan diterapi dengan ekstrak etanol daun pegagan dengan dosis masing-masing 75, 150, 300, 600, dan 1200 mg/kg.

#### 4.4 Sampel Penelitian

Hewan model yang digunakan adalah tikus (*R. norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 2-3 bulan dengan bobot badan tikus antara 150-200 gram. Hewan coba dilakukan aklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Adapun perkiraan banyak sampel dapat dihitung menggunakan rumus (Kusriningrum, 2008):

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

$$7(n-1) \geq 15$$

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3.14 \text{ dibulatkan menjadi } 4.$$

Keterangan :

t : Jumlah kelompok perlakuan

n : Jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 7 kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok perlakuan.

#### **4.5 Variabel Penelitian**

Adapun variabel dalam penelitian ini yaitu :

Variabel bebas : Pemberian pakan tinggi lemak (HFD), dosis STZ, dosis ekstrak etanol daun pegagan

Variabel tergantung : Kadar BUN serum dan histopatologi Ginjal

Variabel kontrol : Hewan coba tikus strain Wistar jantan, berat badan, umur, pakan, minum, lingkungan dan suhu kandang

#### **4.6 Tahapan Penelitian**

##### **4.6.1 Persiapan Hewan Coba**

Tikus diaklimatisasi terlebih dahulu terhadap lingkungan selama tujuh hari untuk beradaptasi dengan keadaan kandang dan perubahan waktu makan. Selama aklimatisasi, semua tikus akan diberikan pakan berupa pakan standar dengan komposisi 5% lemak, 53% karbohidrat, dan 23% protein. Air minum untuk tikus diberikan secara *ad libitum*. Tikus dibagi menjadi 7 kelompok yang masing-masing terdiri dari 4 ekor tikus per kelompok.

##### **4.6.2 Prosedur Pembuatan Hewan Model DMT2**

Tikus model DM tipe 2 dibuat dengan pemberian pakan tinggi lemak (*High Fat-Diet* = HFD) untuk menginduksi obesitas, resistensi insulin serta terganggunya homeostasis glukosa dan injeksi STZ diberikan untuk menurunkan fungsi sel  $\beta$  pankreas sehingga mengganggu produksi insulin dan menimbulkan

hiperglikemia. Beberapa kejadian tersebut merepresentasikan kejadian patofisiologis pada DM Tipe 2 sehingga kombinasi HFD-STZ sering digunakan untuk membuat tikus model DMT2 (Eleazu *et al.*, 2013; King, 2012).

Pakan tinggi lemak tersusun dari 17% protein, 25% karbohidrat, dan 58% lemak. Pemberian pakan tinggi lemak pada tikus dilakukan selama 4 minggu sebanyak 40 g/hari/ekor untuk menyasati kekurangan pakan akibat perbedaan asupan per individu dan gejala *polyphagia* akibat hiperglikemia (Holmes *et al.*, 2015; Nugroho *et al.*, 2015). Streptozotocin (dosis 30 mg/kg BB dalam buffer sitrat 0.1 M pH 4.5) diinjeksikan secara *intraperitoneal* setiap minggu selama 2 minggu dan tetap diberikan pakan tinggi lemak.

Pengukuran kadar glukosa pada tikus dilakukan sebelum dilakukan induksi streptozotocin sehingga diketahui kadar glukosa sebelum hewan coba terkena diabetes mellitus. Pengukuran kadar glukosa dilakukan setelah injeksi streptozotocin, tikus mengalami diabetes mellitus, apabila kadar glukosa tikus mencapai 200 mg/dl. Setelah dilakukan pemberian ekstrak etanol daun pegagan selama 7 hari juga dilakukan pemeriksaan kadar glukosa darah setiap hari yang bertujuan untuk mengetahui penurunan kadar glukosa darah tikus setelah diberikan terapi. Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan alat digital yaitu glukometer dengan cara mengambil darah melalui ujung ekor tikus dengan menggunakan *blood lancet* darah yang keluar lalu diteteskan pada ujung *blood strip* dan di tunggu hasil yang muncul pada layar alat glukometer digital.

#### 4.6.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Pegagan

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

##### 1. Proses Ekstraksi

Satu kilogram 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 (simplicia). 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 labu Erlenmeyer ukuran 1 L, kemudian ditambahkan dengan ethanol 96% sampai volume 900 mL dan dikocok sampai benar-benar tercampur ( $\pm$  30 menit). Terakhir campuran didiamkan 1 malam sampai mengendap.

##### 2. Proses Evaporasi

Lapisan atas campuran ethanol 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 90°C) dan disambungkan dengan aliran listrik. Lalu larutan ethanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu dan ditunggu sampai aliran ethanol berhenti menetes pada labu penampung ( $\pm$  1,5 sampai 2 jam). Kemudian hasil ekstraksi dimasukkan dalam botol dan disimpan

pada *refrigerator*. Dan dari hasil ekstraksi ini diperoleh ekstrak sebanyak 10 gram dalam bentuk pasta yang terbagi dalam 3 pot sampel.

#### **4.6.4 Pengambilan Organ Ginjal Tikus**

Pengambilan organ ginjal yaitu dilakukan pembedahan hari ke 43 dan Pembedahan dimulai dengan euthanasia hewan melalui dislokasi leher. Selanjutnya dilakukan pembedahan pada bagian abdominalis untuk isolasi organ ginjal. Organ ginjal selanjutnya disimpan pada larutan *paraformaldehyde* (PFA) 10%.

#### **4.6.5 Pembuatan Preparat Histopatologi**

Pembuatan preparat histopatologi dengan menggunakan metode parafin yaitu pertama kali organ difiksasi menggunakan PFA 10% dimasukkan kedalam wadah tabung plastik kecil (pot). Tujuan dilakukan fiksasi untuk mempertahankan struktur jaringan (sel) dan menghentikan proses metabolisme dan enzimatis agar tidak terjadi proses autolisis. Kemudian dilakukan dehidrasi alkohol bertingkat dari konsentrasi 50% selama 24 jam, etanol 70 % selama 2 jam, etanol 80% , 95% dan etanol absolut selama 20 menit. Tujuan dilakukan dehidrasi untuk penarikan molekul air dalam jaringan (sel). Kemudian dilakukan *clearing* (penjernihan) dengan cara merendam jaringan dalam larutan xylol I selama 20 menit dan xylol II selama 30 menit dengan tujuan untuk membuat jaringan menjadi jernih dan transparan. Kemudian infiltrasi dan embeeding dengan menggunakan parafin cair pada inkubator bersuhu 58-60°C. Lalu dilakukan *section / trimming* dengan cara cetakan dijepit dalam mikrotom dan jaringan dipotong (sayatan tipis) dengan ketebalan 4-5  $\mu\text{m}$ . Potongan tersebut diletakkan secara hati-hati di atas permukaan

air dalam waterbath bersuhu 46°C . Bentuk irisan dirapikan, kemudian diletakkan di atas kaca obyek yang telah diolesi entellan, yang berfungsi sebagai bahan perekat. Kaca obyek dengan jaringan di atasnya disusun di dalam rak khusus disimpan dalam inkubator suhu 38-40°C 24 jam dan kemudian dilakukan pewarnaan HE (*Hematoxylin Eosin*).

Setelah preparat jadi masih terkandung sifat lilin oleh xylol, sedangkan pewarnaan HE (*Hematoxylin Eosin*) bersifat air (memerlukan pengencer air) maka perlu dilakukan deparafinasi preparat dalam larutan xylol I dan xylol II. Kemudian dilakukan rehidrasi dengan alkohol bertingkat dari alkohol absolut sampai alkohol 50%. Preparat siap diwarnai dengan ditetesi hematoxylin (3 menit atau sampai didapatkan hasil warna terbaik). Selanjutnya dicuci dengan air mengalir selama 30 menit, lalu dibilas dengan akuades selama 5 menit. Setelah itu, preparat dimasukkan ke dalam pewarna Eosin alkohol selama 30 menit lalu dibilas akuades selama 5 menit. Selanjutnya memasuki tahap dehidrasi, preprat dimasukkan ke dalam alkohol bertingkat 50, 70, 80, 95% dan alkohol absolut (2 kali) masing-masing 5 menit. Kemudian tahap clearing dilakukan dalam larutan xylol (2x5 menit) dan dikeringkan. Tahap terakhir adalah tahap mounting dengan entellan.

#### **4.6.6 Pengukuran Kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN)**

Sampel darah dikoleksi dari jantung tikus, dimasukkan kedalam *whole blood tube* 3 cc (*plain tube*). Setelah itu disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Serum diambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 100 µl dan dimasukkan ke dalam mikrotube.



Selanjutnya dilakukan pengamatan dan pengukuran kadar Blood Urea Nitrogen (BUN). Disiapkan sampel serum tikus, larutan urea standar, larutan reagen 1 : *Trishydroxymethylaminomethane* (TRIS) pH 7.8, *Adenosinediphosphate* (ADP), *Urease*, *Glutamate dehydrogenase* (GLDH) dan reagen 2 (*Nicotinamide Adenin Dinucleotide* (NADH)).

Dimasukkan larutan reagen 1 sebanyak 100  $\mu$ l, larutan standar urea/kreatinin sebanyak 10  $\mu$ l, reagen 1 sebanyak 1000  $\mu$ l, larutan sampel serum tikus sebanyak 10  $\mu$ l, dengan mikropipet ke dalam kuvet. Setelah itu, diinkubasi selama 5 menit, kemudian ditambahkan reagen 2 sebanyak 250  $\mu$ l. setelah itu, diinkubasikan kembali selama 1 menit. Kemudian diukur kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN) dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm selama 10 menit (Vetlearn, 2011).

#### **4.6.7 Pengamatan Preparat Histopatologi Ginjal**

Preparat diamati pada bagian glomerulus ginjal menggunakan mikroskop cahaya *Olympus* BX51<sup>®</sup> perbesaran 400x, kemudian gambar diambil menggunakan kamera mikroskop *Olympus* DP20<sup>®</sup>.

#### **4.7 Analisis Data**

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan analisis kuantitatif statistik dan kualitatif deskriptif. Analisis kuantitatif statistik untuk kadar BUN dengan menggunakan program SPSS 22.0 dengan uji analisis ragam *One-Way ANOVA* untuk melihat efektifitas bermakna pada setiap kelompok uji yang terdiri dari kontrol negatif, kontrol positif dan perlakuan terapi dengan masing-masing dosis ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica*), kemudian

dilanjutkan dengan uji Tukey  $\alpha = 5\%$  untuk mengetahui perbedaan rata-rata tiap perlakuan. Analisis kualitatif deskriptif untuk pengamatan histopatologi ginjal menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x.



## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*C.asiatica*) terhadap Kadar Glukosa Pada Tikus Model DM Tipe 2

Diabetes Mellitus Tipe 2 merupakan penyakit hiperglikemia akibat insensitivitas sel terhadap insulin atau dapat disebut dengan resistensi insulin. Kadar insulin pada DM Tipe 2 mungkin sedikit menurun atau berada dalam rentang normal karena insulin masih diproduksi oleh sel  $\beta$  pankreas (Fatimah, 2015). Kondisi resistensi insulin dipicu dengan pemberian pakan tinggi lemak (HFD) yang diberikan dalam jangka panjang dan STZ diberikan untuk mempercepat proses terjadinya DM Tipe 2. STZ merupakan senyawa yang bersifat toksik terhadap sel  $\beta$  pankreas sehingga akan menurunkan produksi insulin dan menimbulkan hiperglikemia atau peningkatan kadar glukosa dalam darah yang akan menjadi tanda kondisi awal DM Tipe 2. Kadar glukosa darah pada tikus berkisar antara 50-135 mg/dl dan tikus dikatakan mengalami diabetes apabila kadar glukosa darah  $>200$  mg/dl, dalam rentang antara 136-200 mg/dl dikatakan tikus mengalami kondisi hiperglikemia (Carvalho *et al.*, 2003).

Perhitungan kadar glukosa darah pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui adanya kondisi hiperglikemia yang menjadi penanda terjadinya DM. Pada **Tabel 5.1** menunjukkan terjadinya peningkatan kadar glukosa darah hasil induksi *Multiple Low Dose-Streptozotocin* (MLD-STZ) dan penurunan kadar glukosa darah setelah diberikan terapi ekstrak etanol daun pegagan (*C.asiatica*). Pengukuran kadar glukosa darah menggunakan *glucometer digital (one touch lifescan)*. Kit ini merupakan biosensor glukosa yang menggunakan suatu enzim yaitu glukosa oksidase untuk mendeteksi jumlah glukosa di dalam darah. Reaksi

ini berlangsung melalui glukosa dan akan dioksidasi oleh glukosa oksidase dengan keberadaan oksigen menghasilkan glukonolakton dan  $H_2O_2$ . Jumlah  $H_2O_2$  yang dihasilkan pada reaksi ini sebanding dengan konsentrasi glukosa dalam darah (DeFronzo, 1997).

**Tabel 5.1** Kadar Glukosa Darah Tikus Kelompok Perlakuan

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Kadar Glukosa Darah $\pm$ SD	Peningkatan terhadap kelompok kontrol Negatif (%)	Penurunan terhadap kelompok kontrol positif (%)
Kontrol Negatif (-)	95.75 $\pm$ 58.914 <sup>a</sup>	-	-
Kontrol Positif (+)	338.75 $\pm$ 94.047 <sup>b</sup>	71.73	-
P1 ( Dosis terapi 75 mg/kg)	162 $\pm$ 15.011 <sup>a</sup>	-	52.18
P2 (Dosis terapi 150 mg/kg)	159.5 $\pm$ 16.603 <sup>a</sup>	-	52.92
P3 (Dosis terapi 300 mg/kg)	182 $\pm$ 11.944 <sup>a</sup>	-	46.27
P4 (Dosis terapi 600 mg/kg)	186.5 $\pm$ 12.396 <sup>a</sup>	-	44.94
P5 (Dois terapi 1200 mg/kg)	190.25 $\pm$ 16.090 <sup>a</sup>	-	43.84

**Keterangan :** notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan ( $p < 0.05$ ) ; SD : standar Deviasi

Berdasarkan hasil lanjutan uji *tukey* didapatkan bahwa pada kelompok kontrol negatif memiliki rata-rata kadar glukosa sebesar 95.75  $\pm$  58.914 mg/dL dan secara statistik berbeda signifikan ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok kontrol positif. Kontrol negatif merupakan hasil dari proses metabolisme secara normal sehingga termasuk dalam rentang kadar glukosa darah tikus normal yaitu sebesar 50-135 mg/dL (Carvalho *et al.*, 2003). Kadar glukosa darah kelompok positif hasil induksi HFD dan MLD-STZ dosis 30 mg/kg BB lebih tinggi dari kontrol negatif dan secara statistik berbeda signifikan ( $p < 0.05$ ) dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan terapi P1, P2 P3, P4, dan P5. Kadar glukosa Kelompok kontrol positif termasuk dalam rentang kadar glukosa tikus DM yaitu  $\geq 250$

mg/dL (Hussain, 2002). Pemberian HFD diberikan untuk menginduksi obesitas, resistensi insulin serta terganggunya homeostasis glukosa dan injeksi STZ diberikan untuk menurunkan fungsi sel  $\beta$  pankreas sehingga mengganggu produksi insulin dan menimbulkan hiperglikemia yang menjadi kondisi awal diabetes.

Kelompok P1 (terapi 75 mg/kg BB) menunjukkan rata-rata kadar glukosa sebesar  $162 \pm 15.011$  mg/dL dengan penurunan sebesar 52.18% dan secara statistik berbeda signifikan ( $p < 0.05$ ) dengan kelompok kontrol positif, namun tidak berbeda signifikan pada kelompok kontrol negatif, kelompok P2, P3, P4 dan P5 yang dinyatakan dengan perbedaan notasi pada hasil Tukey (**Tabel 5.1**). Kelompok P2 (terapi 150 mg/kg BB) menunjukkan rata-rata kadar glukosa sebesar  $159.5 \pm 16.603$  mg/dL dengan penurunan sebesar 52.92 % dan secara statistik berbeda signifikan ( $p < 0.05$ ) dengan kelompok kontrol positif, namun tidak berbeda signifikan pada kelompok kontrol negatif, kelompok P1, P3, P4 dan P5. Kelompok P3 (terapi 300 mg/kg BB) menunjukkan rata-rata kadar glukosa sebesar  $182 \pm 11.944$  mg/dL dengan penurunan sebesar 46.27 % dan secara statistik berbeda signifikan ( $p < 0.05$ ) dengan kelompok kontrol positif, namun tidak berbeda signifikan pada kelompok kontrol negatif, kelompok P1, P2, P4 dan P5 yang dinyatakan pada hasil uji Tukey (**Tabel 5.1**).

Kelompok P4 (terapi 600 mg/kg BB) menunjukkan rata-rata kadar glukosa  $186.5 \pm 12.396$  mg/dL dengan penurunan sebesar 44.94 % dan secara statistik berbeda signifikan ( $p < 0.05$ ) dengan kelompok kontrol positif, namun tidak berbeda signifikan pada kelompok kontrol negatif, kelompok P1, P2, P3 dan P5

(Tabel 5.1). Kelompok P5 (terapi 1200 mg/kg BB) menunjukkan rata-rata kadar glukosa  $190.25 \pm 16.090$  mg/dL dengan penurunan sebesar 43.84 % dan secara statistik berbeda signifikan ( $p < 0.05$ ) dengan kelompok kontrol positif, namun tidak berbeda signifikan pada kelompok kontrol negatif, kelompok P1, P2, P3 dan P4 pada hasil uji Tukey (Tabel 5.1). Hasil ini memiliki nilai kadar glukosa yang lebih tinggi dibandingkan dengan hasil kelompok P1, P2, P3 dan P4. Menurut Evina (2011), jika kadar flavonoid lebih tinggi dari yang dibutuhkan oleh tubuh, flavonoid dapat berubah fungsi menjadi prooksidan, sehingga kadar glukosa kembali naik sebagaimana terjadi pada kelompok perlakuan P5 dengan dosis 1200 mg/kg BB.

Terapi ekstrak etanol daun pegagan (*C. asiatica*) pada semua dosis perlakuan efektif dalam menurunkan kadar glukosa karena menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan dengan kadar glukosa pada kelompok negatif (kontrol). Namun, penurunan kadar glukosa paling besar terdapat pada kelompok perlakuan P2 (terapi 150 mg/kg BB) yang dapat dilihat pada angka kadar glukosa yang paling rendah dan mendekati normal, sehingga dosis 150 mg/kg BB dianggap sebagai dosis terbaik dalam menurunkan kadar glukosa. Kadar glukosa menurun dari kondisi diabetes menjadi kondisi yang normal, hal ini dikarenakan senyawa aktif pada ekstrak pegagan (*C. asiatica*) berfungsi untuk menetralkan radikal bebas (ROS) yang terbentuk akibat induksi STZ sehingga menghambat kerusakan sel  $\beta$  pankreas dan kadar glukosa berangsur-angsur kembali normal.

## 5.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*C.asiatica*) terhadap Kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN) Pada Tikus Model DM Tipe 2

*Blood Urea Nitrogen* (BUN) merupakan produk akhir nitrogen dari metabolisme protein yang diekskresikan di ginjal melalui urin (Confer, 2003). Senyawa tersebut sering digunakan sebagai penanda kondisi fungsi ginjal. Hasil pengukuran kadar BUN pada kelompok perlakuan dianalisis secara statistik dengan uji *one way* ANOVA dan dilanjutkan dengan uji *Tukey* dengan tingkat kepercayaan 95%. Hasil uji *Tukey* didapatkan bahwa adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan dapat dilihat pada (Tabel 5.2).

**Tabel 5.2** Kadar BUN Pada Kelompok Perlakuan

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Kadar BUN (mg/dL) ± SD	Peningkatan terhadap kelompok kontrol Negatif (%)	Penurunan terhadap kelompok kontrol positif (%)
Kontrol Negatif (-)	17.70 ± 4.110 <sup>a</sup>	-	-
Kontrol Positif (+)	29.20 ± 3.190 <sup>b</sup>	39.38	-
P1 ( Dosis terapi 75 mg/kg)	21.95 ± 4.701 <sup>ab</sup>	-	24.83
P2 (Dosis terapi 150 mg/kg)	18.12 ± 2.260 <sup>a</sup>	-	37.94
P3 (Dosis terapi 300 mg/kg)	18.60 ± 7.939 <sup>a</sup>	-	36.30
P4 (Dosis terapi 600 mg/kg)	22.18 ± 1.341 <sup>ab</sup>	-	24,04
P5 (Dosis terapi 1200 mg/kg)	20.20 ± 3.300 <sup>ab</sup>	-	30.82

**Keterangan :** notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan ( $p < 0.05$ ) ; SD : Standar Deviasi

Hasil analisis uji *Tukey* pada **Tabel 5.2** menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak etanol daun pegagan (*C.asiatica*) mampu menurunkan kadar BUN secara signifikan ( $p < 0.05$ ). Analisis statistik kadar BUN kelompok kontrol negatif jika dibandingkan kadar BUN kelompok kontrol positif DM Tipe 2 menunjukkan hasil yang berbeda signifikan ( $p < 0.05$ ) yang ditandai dengan perbedaan notasi pada uji *Tukey*. Nilai rata-rata kadar BUN kelompok kontrol negatif memiliki nilai



paling rendah yaitu sebesar  $17.70 \pm 4.110$  mg/dL. Jumlah kadar BUN ini sesuai dengan pendapat Laksmi,dkk (2014) yang menyatakan bahwa standar kadar BUN pada tikus normal sebesar 15-21 mg/dL.

Hasil analisis kadar BUN perlakuan kontrol positif menunjukkan hasil yang berbeda signifikan ( $p < 0.05$ ) terhadap perlakuan kontrol negatif, P2 dan P3 dengan rata-rata kadar BUN kelompok kontrol positif sejumlah  $29.20 \pm 3.190$  mg/dL dan menunjukkan peningkatan sebesar 39.38% jika dibandingkan kelompok kontrol negatif. Hal tersebut disebabkan karena pengaruh induksi STZ yang merupakan salah satu agen diabetogenik yang dapat memicu aksi stress oksidatif oleh *Reactive Oxidative Species* (ROS) di sitosol sel  $\beta$  pankreas dan memicu peningkatan konsentrasi kalsium sehingga sel  $\beta$  pancreas mengalami kerusakan (Kudelski, 2001). Kerusakan sel  $\beta$  pancreas oleh ROS akan mengakibatkan gangguan sekresi insulin atau meningkatkan resistensi insulin (Suryani *et al.*, 2013) sehingga terjadi hiperglikemia. Pada kondisi hiperglikemia terjadi peningkatan produksi peroksidasi lipid dan hidrogen peroksida sel mesangial glomeruler (Chaturvedi, 2007), mengakibatkan hipertropi sel yang mengarah pada gagal ginjal. Karena keadaan ROS yang sangat tidak stabil dan reaktif maka dapat menyerang dan merusak organ seperti ginjal.

*Reactive Oxidative Species* dapat menyebabkan penyakit ginjal progresif berdasarkan metabolisme hemodinamik, merangsang respon inflamasi, dan peningkatan konsumsi oksigen yang mengarah pada terjadi stress oksidatif yang dapat merusak nefron ginjal (Diez, 2003). Adanya gangguan fungsi ginjal menyebabkan laju filtrasi glomerulus menurun dan mengakibatkan eksresi urea

terganggu (Rubenstein, 2008). Senyawa nitrogen urea darah atau BUN merupakan salah satu penanda kerusakan pada ginjal, sehingga apabila kadarnya meningkat, dapat diartikan bahwa fungsi ginjal mengalami gangguan.

Hasil kadar BUN pada kelompok P1 pada **Tabel 5.2** yaitu sebesar  $21.95 \pm 4.701$  mg/dL dan menunjukkan penurunan kadar BUN sebesar 24.83% dan secara statistik menunjukkan hasil yang tidak berbeda signifikan ( $p > 0,05$ ) terhadap perlakuan Kontrol positif, Kontrol negatif, P2, P3, P4 dan P5, hal ini ditunjukkan pada kelompok P1 berada pada satu notasi terhadap kelompok perlakuan Kontrol positif, Kontrol negatif, P2, P3, P4 dan P5. Hasil ini mulai menunjukkan peningkatan kadar BUN, dikarenakan adanya gangguan fungsi ginjal menyebabkan laju filtrasi glomerulus menurun dan mengakibatkan ekskresi urea terganggu (Rubenstein *et al.*, 2008). Urea difiltrasi oleh glomerulus dan akan diekskresi bersama urin (Bijanti, 2009). Menurut Vetlearn (2011) beberapa kondisi yang dapat menyebabkan kadar BUN meningkat yaitu dehidrasi infeksi ginjal, gagal ginjal dan penyakit toksik. Hasil kadar BUN pada Perlakuan P2 yaitu sebesar  $18.12 \pm 2.260$  mg/dL dengan penurunan kadar BUN sebesar 37.94 %. Hasil uji *Tukey* kelompok ini menunjukkan hasil yang berbeda signifikan ( $p < 0.05$ ) terhadap kelompok kontrol positif yang ditunjukkan dengan perbedaan notasi pada kelompok perlakuan, namun kelompok P2 tidak berbeda signifikan ( $p > 0.05$ ) dengan kelompok P3, P1, P4, P5 dan kontrol negatif, hal ini ditunjukkan pada kelompok P2 berada pada satu notasi dengan kelompok P3, P1, P4, P5 dan kontrol negatif. Hasil uji *Tukey* yang berbeda signifikan ( $p < 0.05$ ) terhadap kontrol positif juga dapat dilihat dari pemberian terapi ekstrak etanol daun pegagan (*C.asiatica*)

dengan dosis 300 mg/dL yang memiliki rata-rata kadar BUN sebesar  $18.60 \pm 7.939$  mg/dL dengan presentase penurunan kadar BUN sebesar 36.30%. Namun perlakuan P3 menunjukkan hasil yang tidak signifikan ( $p > 0.05$ ) dengan perlakuan P2, P1, P4, P5 dan kontrol negatif, hal ini ditunjukkan pada kelompok P3 berada pada satu notasi dengan kelompok P2, P1, P4, P5 dan kontrol negatif.

Kelompok perlakuan P4 memiliki rata-rata kadar BUN dengan hasil  $22.18 \pm 1.341$  mg/dL dengan presentase penurunan sebesar 24.04 % tetapi Kelompok perlakuan P4 menunjukkan hasil yang tidak berbeda signifikan ( $p > 0.05$ ) terhadap perlakuan Kontrol positif, Kontrol negatif, P1, P2, P3 dan P5, hal ini ditunjukkan pada kelompok P4 berada pada satu notasi terhadap kelompok perlakuan Kontrol positif, Kontrol negatif, P1, P2, P3 dan P5. Pada kelompok perlakuan P5 memiliki rata-rata kadar BUN sebesar  $20.20 \pm 3.300$  mg/dL dan presentase penurunan sebesar 30.82 %. Hasil analisa uji *Tukey* pada perlakuan P5 juga menunjukkan hasil yang tidak berbeda signifikan ( $p > 0.05$ ) terhadap perlakuan Kontrol positif, Kontrol negatif, P1, P2, P3 dan P4, hal ini ditunjukkan pada kelompok P5 berada pada satu notasi terhadap kelompok perlakuan Kontrol positif, Kontrol negatif, P1, P2, P3 dan P4.

Hasil analisa uji *Tukey*, perlakuan kontrol positif menunjukkan hasil yang berbeda signifikan ( $p < 0.05$ ) terhadap kelompok perlakuan P2 (terapi 150 mg/kg BB) dan P3 (300 mg/kg BB). Sehingga pada dosis 150 mg/kg BB dan 300 mg/kg BB efektif dalam menurunkan kadar BUN, dikarenakan kandungan flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol daun pegagan (*C.asiatica*) pada kedua dosis ini memiliki konsentrasi yang lebih optimal dan penyerapan ekstrak diusus

juga memiliki keefektifan yang lebih optimum sehingga dapat menurunkan kadar BUN. Namun, dosis yang paling baik dalam menurunkan kadar BUN yaitu pada dosis 150 mg/kg BB, dikarenakan secara farmakologis, pemilihan dosis yang paling baik sebaiknya menggunakan dosis terkecil namun memiliki efek yang lebih banyak. Hal tersebut ditunjukkan dengan dosis 150 mg/kg BB yang mampu menurunkan kadar BUN lebih baik dibandingkan dengan dosis 300 mg/kg BB. Pada kelompok perlakuan P4 (600 mg/kg BB) dan P5 (1200 mg/kg BB) tidak dapat menurunkan kadar BUN secara optimal karena menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan dengan aktivitas kadar BUN tikus pada kelompok negatif. Menurut Dzulfikor (2015), semakin tinggi konsentrasi dan dosis ekstrak yang diberikan, maka akan semakin lama penyerapan ekstrak di dalam tubuh dan Menurut Evina (2011), jika kadar flavonoid lebih tinggi dari yang dibutuhkan oleh tubuh flavonoid dapat berubah fungsi 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).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penurunan kadar BUN dengan pemberian ekstrak etanol daun pegagan (*C.asiatica*) yang mengandung antioksidan yaitu flavonoid berupa senyawa kuersetin dan telah dibuktikan dengan uji kuantitatif berupa uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Hasil tersebut juga didukung oleh pernyataan Salamah (2014), bahwa ekstrak pegagan (*C.asiatica*) mengandung antioksidan berupa flavonoid sebesar  $3.198 \pm 2.048$  mg QE/g ekstrak. Hal ini ditunjukkan dengan penurunan kadar BUN, karena

flavonoid dalam ekstrak pegagan (*C. asiatica*) akan melakukan transfer elektron kepada radikal bebas untuk dapat menstabilkan sifat reaktifnya serta dapat meningkatkan kembali aktivitas enzim endogen seperti enzim metionin sulfoksida reduktase sehingga mampu memperbaiki sel-sel glomerulus ginjal yang rusak menjadi normal kembali. Keadaan glomerulus ginjal yang mengalami perbaikan dapat membuat fungsi glomerulus dan laju filtrasi glomerulus menjadi normal kembali yang dapat ditunjukkan oleh penurunan kadar BUN.

## **5.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Gambaran Histopatologi Glomerulus Ginjal Tikus Model DM Tipe 2**

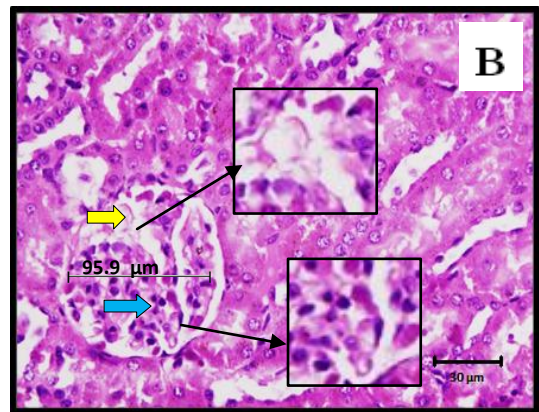
Penelitian ini, selain menggunakan parameter aktivitas kadar BUN juga menggunakan parameter histopatologi glomerulus ginjal dengan menggunakan pewarnaan HE (*Hematoxilin eosin*) yang berfungsi sebagai salah satu penentu keberhasilan terapi. Pengaruh pemberian ekstrak etanol daun pegagan terhadap gambaran histopatologi glomerulus ginjal menggunakan pewarnaan HE pada masing- masing kelompok perlakuan disajikan pada **Gambar 5.2**.

Glomerulus yaitu simpul pembuluh darah dengan ukuran sangat kecil yang terletak dibagian nefron ginjal yang berfungsi sebagai alat penyaring atau filtrasi air, garam asam amino, glukosa dan urea untuk menghasilkan urin (Dellman dan Eurell, 2006). Glomerulus tertutup oleh kapsula bowman yang membentuk mangkok, kapiler glomerulus dilapisi oleh sel-sel endotel, memiliki pori-pori dengan diameter kurang lebih 100 nm dan terletak pada membran basalis (Robbins dan Kumar, 1995).

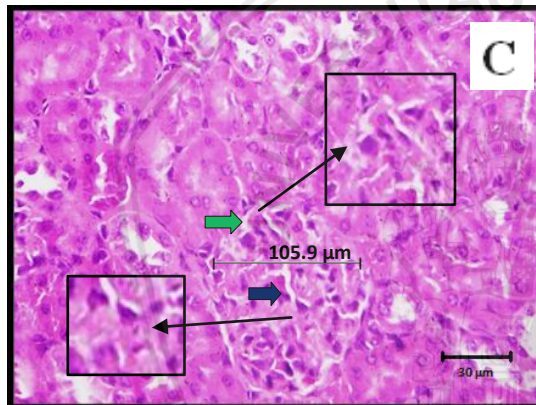




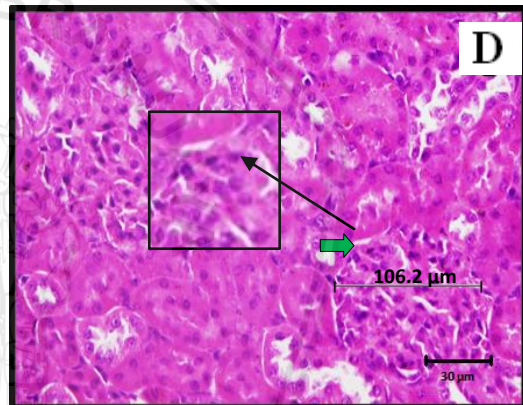
**Gambar A** : Kelompok kontrol negatif ; Perbesaran 400x



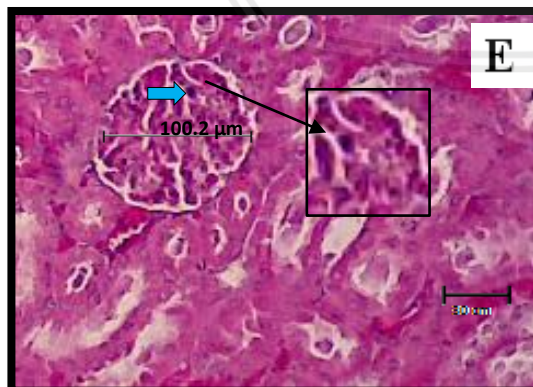
**Gambar B** : Kelompok kontrol positif; ➔ = glomerulosklerosis ; ➔ = piknosis; Perbesaran 400x



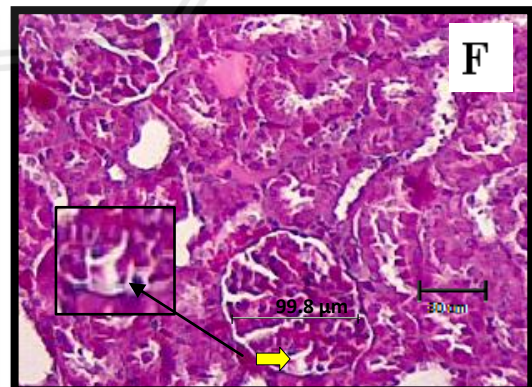
**Gambar C** : P1 (terapi 75 mg/kg BB) ; ➔ = hipertrofi ; ➔ = karioreksis; Perbesaran 400x



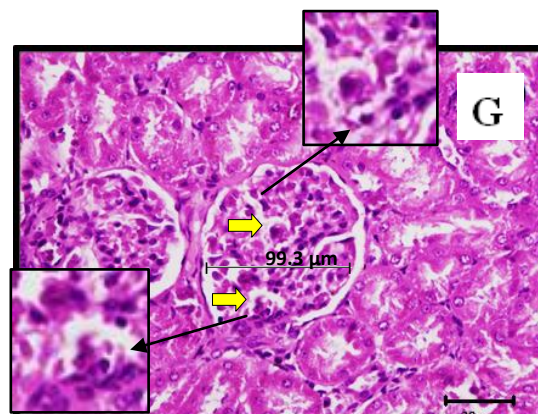
**Gambar D** : P2 (terapi 150 mg/kg BB) ; ➔ = hipertrofi; Perbesaran 400x



**Gambar E** : P3 (terapi 300 mg/kg BB) ; ➔ = piknosis; Perbesaran 400x



**Gambar F** : P4 (terapi 600 mg/kg BB) ; ➔ = glomerulosklerosis; Perbesaran 400x



**Gambar G:** P5 (terapi 1200 mg/kg BB) ;  
 ➡ = glomerulosklerosis;  
 Perbesaran 400x

**Gambar 5.2** Gambaran Histopatologi Ginjal Pewarnaan HE Tikus Model DM Tipe 2

Gambaran histopatologi ginjal tikus **Gambar 5.2** menunjukkan gambaran histopatologi glomerulus ginjal yang ditunjukkan pada setiap kelompok perlakuan. Pada kelompok kontrol negatif (**5.2A**) yang tidak diperlakukan dengan MLD-STZ dan HFD menunjukkan gambaran histologi dari glomerulus dan jaringan atau sel-sel sekitarnya masih normal ditunjukkan dengan membran basal glomerulus atau kapsula bowman masih terlihat jelas dan lapisan sel epitel masih terlihat kompak. Menurut Eroschenko (2007), kondisi ginjal normal terlihat dari jaringan ginjal sel epithelial glomerulus (kapiler glomerulus, kapsula bowman's) yang tersusun beraturan dengan bentuk sel yang terlihat normal dan mempunyai batas yang jelas. Ukuran diameter glomerulus kondisi normal sebesar 105.7  $\mu\text{m}$ .

Kelompok kontrol positif (**Gambar 5.2B**) yang diperlakukan dengan MLD-STZ dan HFD menunjukkan gambaran histopatologi kapiler glomerulus pada bagian visceral layer mengalami *glomerulosclerosis* ditandai dengan munculnya renal fibrosis yang ditunjukkan oleh panah berwarna (↑) sehingga



terjadi celah/ rongga yang sedikit lebar di area visceral layer kapsula bowman (reduksi filtrat glomerular) akibat dari hiperfiltrasi glomerulus yang terjadi terus menerus (Camargo, 2007). *Glomerulosclerosis* adalah kondisi kerusakan ginjal yang menyebabkan luka parut pada glomerulus yang disebabkan oleh banyak faktor salah satunya akibat progresif dari glomerular hipertrofi. *Glomerulosclerosis* yang terjadi pada glomerulus ginjal akibat dari peningkatan laju filtrasi glomerulus (GFR) menyebabkan hipertrofi sel-sel kapiler glomerulus dan terbentuknya jaringan parut dengan jumlah mekanisme yang berbeda. Demikian pula perubahan yang sama juga ditunjukkan pada kelompok perlakuan P4 (**Gambar 5.2F**) dan perlakuan P5 (**Gambar 5.2G**). Hiperfiltrasi pada kondisi DM disebabkan karena glukosa yang difiltrasi akan direabsorpsi oleh tubulus ginjal dan sekaligus membawa natrium, bersamaan dengan efek insulin yang merangsang reabsorpsi tubuler natrium, sehingga akan menyebabkan volume ekstra sel meningkat dan terjadilah hiperfiltrasi. Perubahan lainnya yaitu tampak terjadinya kematian sel atau nekrosis yang ditandai dengan rusaknya inti sel berupa sel piknosis yang ditunjukkan oleh panah berwarna (↑) serta hilangnya sel glomerulus. Piknosis merupakan kerusakan inti sel yang ditandai dengan larutnya kromosom dan proses kondensasi pada inti sel yang menjadikan sel terlihat lebih padat dan ukurannya mengalami penyusutan. Hal ini dikarenakan pemberian STZ yang mengakibatkan produksi radikal bebas dalam tubuh sangat tinggi dan menyebabkan kerusakan organ.

Tingginya kadar gula darah memicu terjadinya produksi radikal bebas yang akan membentuk produk AGE's yang sangat tinggi dalam sel yang

merupakan reaksi antara glukosa dan protein yang akan meningkatkan produk glikosilasi dengan proses non enzimatis protein antara prekursor karbonil (turunan glukosa intraseluler dengan amino dari protein intraseluler dan ekstraseluler). Menurut Chin (2005), terbentuknya AGE's dapat merusak sel, karena mengganggu struktur protein intrasel dan ekstrasel seperti kolagen. Adanya penimbunan ini dalam jangka panjang akan merusak membran basalis dan mesangium yang akhirnya akan merusak seluruh glomerulus.

Pemberian terapi ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) pada tikus kelompok perlakuan P1 (**Gambar 5.2 C**) menunjukkan gambaran histopatologi glomerulus ginjal yang telah mengalami nekrosis pada bagian sel glomerulus ditandai dengan bentuk sel tidak beraturan dan batas sel tidak jelas serta inti mengalami kerusakan berupa karioreksis (pecahnya inti sel dan rusaknya kromatin) yang ditunjukkan oleh panah (↑) dan gambaran glomerulus mengalami hipertrofi pada sel mesangial dan podocytes pada bagian visceral layer mengalami penebalan yang dapat membentuk perlekatan dengan kapsul bowman dan mengurangi ruang bowman sehingga tidak terdapat ruang pada kapsula bowman's (menyempit) ditunjukkan oleh panah (↑) dengan diameter glomerulus sebesar 105.8  $\mu\text{m}$  (Alpern dan Caplan, 2012). Adanya hiperfiltrasi glomerulus mengakibatkan ukuran diameter glomerulus lebih besar dari kondisi normal. Terapi Ekstrak pegagan (*C. asiatica*) pada tikus kelompok perlakuan P2 (**Gambar 5.2 D**) tampak keadaan hipertrofi pada sel mesangial dan podocytes dengan diameter glomerulus sebesar 106.2  $\mu\text{m}$ , namun diameter glomerulus mengalami pengecilan dan tampak inti sel tidak mengalami kerusakan karioreksis dan piknosis.

Terapi ekstrak pegagan (*C. asiatica*) pada tikus DM Tipe 2 perlakuan P3 (**Gambar 5.2 E**) tampak masih ada kerusakan inti sel piknosis yang cukup banyak. Hasil tersebut dapat menunjukkan bahwa gambaran histopatologi kelompok terapi ekstrak pegagan (*C. asiatica*) pada kelompok perlakuan P2 lebih baik dibandingkan dengan terapi ekstrak pegagan (*C. asiatica*) pada kelompok perlakuan P1, P3, P4 dan P5. Hal ini dikarenakan kandungan flavonoid dalam ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) pada perlakuan P2 memiliki dosis yang paling baik dan penyerapan ekstrak diusus juga memiliki keefektifan yang lebih optimum sehingga dapat bekerja lebih cepat dalam memperbaiki kerusakan histopatologi ginjal dan dapat menekan kerusakan pada glomerulus ginjal dibandingkan dengan perlakuan P1 yang merupakan dosis minimum, serta perlakuan P3, P4 dan P5 yang memiliki konsentrasi yang tinggi sehingga menghambat waktu penyerapan ekstrak di dalam tubuh.

Pegagan (*C. asiatica*) mengandung senyawa bioaktif flavonoid sebagai antiinflamasi dan antioksidan (Wang *et al*, 2017). Flavonoid bekerja dengan cara sebagai agen antiinflamasi dengan menekan ekspresi sitokin proinflamasi, dan menekan produksi ROS (*Reactive oxygen species*). Flavonoid juga dapat meningkatkan kembali aktivitas enzim antioksidan endogen. Salah satu enzim antioksidan endogen yaitu metionin sulfoksida reduktase yang berperan dalam memperbaiki dan mengembalikan kembali fungsi protein yang sebelumnya mengalami kerusakan struktur akibat paparan radikal bebas. Enzim metionin sulfoksida reduktase juga berperan dalam memperbaiki DNA sel yang juga mengalami kerusakan akibat radikal bebas. Ketika fungsi protein dan DNA secara

bertahap kembali normal, maka komponen organel sel juga akan mengalami perbaikan, seperti mitokondria untuk produksi ATP dan retikulum endoplasma sintesis enzim antioksidan primer. Tahapan berikutnya sel-sel glomerulus yang mampu bertahan dari kerusakan akibat peroksidasi lipid akan berproliferasi dan membentuk kembali struktur glomerulus yang normal. Ekstrak pegagan (*C.asiatica*) dengan demikian mampu memperbaiki sel-sel glomerulus.



## BAB 6 PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka didapatkan kesimpulan yaitu:

1. Pemberian ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica*) pada tikus model DM Tipe 2 mampu menurunkan kadar BUN dengan dosis terbaik yaitu sebesar 150 mg/kg BB pada tikus model DM Tipe 2.
2. Pemberian ekstrak etanol daun pegagan (*C. asiatica*) mampu memperbaiki gambaran histopatologi glomerulus organ ginjal yang dapat dibuktikan dengan tidak adanya *glomerulosclerosis* dan kematian sel berupa piknosis dan karioreksis dengan dosis terbaik yaitu 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 senyawa lain dalam ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*), seperti triterpenoid yang berpengaruh terhadap penurunan kadar BUN dan perbaikan histopatologi glomerulus organ ginjal pada tikus model DM Tipe 2. Serta perlu dilakukan pengujian parameter lain seperti pengukuran kadar insulin dan kadar kreatinin untuk memperkuat kondisi nefropati diabetik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akbarzadeh A., D. Norouziyan, M.R Mehrabi, Jamshadi, and A. Farhangi. 2007. Induction of Diabetes by Streptozotocin in Rats <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3453807/>. [16 November 2018].
- Alpern, R.J. and M.J Caplan. 2012. *Seldin and Giebisch's The Kidney, Physiology & Pathophysiology*. 5<sup>th</sup> Edition. Academic Press.
- Alunat, D.E.S., I.M Kardena, dan I.N Suarsana. 2014. Pengaruh konsumsi urin Sapi Bali terhadap kadar *Blood Urea Nitrogen* , Kreatinin, serta gambaran histopatologi ginjal tikus. *Buletin Veteriner Udayana* 6 (2) : 169-173.
- Anita, D.C. 2015. Kadar Glukosa Darah dan Malondialdehid Ginjal Tikus Diabetes yang Diberi Latihan Fisik. *Muhammadiyah Journal of Nursing* 1(2): 109-116.
- Banfield Pet Hospital. 2016. *State of Pet Health 2016 Report*. Banfield Pet Hospital. USA. 2-13. <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjXsPhgPveAhXJRY8KHziNAwAQFjAAegQIARAC&url=https%3A%2F%2Fwww.banfield.com%2Fbanfield%2Fmedia%2Fpdf%2Fdownloads%2Fsoph%2Fbanfield-state-of-pet-health-report-2016.pdf&usg=AOvVaw2Kf7eVsftPVwHzUsyYw-QV>. [30 November 2018].
- Ble-Castillo, J. L., M. A. Aparicio-Trapala, I. E. Juarez-Rojop, J. E. Torres-Lopez, J. D. Mendez, H. Aguilar-Mariscal, V. Olvera-Hernandez, L. C. Palma-Cordova dan J. C. Diaz-Zagoya. 2012. Differential Effects of High-Carbohydrate and High-Fat Diet Composition on Metabolic Control and Insulin Resistance in Normal Rats. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9: 1663-1676.
- Brinkhaus, B., M. Lindner, D. Schuppan, and E.G Hahn. 2000. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine* 7: 427-428.
- Camargo, M. M. P dan C. B. R. Martinez. 2007. Histopathology of Gills, Kidney and Liver of a Neotropical Fish Caged in an Urban Stream. *Neotropical Ichthyology*, 5(3):327-336.
- Carvalho, E.N., N.A.S. Carvalho, L.M. Ferreira. 2003. Experimental Model Of Induction Of Diabetes Mellitus in Rats. *Acta Cir. Bras* vol.18. <http://www.scielo.br/acb>.





- Chaturvedi, N. 2007. *The Burden Of Diabetes And Its Complications: Trends And Blackwell Publishing.*
- Chin, J. A. & Sumpio, B. E. 2014. Diabetes Melitus and Peripheral Vascular Disease. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, 31, 11-26.
- Coca, S.G., B.Yusuf., M.G. Shlipak. A.X. Gary, and C.R. Parikh. 2009. *Long Term Risk of Mortality and Other adverse outcomes After Acute Kidney Injury : A Systemic Review and Meta-analisis.* Am. J.Kidney. Dis 53 :961-973. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19346042>. [15 November 2018].
- Coelho D. F., L.O. Pereira-Lancha, D.S. Chaves, D. Diwan, R. Ferraz, P. L. Campos-Ferraz, J. R. Poortmans dan A. H. L. Junior. 2011. Effect of High-Fat Diets on Body Composition, Lipid Metabolism and Insulin Sensitivity, And the Role of Exercise on These Parameters. *Braz J Med Biol Res.* 44(10) 966-972.
- Confer, A., and R.J Panciera. 2003. *The Urinary System.* In McGavin,MD.
- Corwin E.J., 2009. *Handbook of Patophysiology (Terjemahan).* 3<sup>rd</sup> ed. Jakarta :ECG.
- Cotelle, N. 2001. Role of flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Med Chem* 1(6) : 569- 590.
- Dalimartha, S. 2000. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia 2.* Jakarta: Trubus Agriwidya.
- Dellmann, H.D and J.A Eurell. 2006. *Textbook of Veterinary Histology.* Ed ke-6. USA: 44 (6) : 996-975
- DeFronzo, R.A. 1997. Pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Rev.* 5:1-66.
- Depkes [Dinas Kesehatan]. 2005. *Pharmaceutical Care untuk Penyakit Diabetes Melitus.* Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik. Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan. Departemen Kesehatan RI. Jakarta.10-13.
- Dharmawan, N.S. 2002. *Pengantar Patologi Klinik Veteriner, Hematologi Klinik.* Denpasar: Universitas Udayana. [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiw5d2khu\\_eAhXHq48KHVnxCOgQFjAEegQIAhAC&url=http%3A%2F%2Fdownload.portalgaruda.org%2Farticle.php%3Farticle%3D349023%26val%3D974%26title%3DTekanan%2520Osmosis%2520Membran%2520Eritrosit%2520Sapi%2520Bali%2520Jantan&usg=AOvVaw3pA1meOoUm16AAwXg3b7\\_X](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiw5d2khu_eAhXHq48KHVnxCOgQFjAEegQIAhAC&url=http%3A%2F%2Fdownload.portalgaruda.org%2Farticle.php%3Farticle%3D349023%26val%3D974%26title%3DTekanan%2520Osmosis%2520Membran%2520Eritrosit%2520Sapi%2520Bali%2520Jantan&usg=AOvVaw3pA1meOoUm16AAwXg3b7_X). [28 Oktober 2018].
- Diez, B.G. 2003. Progression of Chronic Renal Failure and Oxidative Stress, *Electron J Biomed;* 1(1):5-11.



- 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. E. Eleazu, S. Chukwuma dan U. N. 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*. 12:60.
- Eroschenko, V.P. 2007. *Di Fiore's Atlas of Histologi with Functional Correlations*. 11<sup>th</sup> ed. Jakarta: EGC. [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwikzKmAie\\_eAhXLMo8KHc63D4AQFjABegQIABAC&url=https%3A%2F%2Flectureug5.files.wordpress.com%2F2014%2F02%2Fdifiores-atlas-of-histology-with-functional-correlations-11th-ed.pdf&usg=AOvVaw2T3wyPugsWc1t3LJvy-TLF](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwikzKmAie_eAhXLMo8KHc63D4AQFjABegQIABAC&url=https%3A%2F%2Flectureug5.files.wordpress.com%2F2014%2F02%2Fdifiores-atlas-of-histology-with-functional-correlations-11th-ed.pdf&usg=AOvVaw2T3wyPugsWc1t3LJvy-TLF). [1 November 2018].
- Etuk, E.U. 2010. Animals Models for Studying Diabetes Mellitus. *Agric. Biol. J. N. Am.* 1(2): 130-134.
- Evina, 2011. Uji Efektifitas Ekstrak Kelopak Rossela (*Hibiscus sabdariffa* L) Terhadap Penurunan Kadar Kolesterol Serum Darah Ayam Broiler. Jurusan Kimia FMIPA UNIMED. Medan.
- Fahranti N.P., D. Lyrawati., I. Sarwono. 2015. Efek Asam Alfa Lipoat Pada Kadar MDA dan Histopatolgi Ginjal Tikus Wistar Diabetes Mellitus Tipe 1. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* Vol. 28 No.3.
- Fatimah, R.N. 2015. Diabetes Melitus Tipe 2. *J Majority*. Vol 4. No. 5
- 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. [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwibzqGGi\\_eAhWIr48KHUSqDnYQFjABegQIAhAC&url=https%3A%2F%2Fpdfs.semanticscholar.org%2F7f35%2Fdd378bfad146f0cd3900bc4ff5d4e3f5a60a.pdf&usg=AOvVaw1bs\\_-6r6xtHwHEpOJ0vyi5](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwibzqGGi_eAhWIr48KHUSqDnYQFjABegQIAhAC&url=https%3A%2F%2Fpdfs.semanticscholar.org%2F7f35%2Fdd378bfad146f0cd3900bc4ff5d4e3f5a60a.pdf&usg=AOvVaw1bs_-6r6xtHwHEpOJ0vyi5). [27 Oktober 2018].
- Gardner D, and D. Sholback. 2007. Greenspans *Basic and Clinical Endocrinology 8<sup>th</sup> Edition*. USA:Mc.Graw-Hill.
- Giacco, F. and Brownlee, M. (2010) Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circulation Research*, 107(9) : 1058-1070. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21030723>. [16 April 2019]

- Gispen, W.H., Biessels, G.J., 2000. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci.* 23(11): 542–549. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11074263>. [15 April 2019]
- Gross J.L., L.H Canani, M.L Caramori. 2005. Diabetic Nephropathy : Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care.* 28:164-75. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15616252>. [25 Oktober 2018].
- Hakim, Arif Luqmanul. 2010. Potensi Beberapa Bentuk Sediaan Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) Terhadap Gambaran Histologis dan Kadar Antioksidan Pankreas Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Aloksan. Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang.
- Hashim, P. 2011. *Centella asiatica* in Food and Beverage Applications and Its Potential Antioxidant and Neuroprotective Effect. *International Food Research Journal* 18 (4): 1215-1222.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia* Jilid III. Terjemahan Badan Litbang Kehutanan. Jakarta: Yayasan Sarana Wana Jaya.
- Holmes, A., L. J. Coppey, E. P. Davidson, dan M. A. Yorek. 2015. Rat Models of Diet Induced obesity and High Fat/Low Dose Streptozotocin 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 <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2015/307285/>. [26 Oktober 2018].
- Horne, M and L.P Swearingen. 2001. *Keseimbangan Cairan Elektrolit Asam Basa (Edisi Kedua)*. Jakarta : ECG.
- Hurrle, S. and W. H. Hsu. 2017. The Etiology of Oxidative Stress in Insulin Resistance. *Biomedical Journal* 40 (2017) 257-262
- Hussain, H.E.M.A. 2002. Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant properties of combination of curcumin from *Curcuma longa*, linn. And partially purified product from *Abroma augusta*, linn. In streptozotocin induced diabetes. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 17(2) : 33-43. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3454113/>. [ 30 Maret 2019]
- Islas-Andrade, S., M. C. R. Monsalve, J. E. de la Pena, A. C. Polanco, M. A. Palomino, dan A. F. Velasco. 2000. Streptozotocin and Alloxan in Experimental Diabetes: Comparison of Two Model in Rats. *Acta Histochem Cytochem* 33(3): 201-208.
- James, J. T., Meyer, R. and Dubery, I. A. 2008. Characterisation of two phenotypes of *Centella asiatica* in Southern Africa through the

- consumption of four triterpenoids in callus, cell suspension and leaves. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 94: 91-99.
- Jamil, S. S., Qudisia, N. and Salam, M. 2007. *Centella asiatica* (Linn.) Urban – A review. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 6: 158-170.
- Januwati, M., dan Yusron, M., 2005, *Budidaya Tanaman Pegagan, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian*, 1-5, Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatika, Cijayanti : Jabar.
- Jorns A., J. Klempnauer, M. Tiedge, and S. Lenzen. 2001. *Recovery of Pancreatic Beta Cells in Response to Long-term Normoglycaemia After Pancreas or Islet Transplantation in Severely Streptozotocin Diabetic Adult Rats*. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung.
- Kamble, P.M., S.C. Choudhari, and A.S. Yadav. 2015. Study of Lipid Profile, Oxidative Stress, and Antioxidant Satatus in Type 2 Diabetes Mellitus. *WIMJOURNAL*. Vol. 2(1). 966 – 972.
- King, A. J. F. 2012. The Use of Animal Models in Diabetes Research. *British Journal of Pharmacology*. 166: 877-894. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22352879>. [27 Oktober 2018].
- Kudelski, T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res.* 50: 536-546. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11829314>. [25 Oktober 2018].
- Kumar, MH Veerendra and YK Gupta. 2003. *Effect of Centella asiatica on Cognition and Oxidative Stress in an Intracerebroventricular Streptozotocin Model of Alzheimer's Disease in Rats*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 30: 336-342 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12859423/> [24 Oktober 2018].
- Laksmi G.D., K.A. Dada, M. Damriyasa. 2014. Bioaktivitas Esktrak Daun Tapakdara (*Catharantus roseus*) Terhadap Kadar Kreatinin dan Kadar Ureum Darah Tikus (*Rattus novergicus*). *Buletin Veteriner Udayana*. Vol.6 No.2.
- Maureen, W. 2004. Encouraging People with Diabetes to Get The Most From Blood Glucose Monitoring Observing and Acting Upon Blood Glucose Patters. Article. Aintree Hospital. Liverpool. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21560834>. [26 Oktober 2018].

- Myers, P. and D. Armitage. 2004. "*Rattus norvegicus*" Animal Diversity. [https://animaldiversity.org/accounts/Rattus\\_norvegicus/](https://animaldiversity.org/accounts/Rattus_norvegicus/). [24 Oktober 2018].
- Myhilli MD., R. Vyas, G. Akila, dan S. Gunaserkaran. 2004. Effect of Streptozotocin on the Ultrastucture of Rat *Pancreatic Microscopy Research and Technique*. 63: pp274-281. Islet. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15170757>. [25 Oktober 2018].
- Nugroho, F. A., R. M. S. Ginting, dan Nurdiana. 2015. Kadar NF- $\kappa$ B Pankreas Tikus model Type 2 Diabetes Melitus dengan Pemberian Tepung Susu Sapi. *Indonesian Journal of Human Nutrition*. Vol. 2. 2: 91-100.
- Pasaribu S. 2001. Telaah Histopatologi Urolithiasis Pada Kucing. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor : Bogor. <https://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/22979>. [26 Oktober 2018].
- Prabowo, W. 2002. *Centella Anti Radang*. PT. Intisari Mediatama. Jakarta.
- Ragheb, R., dan A. M. Medhat. 2011. Mechanisms of Fatty Acid-Induced Insulin Resistance in Muscle and Liver. *J Diabetes Metab* 2:127.
- Ramadhani, D., I. Kurnia, S. Soetopo, D. Tetriana, I. Ramli, Budiningsih, Andrijono, T. Kurjana, M.D.L Tobing. 2012. *Analisis Serta Stitching Citra Imunohistokimia MB-1 Dengan Immunoratio dan Perangkat Lunak Nish Element*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Raza H, and John A. 2013. *Streptozotocin-Induced Cytotoxicity, Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Human Hepatoma HepG2 Cells*. *Int. J. Mol. Sci*, 13, 5751-5767.
- Rehman G., S.A Khan, M. Humayun. 2005. Studies on diabetic nephropathy and secondary disease in type 2 diabetes. *Int. J. Diab. Dev. Ctries.*, 25:25-29. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3394354/>. [25 Oktober 2018].
- Rianti, soraya. 2013. Isolation of Flavonoid form Jackfruit Leaves (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) and its Antioidant Activity. *Acta Pharmautica Indonesia* 38: (2).
- Robbins, S. Kumar, V. Cotran, R. 2007. *Buku Ajar Patologi Volume 2 Edisi 7*. Jakarta:EGC.
- Rubenstein. 2008. *Kedokteran Klinik. Edisi Revisi. ECG* : Jakarta



- Salamah, N. F.Liani. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Herba Pegagan (*Centella asiatica*) Dengan Metode Fosfomolibdat. *Pharmaciana*, Vol 4 No.1 23-30.
- Skovso, S. 2014. Modeling Type 2 Diabetes in Rats Using High Fat Diet and Streptozotocin. *Journal of Diabetes Investigation*. 5: 349-358. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4210077/>. [23 Oktober 2018].
- 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 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15979893>. [27 Oktober 2018].
- Suryani, Nani, Endang, Tinny, dan Aulanni'am, 2013, Pengaruh Ekstrak Biji Metanol terhadap Peningkatan Kadar Insulin, Penurunan Ekspresi TNF- $\alpha$  dan Perbaikan Jaringan Pankreas Tikus Diabetes, *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 27 (23).
- Susilorini, U.D Indrayani, M. Sofan. 2013. Pengaruh Ekstrak *Alium sativum* terhadap Diameter Glomeruli Ginjal Tikus Sprague Dawley Jantan yang Diinduksi Streptozotocin. *Sains Medika* Vol.5 No.1.
- Sutardi. 2009. *Kajian waktu panen dan pemupukan fosfor terhadap pertumbuhan dan produksi asiatioksida tanaman pegagan (Centella asiatica L. Urban) di dataran tinggi*. Tesis. Program Studi Agronomi, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Szkudelski, T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res.* 50: 536-546.
- Tjandrawinata, R.R. 2016. *Patogenesis Diabetes Tipe 2 Resistensi Insulin dan Defisiensi Insulin*. Dexa Laboratories of Biomolecular Sciences (DBLS).
- Ventura, S. J., V. D. Boone-Villa, C. N. Aguilar, R. Román-Ramos, E. Vega-Ávila, E. Campos-Sepúlveda, dan F. Alarcón-Aguilar. 2011. Effect of Varying Dose and Administration of Streptozotocin on Blood Sugar in Male CD1 Mice. *Proc West Pharmacol Soc* 2011, 54:5-9.
- Vetleran. 2011. *Test and Prosedurs : BUN and Creatinine Levels*. Vetstreet. 1-2. <http://www.vetstreet.com/care/bun-and-creatinine-levels>. [25 Oktober 2018].
- Wahyono, J., Hakim, A.R, Nugroho, A.E. 2007. Profil Farmakokinetika Sulfasetamid pada Tikus Gagal Ginjal Karena Diinduksi Uranil Nitrat. *Majalah Farmasi Indonesia* 18(3), 117-123

- Wang, J., Mi H., Jie Y., Xinhua Ma, Sijian Z., Shihao D., Yun H., Xinzhou Y., & Ping Z. 2017. Anti-diabetic Activity of Stigmasterol from Soybean Oil by Targeting the GLUT4 Glucose Transporter. *Food & Nutrition Research*, 61(1).
- Wells, M and J. Lipman. 1997. Measurement of Glomerular Filtration rate of Unit Renal Function. *S Afr. J Surg.* 35:20-23. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3359548/>. [27 Oktober 2018].
- WHO [World Health Organization]. 2016. *Global Report on Diabetes*. World Health Organization Library Catalog. 21-25
- Wijayakusuma, H., A.S. Wirian, T.Yaputra, S. Dalimartha, dan B.Wibowo. 1994. *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia*. Jilid I. Pustaka Kartini, Jakarta.
- Wild, S., G. Roglic, A. Green, R.Sicree dan H. King. 2004. Global Prevalence Of Diabetes : Estimates For Year 2000 and Projections For 2030. *Diabetes Care* 27(5): 1047-53. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111519>. [ 30 November 2018].
- Winarto, W.R. dan M. Surbakti. 2003. *Khasiat dan Manfaat Pegagan*. Agromedia Pustaka, Jakarta. [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjGxpv8rO\\_eAhWksI8KHbbWCQIQFjABegQICBAC&url=https%3A%2F%2Fmedia.neliti.com%2Fmedia%2Fpublications%2F122679-ID-kandungan-bahan-aktif-tanaman-pegagan-da.pdf&usg=AOvVaw0PBFbPE\\_2S2pOuxTVT52C8](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjGxpv8rO_eAhWksI8KHbbWCQIQFjABegQICBAC&url=https%3A%2F%2Fmedia.neliti.com%2Fmedia%2Fpublications%2F122679-ID-kandungan-bahan-aktif-tanaman-pegagan-da.pdf&usg=AOvVaw0PBFbPE_2S2pOuxTVT52C8). [26 Oktober 2018].
- Wu, J., dan L. J. Yan. 2015. Streptozotocin Induced Type 1 Diabetes in Rodents as A Model for Studying Mitochondrial Mechanisms of Diabetic  $\beta$  Cell Glucotoxicity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 8:181-188. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4396517/>. [27 Oktober 2018].
- Zhang, M., Xiao-Y. Lv, J. Li, Zhi-G. Xu dan L. Chen. 2008. The Characterization of High-Fat Diet and Multiple Low-Dose Streptozotocin Induced Type 2 Diabetes Rat Model. *Exp Diabetes Res* 2008: 704045.





## Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 927-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 : PEMANFAATAN EKSTRAK DAUN PEGAGAN  
TERHADAP KADAR MALONDIALDEHID DAN  
AKTIVITAS SUPEROXIDE DISMUTASE PADA TIKUS  
MODEL DIABETES MELLITUS TIPE II

PENELITI : FIDIA HESTIKASARI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 26 Februari 2018  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



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

## Lampiran 2. Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Pegagan



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

65313

Nomor : 074 / 134D / 102.7 / 2018  
Sifat : Biasa  
Perihal : **Surat Keterangan Analisa Kualitatif**

Bersama ini kami sampaikan hasil analisa berikut ini :

### 1. Identitas Pemohon

Nama : Aulia Azka S.K  
NIM : 155130101111067  
Instansi : Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya  
Alamat Instansi : Malang  
Nomor Telp. Instansi : -


### 2. Identitas Sampel

Nama daerah sampel : Pegagan  
Nama latin : *Centella asiatica*  
Bagian sampel : Daun  
Bentuk sampel : Serbu  
Asal sampel : -  
Tanggal penerimaan : 06 Desember 2018  
Tanggal pemeriksaan : 06 Desember 2018

### 3. Hasil

No	Identifikasi Senyawa	Parameter	Hasil
1.	Flavonoid	Merah Bata, Merah Muda, Merah Tua	Positif
2.	Alkaloid		
	Meyer	Endapan Putih	(tidak dilakukan)
	Dragendrof	Endapan Jingga	(tidak dilakukan)
	Bouchardat	Endapan Cokelat	(tidak dilakukan)
3.	Tanin	Hijau Kehitaman, Biru Kehitaman, Coklat Kehitaman	(tidak dilakukan)
4.	Saponin	Busa Permanen	(tidak dilakukan)
5.	Fenol	Hijau Kehitaman, Biru Kehitaman	(tidak dilakukan)

### 4. Lampiran

Nama Sampel	Flavonoid
Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> )	

### 5. Pustaka

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1978. "Materia Medika Indonesia", Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.

Demikian disampaikan untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 06 Desember 2018  
Kepala UPT Materia Medica Batu  
  
Dr. Husni RM, Drs., Apt, MKes.  
NIP. 19611102 199103 1 003



### Lampiran 3. Determinasi Tanaman Pegagan



**PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR**  
**DINAS KESEHATAN**  
**UPT MATERIA MEDICA BATU**  
 Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396  
**KOTA BATU 65313**

Nomor : 074/391A/ 102.7/ 2018  
 Sifat : Biasa  
 Perihal : **Determinasi Tanaman Pegagan**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : AULIA AZKA S.K  
 NIM : 155130101111067  
 Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

1. Perihal determinasi tanaman pegagan

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)  
 Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)  
 Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)  
 Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)  
 Kelas : Dicotyledonae  
 Bangsa : Umbellales  
 Suku : Umbelliferae  
 Marga : Centella  
 Jenis : *Centella asiatica* ( Linn). Urban.  
 Sinonim : *Hydrocotyle asiatica* Linn. = *Pasequinus* Rumph.  
 Nama Daerah : Pegagan, gagan-gagan, rendeng, kerok batok (Jawa), daun kaki kuda (Indonesia), pegaga (Ujung Pandang), antanan gede, antanan rambat (Sunda), dau tungke (Bugis), kos tekosan (Madura), kori-kori (Halmahera).  
 Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-16a-239b-243b-244b-248b- 249b-250b-266b-267a-268a-269a-2b-3.

2. Morfologi : Pegagan merupakan terna menahun tanpa batang, tetapi dengan rimpang pendek dan stolon-stolon yang merayap dengan panjang 10-80 cm. Akar keluar dari setiap bonggol, banyak bercabang yang membentuk tumbuhan baru. Helai daun tunggal, bertangkai panjang sekitar 5-15 cm berbentuk ginjal. Tepinya bergerigi atau beriggit, dengan penampang 1-7 cm tersusun dalam roset yang terdiri atas 2-10 helai daun, kadang-kadang agak berambut. Bunga berwarna putih atau merah muda, tersusun dalam karangan berupa payung, tunggal atau 3-5 bersama-sama keluar dari ketiak daun. Tangkai bunga 5-50 mm. Buah kecil bergantung yang berbentuk lonjong/pipih panjang 2-2.5 mm, baunya wangi dan rasanya pahit.

3. Nama Simplicia : Centellae Folium/ Daun Pegagan.

4. Kandungan : Asiaticoside, thankuniside, isothankuniside, madecassoside, brahmoside, brahminoside, brahmic acid, madasiatic acid, meso-inositol, centellose, carotenoids, garam-garam mineral seperti garam kalium, natrium, magnesium, kalsium, besi, vellarine, dan zat samak. Senyawa glikosida triterpenoida yang disebut asiaticoside dan senyawaan sejenis, mempunyai kasiat anti lepra. Daun kaki kuda mengandung senyawa glikosida trigergepnoida, alkaloid hidrokotilin, steroid, tanin, minyak atsiri, gula pereduksi dan garam-garam mineral seperti garam kalium, natrium, magnesium, kalsium dan besi.

5. Penggunaan : Penelitian

6. Daftar Pustaka

- Anonim. 1977. *Materia Medica Indonesia "Jilid I"*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Anonim. 2007. *Serial Tanaman Obat "PEGAGAN"*. Badan POM Republik Indonesia.
- Anonim. <http://www.iptek.net.id/pegagan>, diakses tanggal 29 oktober 2010.
- Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Hutapea, Johny Ria. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian Dan Pengembangan
- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA*. Pradnya Paramita, Jakarta.

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





## Lampiran 4. Uji Kuantitatif Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Pegagan



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR  
DINAS KESEHATAN  
UPT MATERIA MEDICA BATU  
Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu  
KOTA BATU

65313

Nomor : 074 / 09D / 102.7 / 2019  
Sifat : Biasa  
Perihal : **Surat Keterangan Analisa KLT Kuantitatif**

Bersama ini kami sampaikan hasil analisa berikut ini :

### 1. Identitas Pemohon

Nama : Aulia Azka Suradi K.  
NIM : 155130101111067  
Instansi : Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya  
Alamat Instansi : Malang  
Nomor Telp. Instansi : -

### 2. Identitas Sampel

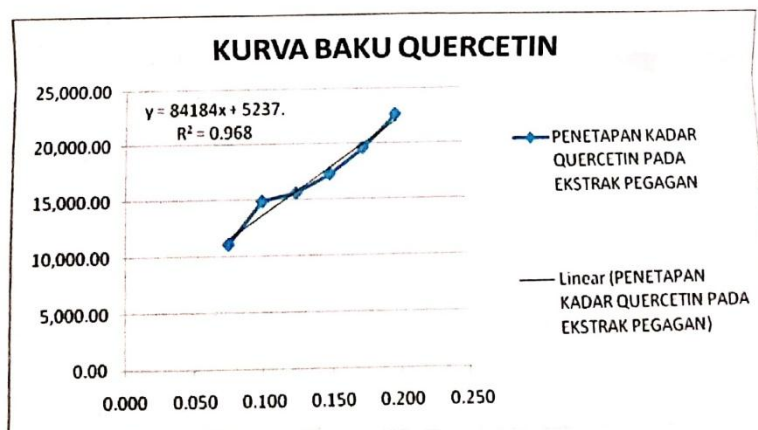
Nama daerah sampel : Pegagan  
Nama latin : *Centella asiatica*  
Bagian sampel : Daun  
Bentuk sampel : Ekstrak  
Pelarut : Etanol 96%  
Asal sampel : UPT Materia Medica Batu  
Tanggal penerimaan : 06 Februari 2019  
Tanggal pemeriksaan : 06 Februari 2019

### 3. Kurva Baku

Penimbangan : 10 mg serbuk Quercetin  
Jenis Pelarut : Etanol P.A  
Volume Pelarut : 50 mL  
Konsentrasi Larutan induk : 0.20 µg/µL

Persamaan :  $Y = BX + A$   
A = 84,184.34  
B = 5,237.20  
 $R^2 = 0.968$

Kadar (µg/µL)	Luas Area (AUC)
0.075	11,041.60
0.100	14,849.20
0.125	15,553.90
0.150	17,258.40
0.175	19,574.30
0.200	22,597.90

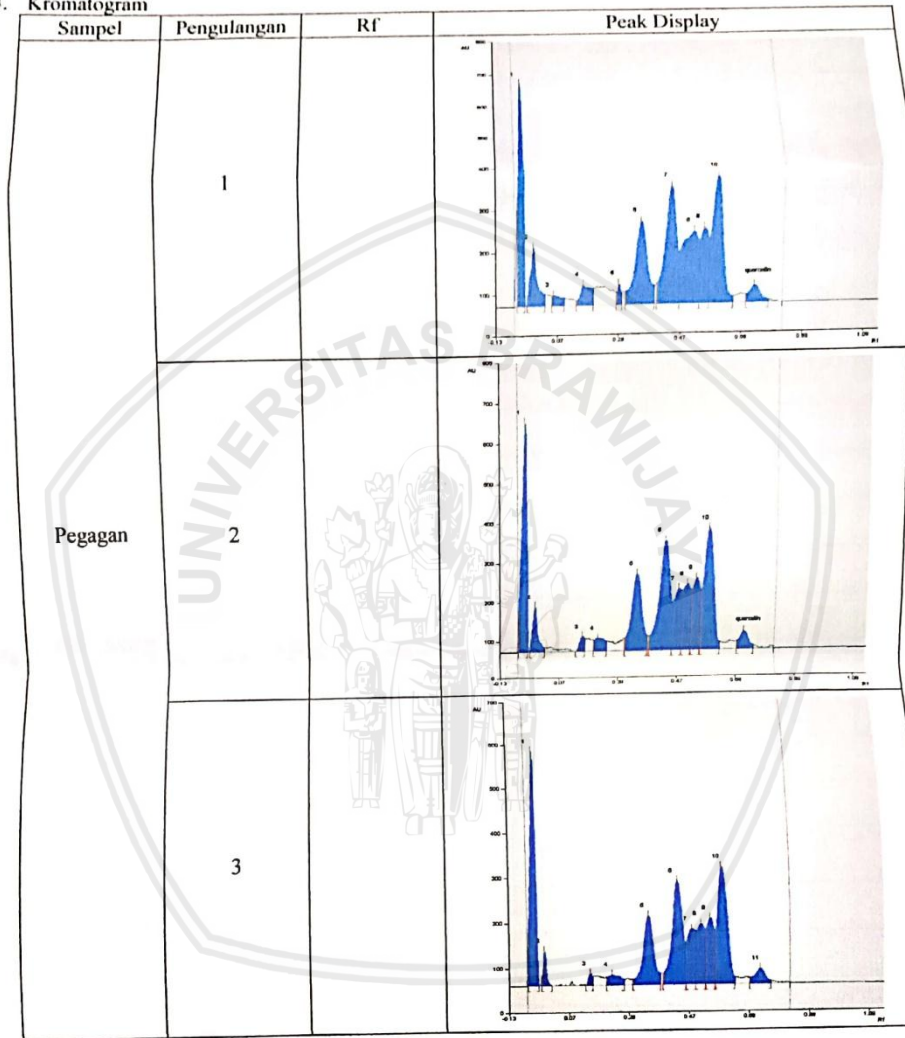




**PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR  
DINAS KESEHATAN  
UPT MATERIA MEDICA BATU**  
Jalan Labor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu  
KOTA BATU

65313

4. Kromatogram



5. Hasil

Sampel	Penimbangan (mg)	Volume Penotolan (μL)	Luas Area (AUC)	Kadar (%)	Rata-rata (%)	SD
Pegagan	1000.00	4.00	1,394.80	0.05	0.05	0.002
	1000.00	4.00	1,292.30	0.05		
	1000.00	4.00	1,107.30	0.05		

Demikian disampaikan untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 16 Februari 2019  
Kepala UPT Materia Medica Batu  
  
Dr. Husin R. K. D. S., Apt. MKes.  
KIP 0661102 199103 1 003



## Lampiran 5. Pembuatan Larutan STZ

### 5.1 Pembuatan Larutan Buffer Sitrat pH 4,5

Pembuatan buffer sitrat 0,2 M dibuat dengan mencampurkan 2,1076 gram asam sitrat dan 2,9449 gram natrium sitrat yang dilarutkan dalam 30 mL aquades steril, kemudian distirer dan diatur pHnya pada 4,5. Selanjutnya dipindah pada labu ukur 50 mL dan ditanda batas dengan aquades, dihomogenkan. Kemudian dipindah pada botol gelap dan disterilisasi dengan autoclave (Sofhia, 2013).

### 5.2 Pembuatan Larutan Streptozotocin

Streptozotocin 500 mg dilarutkan dalam 7.5 ml buffer sitrat dengan pH 4,5 yang telah dibuat sebelumnya. Kemudian dihomogenkan, larutan STZ yang digunakan dengan dosis 40 mg/kg BB adalah :

$$\frac{BB \text{ tikus (gram)}}{1000 \text{ gram}} \times 30 \text{ mg}$$

Konsentrasi Larutan STZ adalah 500 mg/7,5 mL = 500 mg/7500 µl.

Larutan STZ yang diinjeksikan adalah :

Diketahui :

- Dosis MLD-STZ = 30 mg/kg BB (diberikan selama 7 hari)
- Berat Badan tikus rata-rata = 150 gram

Dihitung :

- 500 mg STZ dilarutkan dalam 7500 µl buffer sitrat sehingga dalam 1 µl buffer sitrat = 0,067 mg STZ
- MLD-STZ = 7 hari x 30 mg/kg BB
- Pemberian STZ per ekor/ hari :

$$\frac{\frac{BB}{1000} \times \text{dosis} \times 1 \mu\text{l}}{0,067 \text{ mg}}$$

$$\frac{\frac{150}{1000} \times 30 \text{ mg} \times 1 \mu\text{l}}{0,067 \text{ mg}} = 67,2 \mu\text{l}$$

- Untuk BB 150 gr, injeksi yang diberikan 67,2 $\mu\text{l}$  secara IP (*Intra Peritoneal*)
- Jumlah pemberian STZ untuk 7 hari per ekor  
67,2 $\mu\text{l}$  x 7 hari = 470,4  $\mu\text{l}$ /ekor
- Jumlah pemberian STZ untuk 7 hari pada 28 ekor tikus  
470,4  $\mu\text{l}$  x 28 ekor = 13171,2  $\mu\text{l}$

#### Lampiran 6. Perhitungan Dosis Ekstrak Ethanol Daun Pegagan (*Centella asiatica*)

Dosis eksperimental ditentukan berdasarkan penelitian Andriani (2014) yang menggunakan ekstrak seledri (*Apium graveolens L.*), berdasarkan kekerabatannya dalam satu family umbelliferae, peneliti berasumsi bahwa daun pegagan memiliki kandungan kimia yang relatif sama dengan daun seledri. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 75 mg/kg BB, 150 mg/kg BB, 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, 1200 mg/kg BB.

Perhitungan dosis ekstrak dengan asumsi rata-rata berat badan tikus adalah 150 gram, terdapat 4 ekor tikus dalam tiap kelompok serta tiap ekor tikus disonde dengan ekstrak sebanyak 1 mL adalah sebagai berikut

- Jumlah sediaan Ekstrak Pegagan adalah 10 g pasta
- Konsentrasi Ekstrak 100 mg/ml
- **Kelompok P1 (Dosis terapi 75mg/kg)**  
 Berat ekstrak daun pegagan = Dosis pemberian x BB x Jumlah tikus  
 = 75 mg/kg x 150 g x 4  
 =  $\frac{75 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 600 \text{ g}$   
 = 45 mg  
 Volume Pemberian = 1 mL  
 Perhitungan = 45 mg + 5 mL air



➤ **Kelompok P2 (Dosis terapi 150 mg/kg)**

$$\begin{aligned} \text{Berat ekstrak daun pegagan} &= \text{Dosis pemberian} \times \text{BB} \times \text{Jumlah tikus} \\ &= 150 \text{ mg/kg} \times 150 \text{ g} \times 4 \\ &= \frac{150 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 600 \text{ g} \\ &= 90 \text{ mg} \\ \text{Volume Pemberian} &= 1 \text{ mL} \\ \text{Perhitungan} &= 90 \text{ mg} + 5 \text{ mL air} \end{aligned}$$

➤ **Kelompok P3 (Dosis terapi 300 mg/kg)**

$$\begin{aligned} \text{Berat ekstrak daun pegagan} &= \text{Dosis pemberian} \times \text{BB} \times \text{Jumlah tikus} \\ &= 300 \text{ mg/kg} \times 150 \text{ g} \times 4 \\ &= \frac{300 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 600 \text{ g} \\ &= 180 \text{ mg} \\ \text{Volume Pemberian} &= 1 \text{ mL} \\ \text{Perhitungan} &= 180 \text{ mg} + 5 \text{ mL air} \end{aligned}$$

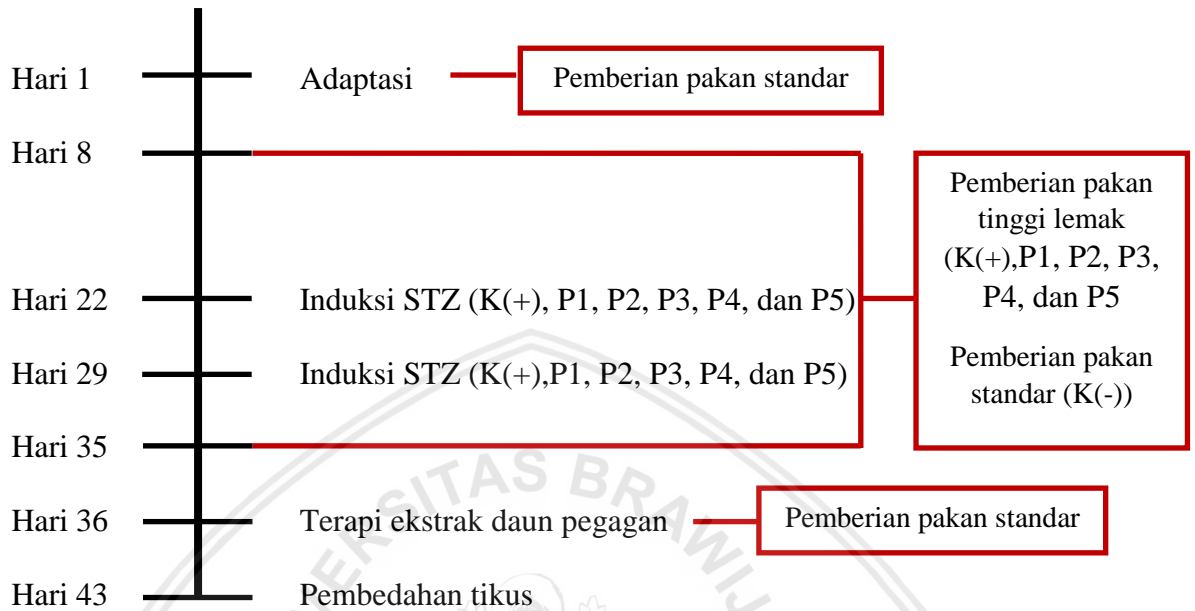
➤ **Kelompok P4 (Dosis terapi 600 mg/kg)**

$$\begin{aligned} \text{Berat ekstrak daun pegagan} &= \text{Dosis pemberian} \times \text{BB} \times \text{Jumlah tikus} \\ &= 600 \text{ mg/kg} \times 150 \text{ g} \times 4 \\ &= \frac{600 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 600 \text{ g} \\ &= 360 \text{ mg} \\ \text{Volume Pemberian} &= 2 \text{ mL} \\ \text{Perhitungan} &= 360 \text{ mg} + 10 \text{ mL air} \end{aligned}$$

➤ **Kelompok P5 (Dosis terapi 1200 mg/kg)**

$$\begin{aligned} \text{Berat ekstrak daun pegagan} &= \text{Dosis pemberian} \times \text{BB} \times \text{Jumlah tikus} \\ &= 1200 \text{ mg/kg} \times 150 \text{ g} \times 4 \\ &= \frac{1200 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 600 \text{ g} \\ &= 720 \text{ mg} \\ \text{Volume Pemberian} &= 2 \text{ mL} \\ \text{Perhitungan} &= 720 \text{ mg} + 10 \text{ mL air} \end{aligned}$$

### Lampiran 7. Rancangan Perlakuan



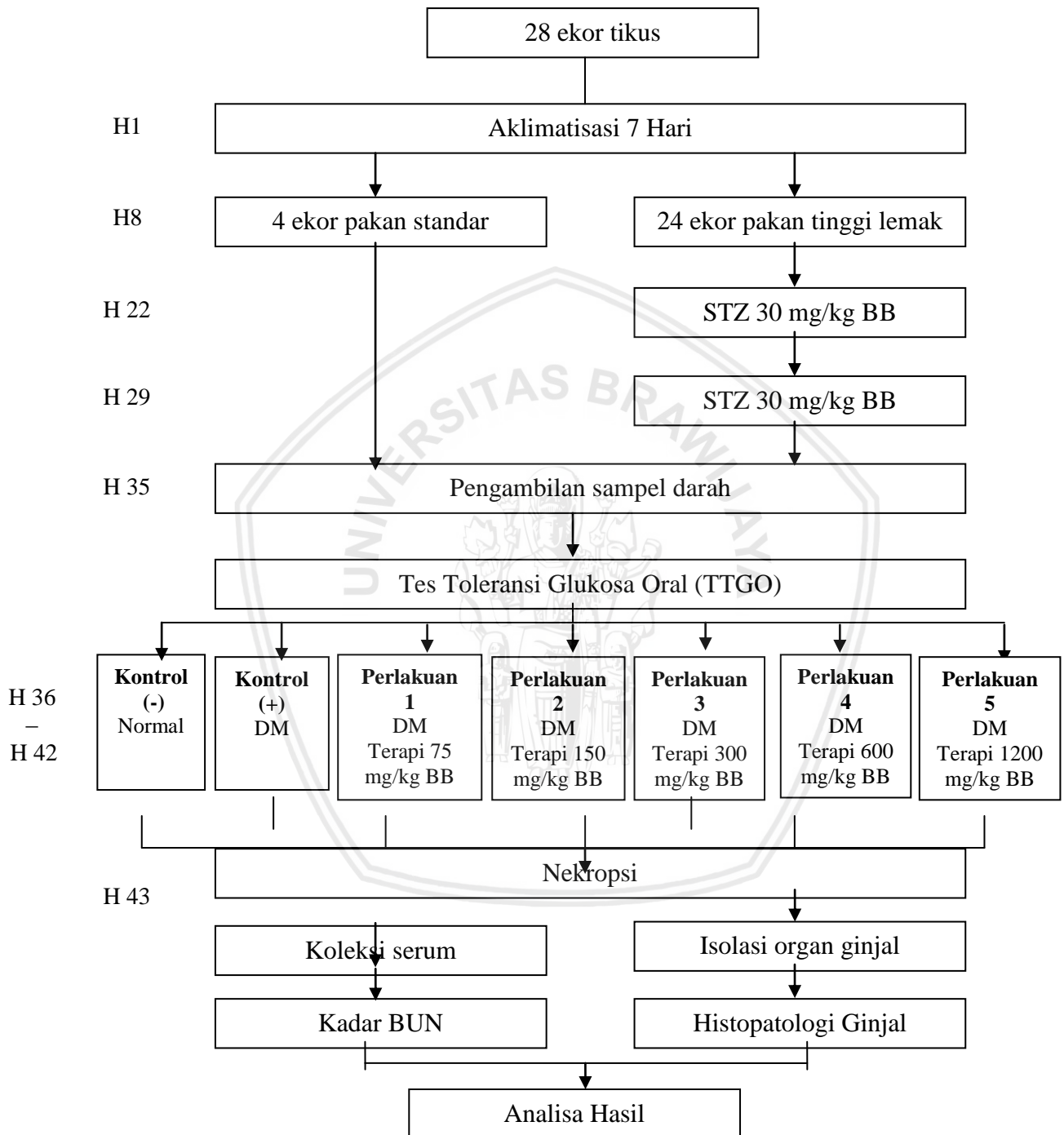
#### Keterangan :

1. Induksi pakan tinggi lemak diberikan sebanyak 40 g/ekor/hari dengan sediaan padat dan pakan standar diberikan sebanyak 40 g/ekor/hari dengan sediaan pellet.
2. Induksi STZ dilakukan secara intraperitoneal dengan dosis 30 mg/kg BB dengan pelarut buffer sitrat pada kelompok kontrol positif (K+), kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), kelompok perlakuan 3 (P3) kelompok perlakuan 4 (P4), dan kelompok perlakuan 5 (P5)
3. Pada hari ke 36 hingga hari ke 42 dilakukan terapi daun pegagan dengan dosis 75 mg/kg BB pada kelompok perlakuan 1 (P1), 150 mg/kg BB pada kelompok perlakuan 2 (P2), 300 mg/kg BB pada kelompok perlakuan 3 (P3), 600 mg/kg BB pada kelompok perlakuan 4 (P4), dan 1200 mg/kg BB pada kelompok perlakuan 5 (P5).

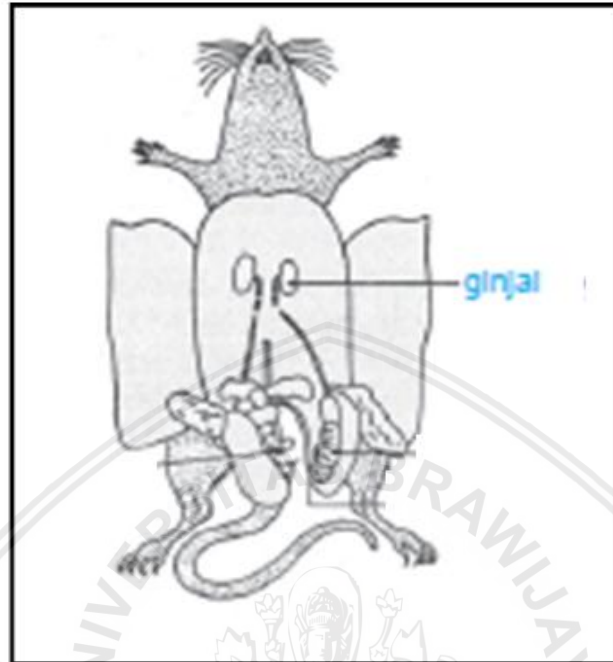
4. Pada hari ke 43 dilakukan pembedahan pada semua kelompok untuk mengisolasi organ ginjal guna mengukur kadar BUN dan mengetahui perubahan histopatologi ginjal.



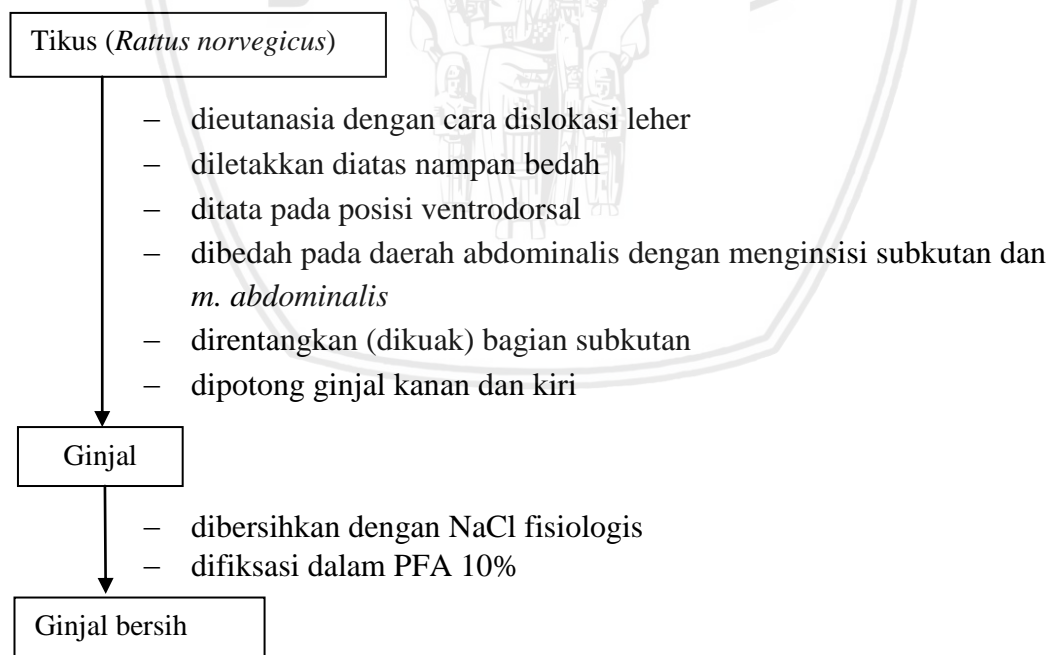
### Lampiran 8. Kerangka operasional



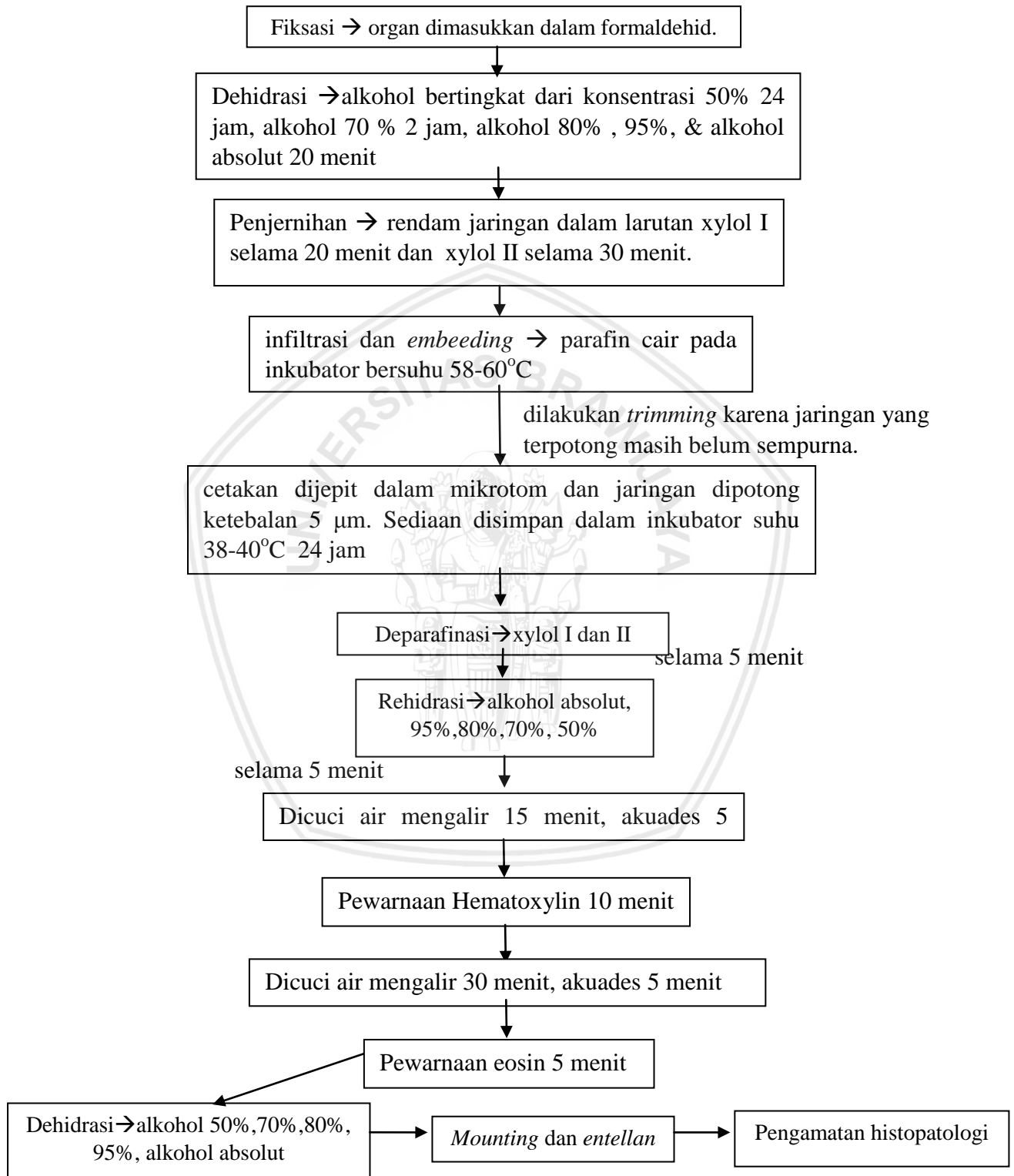
## Lampiran 9. Anatomi Tikus



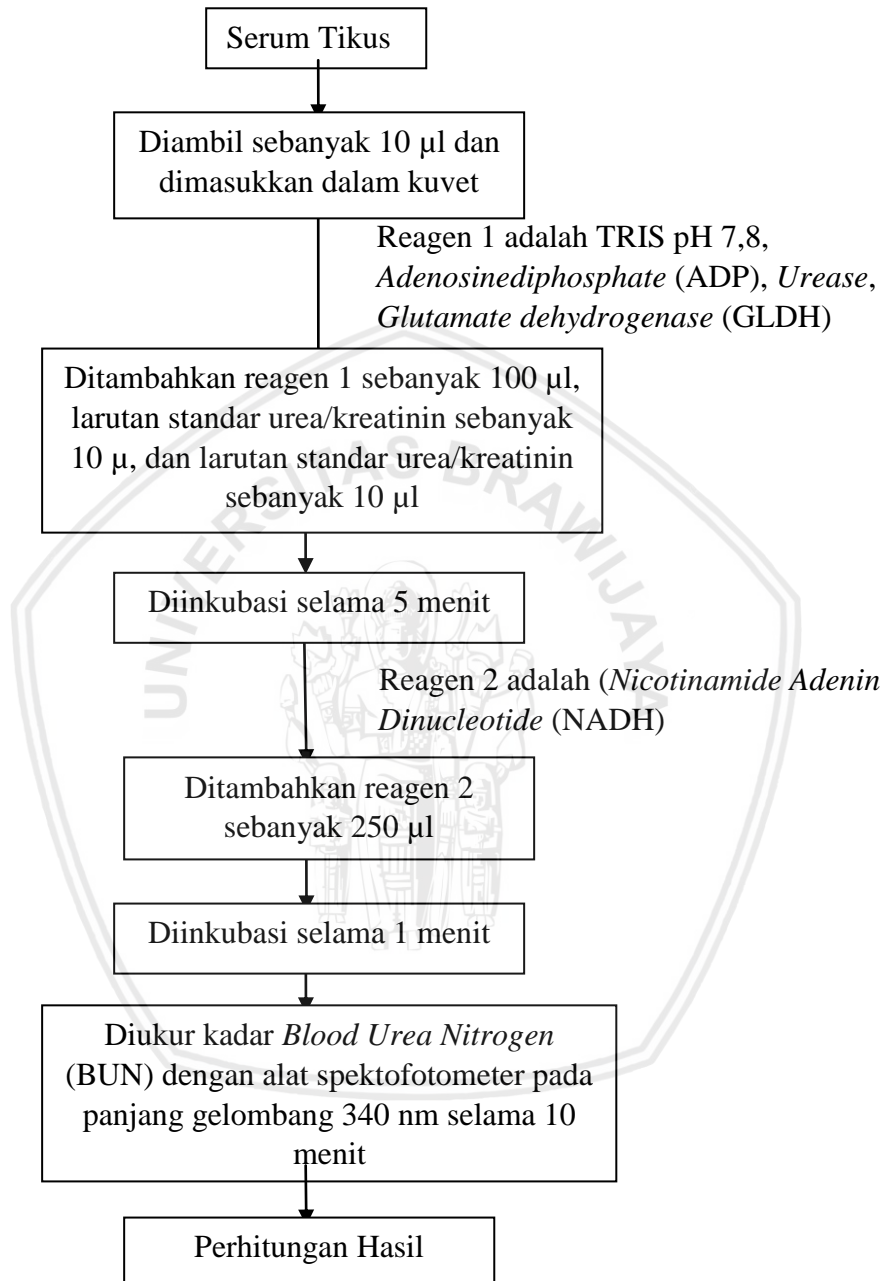
### 7.1 Pengambilan Organ Ginjal pada Hewan Coba



### Lampiran 10. Metode pembuatan preparat HE





**Lampiran 11. Metode Pengukuran Kadar BUN**

## Lampiran 12. Hasil Tes Glukosa

### 12.1 Sebelum Induksi Pakan Tinggi Lemak dan STZ

Perlakuan	Ulangan				Rata rata
	1	2	3	4	
P1	119	122	129	123	123.25
P2	110	119	100	121	112.5
P3	110	118	127	97	113
P4	116	119	108	125	117
P5	131	128	111	100	117.5
K -	106	120	123	119	117
K +	116	129	115	128	122

### 12.2 Setelah Induksi Pakan Tinggi Lemak dan STZ

Perlakuan	Ulangan				Rata-Rata
	1	2	3	4	
P1	227	359	225	221	255.5
P2	369	334	210	209	280.5
P3	358	345	275	479	364.25
P4	233	186	243	217	219.75
P5	238	312	254	273	269.25
K -	82	77	108	98	91.25
K +	294	239	473	378	346

### 12.3 Setelah Terapi Ekstrak Pegagan

Perlakuan	Ulangan				Rata-rata
	1	2	3	4	
P1	167	181	149	151	162
P2	178	164	158	138	159.5
P3	185	117	169	197	182
P4	156	144	178	173	186.5
P5	154	130	127	161	190.25
K -	93	109	87	94	95.75
K +	206	376	425	348	338.75

### Lampiran 13. Uji Statistika Kadar BUN

Perlakuan	Ulangan				Jumlah	Rata-rata
	1	2	3	4		
P1	17.30	26.20	18.50	25.80	87.80	21.95
P2	15.20	17.50	19.70	20.10	72.50	18.13
P3	22.20	23.40	22.80	20.30	88.70	22.18
P4	19.50	12.80	29.50	12.60	74.40	18.60
P5	18.40	16.70	24.10	21.60	80.80	20.20
K-	13.90	14.40	21.40	21.10	70.8	17.7
K+	33.50	28.10	29.30	25.90	116.8	29.2
Jumlah	140.0	139.1	165.3	147.4	591.8	21.1

#### 13. 1 Uji Normalitas

##### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Perlakuan	BUN
N		28	28
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	4.0000	21.1357
	Std. Deviation	2.03670	5.34043
Most Extreme Differences	Absolute	.123	.073
	Positive	.123	.073
	Negative	-.123	-.059
Kolmogorov-Smirnov Z		.649	.384
Asymp. Sig. (2-tailed)		.793	.999
a. Test distribution is Normal.			

## 13.2 Uji Desciptif

**Descriptives**

BUN	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					K+	4		
K-	4	17.7000	4.10609	2.05305	11.1663	24.2337	13.90	21.40
P1	4	21.9500	4.70496	2.35248	14.4634	29.4366	17.30	26.20
P2	4	18.1250	2.26035	1.13017	14.5283	21.7217	15.20	20.10
P3	4	22.1750	1.34257	.67129	20.0387	24.3113	20.30	23.40
P4	4	18.6000	7.94271	3.97136	5.9614	31.2386	12.60	29.50
P5	4	20.2000	3.29949	1.64975	14.9498	25.4502	16.70	24.10
Total	28	21.1357	5.34043	1.00925	19.0649	23.2065	12.60	33.50

## 13.3 Uji Homogenitas

**Test of Homogeneity of Variances**

BUN			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.201	6	21	.022

## 13.4 Uji ANOVA

**ANOVA**

BUN					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	379.799	6	63.300	3.406	.017
Within Groups	390.245	21	18.583		
Total	770.044	27			

## Multiple Comparisons

BUN

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K+	K-	11.5000*	3.04820	.016	1.5909	21.4091
	P1	7.25000	3.04820	.256	-2.6591	17.1591
	P2	11.0750*	3.04820	.022	1.1659	20.9841
	P3	7.02500	3.04820	.287	-2.8841	16.9341
	P4	10.6000*	3.04820	.031	.6909	20.5091
	P5	9.00000	3.04820	.091	-.9091	18.9091
K-	K+	-11.5000*	3.04820	.016	-21.4091	-1.5909
	P1	-4.25000	3.04820	.799	-14.1591	5.6591
	P2	-.42500	3.04820	1.000	-10.3341	9.4841
	P3	-4.47500	3.04820	.760	-14.3841	5.4341
	P4	-.90000	3.04820	1.000	-10.8091	9.0091
	P5	-2.50000	3.04820	.980	-12.4091	7.4091
P1	K+	-7.25000	3.04820	.256	-17.1591	2.6591
	K-	4.25000	3.04820	.799	-5.6591	14.1591
	P2	3.82500	3.04820	.864	-6.0841	13.7341
	P3	-.22500	3.04820	1.000	-10.1341	9.6841
	P4	3.35000	3.04820	.921	-6.5591	13.2591
	P5	1.75000	3.04820	.997	-8.1591	11.6591
P2	K+	-11.0750*	3.04820	.022	-20.9841	-1.1659
	K-	.42500	3.04820	1.000	-9.4841	10.3341
	P1	-3.82500	3.04820	.864	-13.7341	6.0841
	P3	-4.05000	3.04820	.831	-13.9591	5.8591
	P4	-.47500	3.04820	1.000	-10.3841	9.4341
	P5	-2.07500	3.04820	.992	-11.9841	7.8341
P3	K+	-7.02500	3.04820	.287	-16.9341	2.8841
	K-	4.47500	3.04820	.760	-5.4341	14.3841

P1		.22500	3.04820	1.000	-9.6841	10.1341
P2		4.05000	3.04820	.831	-5.8591	13.9591
P4		3.57500	3.04820	.897	-6.3341	13.4841
P5		1.97500	3.04820	.994	-7.9341	11.8841
P4	K+	-10.60000*	3.04820	.031	-20.5091	-.6909
	K-	.90000	3.04820	1.000	-9.0091	10.8091
	P1	-3.35000	3.04820	.921	-13.2591	6.5591
	P2	.47500	3.04820	1.000	-9.4341	10.3841
	P3	-3.57500	3.04820	.897	-13.4841	6.3341
	P5	-1.60000	3.04820	.998	-11.5091	8.3091
P5	K+	-9.00000	3.04820	.091	-18.9091	.9091
	K-	2.50000	3.04820	.980	-7.4091	12.4091
	P1	-1.75000	3.04820	.997	-11.6591	8.1591
	P2	2.07500	3.04820	.992	-7.8341	11.9841
	P3	-1.97500	3.04820	.994	-11.8841	7.9341
	P4	1.60000	3.04820	.998	-8.3091	11.5091

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

### 13.5 Tukey Test

BUN

TukeyHSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
K-	4	17.7000	
P2	4	18.1250	
P4	4	18.6000	
P5	4	20.2000	20.2000
P1	4	21.9500	21.9500
P3	4	22.1750	22.1750
K+	4		29.2000
Sig.		.760	.091

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



## 14. Uji Statistik Kadar Glukosa

### 14.1 Uji Normalitas

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		28
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	,0000000
	Std. Deviation	67,91948821
Most Extreme Differences	Absolute	,214
	Positive	,214
	Negative	-,192
Test Statistic		,214
Asymp. Sig. (2-tailed)		,002 <sup>c</sup>

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

### 14.2 Uji Deskriptif

#### Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean	Std. Deviation	Variance
PERLAKUAN	28	1,00	7,00	112,00	4,0000	2,03670	4,148
KADARGLUKOSA	28	87,00	425,00	5359,00	191,3929	75,74633	5737,507
Valid N (listwise)	28						

### 14.3 Uji Homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variances

KADARGLUKOSA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,502	6	21	,015

## 14.5 Uji ANOVA

## ANOVA

KADARGLUKOSA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	114796,429	6	19132,738	10,016	,000
Within Groups	40116,250	21	1910,298		
Total	154912,679	27			

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

(I) PERLAKUAN	(J) PERLAKUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
P1	P2	2,50000	30,90548	1,000	-97,9670	102,9670
	P3	-20,00000	30,90548	,994	-120,4670	80,4670
	P4	-24,50000	30,90548	,983	-124,9670	75,9670
	P5	-28,25000	30,90548	,966	-128,7170	72,2170
	K-	41,25000	30,90548	,828	-59,2170	141,7170
	P+	-176,75000*	30,90548	,000	-277,2170	-76,2830
P2	P1	-2,50000	30,90548	1,000	-102,9670	97,9670
	P3	-22,50000	30,90548	,989	-122,9670	77,9670
	P4	-27,00000	30,90548	,973	-127,4670	73,4670
	P5	-30,75000	30,90548	,950	-131,2170	69,7170
	K-	38,75000	30,90548	,865	-61,7170	139,2170
	P+	-179,25000*	30,90548	,000	-279,7170	-78,7830
P3	P1	20,00000	30,90548	,994	-80,4670	120,4670
	P2	22,50000	30,90548	,989	-77,9670	122,9670
	P4	-4,50000	30,90548	1,000	-104,9670	95,9670
	P5	-8,25000	30,90548	1,000	-108,7170	92,2170
	K-	61,25000	30,90548	,454	-39,2170	161,7170
	P+	-156,75000*	30,90548	,001	-257,2170	-56,2830
P4	P1	24,50000	30,90548	,983	-75,9670	124,9670
	P2	27,00000	30,90548	,973	-73,4670	127,4670
	P3	4,50000	30,90548	1,000	-95,9670	104,9670
	P5	-3,75000	30,90548	1,000	-104,2170	96,7170
	K-	65,75000	30,90548	,373	-34,7170	166,2170
	P+	-152,25000*	30,90548	,001	-252,7170	-51,7830

P5	P1	28,25000	30,90548	,966	-72,2170	128,7170
	P2	30,75000	30,90548	,950	-69,7170	131,2170
	P3	8,25000	30,90548	1,000	-92,2170	108,7170
	P4	3,75000	30,90548	1,000	-96,7170	104,2170
	K-	69,50000	30,90548	,313	-30,9670	169,9670
	P+	-148,50000*	30,90548	,002	-248,9670	-48,0330
K-	P1	-41,25000	30,90548	,828	-141,7170	59,2170
	P2	-38,75000	30,90548	,865	-139,2170	61,7170
	P3	-61,25000	30,90548	,454	-161,7170	39,2170
	P4	-65,75000	30,90548	,373	-166,2170	34,7170
	P5	-69,50000	30,90548	,313	-169,9670	30,9670
	P+	-218,00000*	30,90548	,000	-318,4670	-117,5330
P+	P1	176,75000*	30,90548	,000	76,2830	277,2170
	P2	179,25000*	30,90548	,000	78,7830	279,7170
	P3	156,75000*	30,90548	,001	56,2830	257,2170
	P4	152,25000*	30,90548	,001	51,7830	252,7170
	P5	148,50000*	30,90548	,002	48,0330	248,9670
	K-	218,00000*	30,90548	,000	117,5330	318,4670

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

#### 14.6 Uji Tukey

##### KADARGLUKOSA

Tukey HSD<sup>a</sup>

PERLAKUAN	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
K-	4	95,7500	
P2	4	159,5000	
P1	4	162,0000	
P3	4	182,0000	
P4	4	186,5000	
P5	4	190,2500	
P+	4		338,7500
Sig.		,313	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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