



**EFEK KANDUNGAN SERAT PADA BERAS ANALOG  
TERHADAP EKSPRESI GLUT4 OTOT RANGKA  
TIKUS WISTAR MODEL DIABETES**

**SKRIPSI**

Oleh

**Azka Darajat  
NIM 142010101085**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2017**



**EFEK KANDUNGAN SERAT PADA BERAS ANALOG  
TERHADAP EKSPRESI GLUT4 OTOT RANGKA  
TIKUS WISTAR MODEL DIABETES**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S-1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh:

**Azka Darajat  
NIM 142010101085**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2017**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah Subhanahu Wa Ta'ala atas rahmat dan hidayahnya yang telah diberikan kepada saya;
2. Nabi Muhammad Shallallahu 'Alaihi Wa Sallam beserta keluarga serta sahabatnya yang telah memberikan pedoman kepada saya berupa agama Islam;
3. Ayahanda Hidayat dan Ibunda Ulfah yang telah memberikan do'anya, dukungan, pengorbanan, kasih sayang dan didikannya kepada saya;
4. Guru-guru sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi;
5. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

**MOTO**

Dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkanku.  
(terjemahan surat *Asy Syu'ara* ayat 80)<sup>\*)</sup>



---

<sup>\*)</sup> Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. *Al Qur'an dan Terjemahannya*. Semarang: PT Kumudasmoro Grafindo

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Azka Darajat

NIM :142010101085

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Efek Kandungan Serat Pada Beras Analog Terhadap Ekspresi GLUT4 Otot Rangka Tikus Wistar Model Diabetes” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 19 Desember 2017

Yang menyatakan,

Azka Darajat  
NIM 142010101085

**SKRIPSI**

**EFEK KANDUNGAN SERAT PADA BERAS ANALOG  
TERHADAP EKSPRESI GLUT4 OTOT RANGKA  
TIKUS WISTAR MODEL DIABETES**

Oleh

Azka Darajat  
NIM 142010101085

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Hairrudin, M.Kes.

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Efek Kandungan Serat Pada Beras Analog Terhadap Ekspresi GLUT4 Otot Rangka Tikus Wistar Model Diabetes” karya Azka Darajat telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Jumat, 22 Desember 2017

Tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

dr. Ancah Caesarina Novi M., Ph.D.  
NIP 198203092008122002

Anggota II,

dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si.  
NIP 198409162008012003

Anggota I,

dr. Ayu Munawaroh Aziz, M.Biomed  
NIP 198903132014042002

Anggota III,

dr. Hairrudin, M.Kes.  
NIP 197510112003121008

Mengesahkan  
Dekan,

dr. Enny Suswati, M.Kes  
NIP 197002141999032001

## RINGKASAN

**Efek Kandungan Serat Pada Beras Analog Terhadap Ekspresi GLUT4 Otot Rangka Tikus Wistar Model Diabetes;** Azka Darajat; NIM 142010101085; 2017: 77 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

*Diabetes mellitus* (DM) merupakan penyakit metabolik akibat kelainan sekresi insulin, kerja insulin, atau kedua-duanya sehingga menimbulkan hiperglikemia. Sekitar 5,2 juta Penduduk Indonesia yang berusia di atas 15 tahun terdiagnosis DM pada tahun 2013 dan diperkirakan mencapai 14,2 juta pada tahun 2035. *Diabetes mellitus* diklasifikasikan menjadi diabetes tipe 1, tipe 2, gestasional, dan tipe lain. Sebanyak 90-95% kejadian DM merupakan DM tipe 2 yang disebabkan oleh resistensi insulin disertai defisiensi *insulin*. Salah satu penyebab terjadinya resistensi insulin adalah akibat peningkatan oksidasi asam lemak yang mengakibatkan gangguan pada *glucose transporter 4* (GLUT 4). Produk oksidasi dari asam lemak mengakibatkan gangguan sinyal *insulin* lewat fosforilasi *Ser/Thr insulin receptor substrate* sehingga terjadi penurunan translokasi GLUT4 dari sitoplasma ke membran sel.

Beras analog adalah bahan pangan olahan yang bisa dibuat dari sebagian atau seluruh bahan non-beras sehingga komposisi beras analog dapat ditentukan sesuai kebutuhan. Komposisi yang dapat ditambahkan salah satunya adalah serat. Serat yang dikonsumsi akan difermentasi oleh mikrobiota usus di usus besar menjadi *short chain fatty acid* (SCFA). SCFA juga memiliki efek meningkatkan sekresi *Glucagon like peptide-1* (GLP-1). *Glucagon like peptide-1* memiliki efek meningkatkan ekspresi GLUT4.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek kandungan serat pada beras analog terhadap ekspresi GLUT 4 otot rangka tikus wistar model diabetes. Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental sungguhan (*true experiment*) dengan rancangan penelitian *post test only control group design* (Notoatmodjo, 2012). Sampel penelitian sebanyak 24 ekor tikus wistar jantan yang dibagi menjadi satu kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan. Kelompok

kontrol diberikan pakan standar. Kelompok PBA1 dan PBA2 diberikan pakan beras analog dengan komposisi yang berbeda. Kelompok PB diberikan pakan beras biasa.

Data ekspresi GLUT4 dianalisis uji *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antar kelompok dan didapatkan nilai signifikansi  $p=0,003$ . Uji *Mann Whitney* dilakukan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda signifikan, dari hasil uji *Mann Whitney* didapatkan kelompok PBA1, PBA2, dan KO berbeda signifikan dibandingkan kelompok PB. Tidak ada perbedaan signifikan antara kelompok PBA1 dan PBA2 terhadap kelompok KO. Tidak ada perbedaan signifikan antara kelompok PBA1 dan PBA2.

Diet tinggi lemak dan *Streptozotosin* dosis rendah menyebabkan tikus menjadi diabetes. Kelompok PBA1 dan PBA2 yang diberikan pakan BA1 dan BA2 dengan kandungan serat 1,77% dan 1,06% memiliki perbedaan signifikan dengan kelompok PB yang diberi pakan beras biasa dengan kandungan serat 0,4%. Hal ini menunjukkan bahwa BA1 dan BA2 mampu meningkatkan ekspresi GLUT4 dibandingkan beras biasa. Tidak ada perbedaan yang signifikan antara PBA1 dan PBA2 menunjukkan bahwa kandungan serat 1,77% dan 1,06% belum mampu memberikan efek peningkatan ekspresi GLUT4 yang berbeda.

Keterbatasan dalam penelitian adalah kandungan serat masih tergolong rendah pada beras analog dan tidak dilakukan pemeriksaan SCFA dan GLP-1. Perlu dilakukan peningkatan kandungan serat pada beras analog agar mencapai 3% dengan penambahan *sodium alginate*. Perlu dilakukan penelitian untuk melihat efek kandungan serat pada beras analog terhadap SCFA dan GLP-1.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Kandungan Serat Pada Beras Analog Terhadap Ekspresi GLUT4 Otot Rangka Tikus Wistar Model Diabetes”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Ida Srisurani Wiji Astuti, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing saya selama penulis menjadi mahasiswa;
3. dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si. selaku Dosen Pembimbing I dan dr. Hairrudin, M.Kes. selaku Dosen Pembimbing II yang telah banyak membantu penulisan skripsi ini sejak awal hingga akhir;
4. Ayah, Ibu dan adikku tercinta yang sudah memberikan banyak doa, kasih sayang, dan motivasi untuk menyelesaikan penulisan ini;
5. Keluarga Besar IMSAC FK UNEJ, TBM Vertex, SRCR, CIMSA, dan ELIXIR yang sudah mewarnai semua hari-hari saya selama menjadi mahasiswa;
6. Analis dan civitas Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
7. Ustad dan teman-teman Pesona Tahfizh yang sudah memberikan semangatnya dalam menyelesaikan karya tulis ini;
8. Sahabat-sahabat saya Fuad Adi Prasetyo, I Nyoman Kurniawan Agratama, Ferdian Nugroho, Sri Weli, Akbar Maulida, Ahmad Ma'ruf Fauzi, Bagus Aditya, Ahmad Syahrin, Prajesiaji Praba, Fikri Udin, Rosyid Ridho, dan Samuel Sampe yang sudah banyak memberikan dukungannya dan motivasinya untuk segera menyelesaikan penelitian ini;
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 22 Desember 2017

Penulis



**DAFTAR ISI**

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vi
<b>PRAKATA</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	vi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan</b> .....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
<b>1.4 Manfaat</b> .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1 Diabetes Mellitus</b> .....	4
2.1.1 Definisi .....	4
2.1.2 Klasifikasi.....	4
2.1.3 Patofisiologi.....	5
2.1.4 Gejala.....	6
2.1.5 Diagnosis .....	6
2.1.6 Penatalaksanaan.....	7
2.1.7 Komplikasi .....	9
<b>2.2 Resistensi Insulin</b> .....	10
<b>2.3 GLUT</b> .....	11
<b>2.4 Beras Analog</b> .....	13

2.5 Serat Makanan.....	14
2.5 Immunohistochemistry .....	15
2.6 Kerangka Teori.....	17
2.7 Kerangka Konsep .....	18
2.8 Hipotesis .....	18
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>19</b>
3.1 Jenis Penelitian .....	19
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....	19
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian .....	19
3.3.1 Populasi .....	19
3.3.2 Sampel Penelitian .....	19
3.3.3 Besar Sampel .....	20
3.4 Variabel Penelitian .....	20
3.4.1 Variabel Bebas.....	20
3.4.2 Variabel Terikat.....	20
3.4.3 Variabel Terkendali .....	20
3.5 Definisi Operasional .....	21
3.6 Rancangan Penelitian.....	22
3.7 Alat dan Bahan Penelitian .....	23
3.7.1 Alat.....	23
3.7.2 Bahan .....	23
3.8 Prosedur Penelitian .....	24
3.8.1 Pemilihan Sampel Tikus.....	24
3.8.2 Persiapan Sampel Tikus .....	24
3.8.3 Tahap Perlakuan .....	24
3.8.4 Pengambilan Otot Rangka.....	25
3.8.5 Pembuatan Preparat IHC .....	25
3.8.6 Pengamatan Preparat IHC .....	26
3.9 Analisis Data.....	26
3.10 Alur Kerja Penelitian .....	27
3.11 Uji Kelayakan Etik .....	27

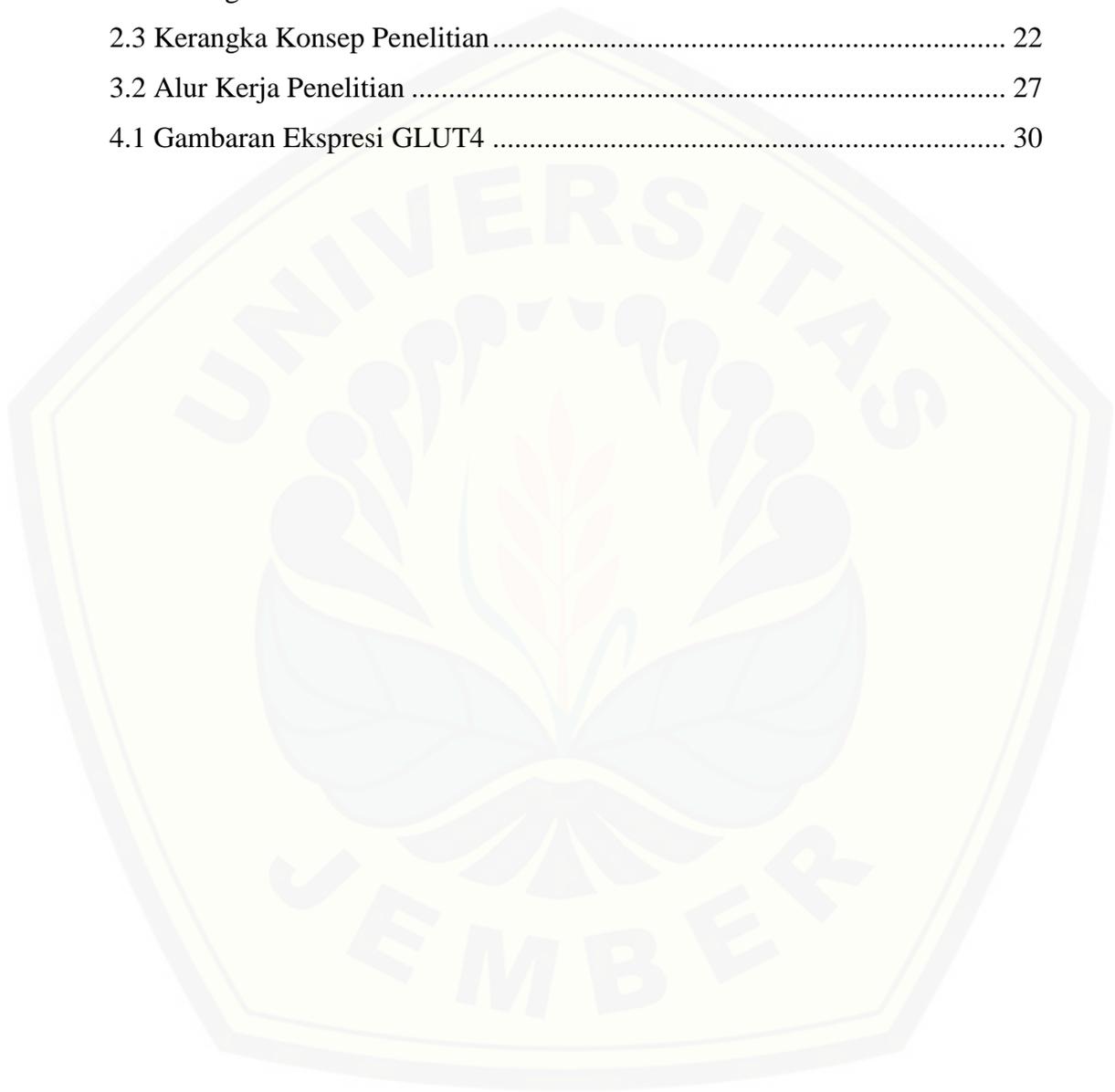
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	28
<b>4.1 Hasil</b> .....	28
4.1.1 Hasil Rata-Rata GDP.....	28
4.1.2 Hasil Pengukuran Kandungan Serat.....	28
4.1.3 Hasil Gambaran Mikroskopis GLUT4 Otot Rangka.....	28
4.1.4 Hasil Statistik.....	30
<b>4.2 Pembahasan</b> .....	33
<b>BAB 5. PENUTUP</b> .....	38
<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	38
<b>5.2 Saran</b> .....	38
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	39
<b>LAMPIRAN</b> .....	44

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Tempat ekspresi protein GLUT .....	11
2.2 <i>Allred Score</i> .....	16
2.3 Skor IRS .....	16
3.1 Definisi Operasional .....	21
4.1 Hasil Rata-Rata GDP .....	28
4.2 Hasil Pengukuran Kandungan Serat .....	28
4.3 Hasil Rata-Rata <i>Intake</i> Makanan .....	29
4.4 Hasil Pengukuran IRS .....	29
4.5 Hasil Uji <i>Shapiro-Wilk</i> .....	30
4.6 Hasil Uji <i>Levene's Test</i> .....	31
4.7 Hasil Uji <i>Indepentdent-sample T Test</i> .....	31
4.8 Hasil Uji Kruskal Wallis <i>Intake</i> Makanan .....	31
4.9 Hasil Uji Mann Whitney <i>Intake</i> Makanan .....	32
4.10 Hasil Uji Kruskal Wallis Ekspresi GLUT4 .....	32
4.11 Hasil Uji Mann Whitney Ekspresi GLUT4.....	32
4.12 Hasil Uji Korelasi Spearman Ekspresi GLUT4 .....	33

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Mekanisme pensinyalan dari jalur insulin dan kontraksi otot .....	12
2.2 Kerangka Teori Penelitian .....	17
2.3 Kerangka Konsep Penelitian .....	22
3.2 Alur Kerja Penelitian .....	27
4.1 Gambaran Ekspresi GLUT4 .....	30



**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
3.1 Susunan Diet Standar Formula ITB per 10 kg.....	43
3.3 Komposisi Beras Analog .....	44
4.1 Metode Pengukuran Kandungan Serat .....	45
Lampiran A. <i>Ethical Clearence</i> .....	46
Lampiran B. Perhitungan Dosis STZ.....	48
Lampiran C. Dokumentasi Penelitian .....	49
Lampiran D. Data Penelitian.....	50
Lampiran E. Analisis Data .....	53

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Diabetes mellitus* (DM) merupakan penyakit metabolik akibat kelainan sekresi insulin, kerja insulin, atau kedua-duanya sehingga menimbulkan hiperglikemia (Soelistijo *et al.*, 2015). Prevalensi DM di dunia sudah mencapai 381 juta pada tahun 2013 dan diperkirakan mencapai 592 juta pada tahun 2035. Sekitar 5,2 juta penduduk Indonesia yang berusia di atas 15 tahun terdiagnosis DM pada tahun 2013 dan diperkirakan mencapai 14,2 juta pada tahun 2035 (Guariguata *et al.*, 2013; Kemenkes RI, 2013).

*Diabetes mellitus* diklasifikasikan menjadi diabetes tipe 1, tipe 2, gestasional, dan tipe lain. Sebanyak 90-95% kejadian DM merupakan DM tipe 2 yang disebabkan oleh resistensi insulin disertai defisiensi *insulin*. Penderita DM tipe 2 mengalami kelebihan berat badan atau obesitas yang dapat menjadi sebab terjadinya resistensi *insulin* (ADA, 2017). Salah satu penyebab terjadinya resistensi insulin adalah akibat peningkatan oksidasi asam lemak yang mengakibatkan gangguan pada *glucose transporter 4* (GLUT 4). Produk oksidasi dari asam lemak mengakibatkan gangguan sinyal *insulin* lewat fosforilasi *Ser/Thr insulin receptor substrate* sehingga terjadi penurunan translokasi GLUT4 dari sitoplasma ke membran sel (Morino *et al.*, 2006).

Penatalaksanaan DM bertujuan untuk mengendalikan kadar glukosa darah serta mengeliminasi gejala akibat hiperglikemia, mengurangi komplikasi, dan memperbaiki gaya hidup (Powers, 2015). Penatalaksanaan DM terdiri dari terapi nutrisi medis (TNM), aktivitas fisik, dan intervensi farmakologis. Terapi nutrisi medis dilakukan dengan cara pengaturan jumlah karbohidrat, lemak, protein, serat, dan natrium yang dikonsumsi (Soelistijo *et al.*, 2015). Individu yang menderita DM diharuskan mendapatkan terapi nutrisi medis. Tujuan dari pemberian TNM sendiri adalah menjaga berat badan, kadar glukosa darah, tekanan darah, kadar lemak darah, dan mencegah komplikasi (ADA, 2017).

Masyarakat Indonesia memiliki kebiasaan mengonsumsi beras sebagai bahan pangan pokok (Tarigan, 2003). Jumlah konsumsi beras di Indonesia sebesar

139 kg/kapita/tahun. Jumlah ini lebih tinggi dari pada negara-negara di Asia Tenggara (Budi *et al.*, 2015). Beras sendiri merupakan bahan pangan yang dapat meningkatkan kadar glukosa darah setelah makan dengan cepat (Arif *et al.*, 2013). Beras analog adalah bahan pangan olahan yang bisa dibuat dari sebagian atau seluruh bahan non-beras sehingga komposisi beras analog dapat ditentukan sesuai kebutuhan. Komposisi yang dapat ditambahkan salah satunya adalah serat. (Noviasari *et al.*, 2015). Pada penelitian yang dilakukan oleh Fitriani (2013) menunjukkan penambahan tepung mocaf dan tepung jagung dapat meningkatkan kandungan serat beras analog dibandingkan dengan beras biasa.

Serat yang dikonsumsi akan difermentasi oleh mikrobiota usus di usus besar menjadi *short chain fatty acid* (SCFA). *Short chain fatty acid* memiliki karakteristik mengandung kurang dari enam karbon. Sekitar 90-95% SCFA yang ada di usus besar merupakan asam asetat, asam propionat, dan asam butirat. Sel kolon menyerap 95% SCFA yang diproduksi dan sebanyak 5% sisanya dibuang lewat *feces* (Covián *et al.*, 2016). *Short chain fatty acid* memiliki efek menginaktivasi *hormone-sensitive lipase* (HSL) sehingga lipolisis di sel adiposa menurun. Penurunan lipolisis mengakibatkan penurunan asam lemak bebas di plasma darah sehingga sensitivitas insulin meningkat. SCFA juga memiliki efek meningkatkan sekresi *Glucagon like peptide-1* (GLP-1) (Besten *et al.*, 2013). *Glucagon like peptide-1* memiliki efek meningkatkan ekspresi GLUT4 (Peñacarrillo *et al.*, 2001). *Glucagon like peptide-1* mengaktifasi *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) pada sel otot rangka yang mana meningkatkan ekspresi GLUT4 sehingga terjadi peningkatan pemasukan glukosa ke dalam sel otot rangka (Green *et al.*, 2012).

Otot rangka merupakan tempat utama penggunaan glukosa yang dikonsumsi. Pemindahan glukosa dari darah ke dalam sel otot rangka diperantarai oleh GLUT4. Gangguan pada aktivitas GLUT4 akan menghambat penggunaan glukosa di otot rangka yang mengakibatkan hiperglikemia, sehingga salah satu target terapi adalah dengan meningkatkan ekspresi GLUT4 guna menurunkan kadar glukosa darah (Ghani dan DeFronzo, 2010).

Berdasarkan latar belakang diatas, penulis tertarik untuk meneliti lebih lanjut efek kandungan serat pada beras analog terhadap ekspresi GLUT4 otot rangka tikus wistar model diabetes.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang masalah di atas, rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah terdapat efek kandungan serat pada beras analog terhadap ekspresi GLUT4 otot rangka tikus wistar model diabetes?

## **1.3 Tujuan**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui efek kandungan serat pada beras analog terhadap ekspresi GLUT 4 otot rangka tikus wistar model diabetes.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

Tujuan khusus penelitian ini adalah untuk mengetahui kandungan serat pada beras analog.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **a. Bagi Peneliti**

Dapat menambah kemampuan peneliti dalam penulisan karya ilmiah dan dapat meningkatkan wawasan peneliti dalam bidang DM, terapi nutrisi medis, dan efek kandungan serat pada beras analog.

### **b. Bagi Institusi**

Dapat dijadikan sebagai data acuan untuk penelitian lebih lanjut mengenai efek kandungan serat pada beras analog terhadap ekspresi GLUT 4 otot rangka tikus wistar model diabetes.

### **c. Bagi Masyarakat**

Dapat dijadikan sebagai bahan pangan alternatif pengganti beras untuk penderita DM di masa mendatang.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Diabetes Mellitus (DM)

#### 2.1.1 Definisi

*Diabetes mellitus* adalah penyakit metabolik yang memiliki karakteristik hiperglikemia. Beberapa tipe berbeda dari diabetes disebabkan oleh interaksi yang kompleks antara faktor genetik dan lingkungan. Bergantung pada etiologi DM, faktor yang berkontribusi dalam timbulnya hiperglikemia terdiri dari berkurangnya sekresi insulin, penurunan penggunaan glukosa, dan peningkatan produksi glukosa. Gangguan metabolik terkait DM menyebabkan perubahan patofisiologi sekunder yang melibatkan banyak sistem organ sehingga membebani individu dan sistem kesehatan (Powers, 2015).

#### 2.1.2 Klasifikasi DM

*Diabetes mellitus* dapat diklasifikasikan kedalam beberapa kategori umum:

1. *Diabetes* tipe 1, disebabkan oleh destruksi sel  $\beta$  pankreas akibat autoimun serta mengarah ke defisiensi insulin absolut
2. *Diabetes* tipe 2, disebabkan oleh penurunan sekresi insulin secara progresif diiringi resistensi insulin
3. *Diabetes Gestasional*, *diabetes* yang terdiagnosa pada trisemester kedua atau ketiga kehamilan yang sebelum gestasi tidak jelas terdiagnosis *diabetes*
4. *Diabetes* tipe lain

*Diabetes mellitus* tipe 1 dan tipe 2 keduanya diawali oleh fase abnormal homeostasis glukosa. *Diabetes mellitus* tipe 1 merupakan hasil dari defisiensi insulin absolut. *Diabetes mellitus* tipe 2 merupakan sekelompok gangguan yang berbeda-beda dengan karakteristik resistensi insulin, gangguan sekresi insulin, dan peningkatan produksi glukosa. *Diabetes mellitus* tipe 2 diawali oleh abnormalitas homeostasis glukosa puasa dan toleransi glukosa. Secara umum DM tipe 1 berkembang sebelum umur 30 tahun dikarenakan proses autoimun yang menyebabkan destruksi sel  $\beta$  pankreas dapat terjadi di semua umur. Hanya 5-10% individu yang memiliki DM setelah umur 30 tahun merupakan DM tipe 1.

Sedangkan DM tipe 2 lebih sering terdiagnosis seiring peningkatan umur terutama pada individu yang obesitas (ADA, 2017).

Intoleransi glukosa yang berkembang selama kehamilan diklasifikasikan sebagai DM *gestasional*. Resistensi insulin dihubungkan dengan perubahan metabolik pada akhir kehamilan dan peningkatan kebutuhan insulin. *American diabetic association* merekomendasikan bahwa DM yang terdiagnosis pada awal kunjungan prenatal merupakan DM bukan DM *gestasional* (Powers, 2015).

### 2.1.3 Patofisiologi

Pada DM tipe 1, sel alpha, sel delta, dan sel PP di pankreas terhindar dari destruksi akibat sistem imun, meskipun secara fungsional dan embriologi sama dengan sel beta pankreas serta mengekspresikan kebanyakan protein yang sama dengan sel beta pankreas. Secara patologis pulau di pankreas mengalami infiltrasi limfosit yang tidak terlalu tinggi. Setelah sel beta rusak, diperkirakan bahwa proses inflamasi berkurang dan pulau di pankreas menjadi atrofi. Sel  $\beta$  pankreas rentan terhadap efek toksik dari beberapa sitokin diantaranya *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), *interferon  $\gamma$* , dan interleukin 1 (IL-1). Mekanisme yang secara tepat menjelaskan tentang kematian sel  $\beta$  pankreas masih belum diketahui, tetapi banyak melibatkan pembentukan metabolit nitrat oksida, *apoptosis*, dan sitotoksitas sel T CD8+ secara langsung. Destruksi sel *islet* pankreas lebih disebabkan oleh sel T limfosit dibandingkan autoantibodi karena antibodi secara umum tidak bereaksi dengan permukaan sel *islet* pankreas.

Karakteristik yang dimiliki DM tipe 2 antara lain gangguan sekresi insulin, resistensi insulin, produksi berlebihan glukosa hepar, dan abnormalitas metabolisme lemak. Obesitas sering ditemukan pada individu yang terkena DM tipe 2, hampir 80% individu mengalami obesitas. Pada tahap awal kelainan toleransi glukosa masih mendekati normal meskipun terjadi resistensi insulin karena sel  $\beta$  pankreas dapat mengimbangi dengan peningkatan sekresi. Seiring dengan perkembangan resistensi insulin dan kompensasi hiperinsulinemia, sel  $\beta$  pankreas dari individu tertentu tidak dapat mengimbangi tahapan hiperinsulinemia. Gangguan toleransi glukosa ditandai dengan peningkatan glukosa *postprandial*.

Penurunan lebih lanjut pada sekresi insulin dan peningkatan pada produksi glukosa hati menyebabkan DM dengan hiperglikemia saat puasa. Pada Akhirnya terjadi kegagalan sel  $\beta$  pankreas (Powers, 2015).

#### 2.1.4 Gejala

Gejala pada DM dapat dibagi menjadi dua yaitu gejala khas dan gejala tidak khas. Gejala khas DM terdiri dari poliuria, polidipsia, polifagia, dan berat badan turun tanpa sebab yang jelas sedangkan gejala tidak khas DM diantaranya lemas, kesemutan, luka yang sulit sembuh, gatal, mata kabur, disfungsi ereksi pada pria, dan pruritus vagina pada wanita. (Purnamasari, 2014)

#### 2.1.5 Diagnosis

*Diabetes mellitus* dapat didiagnosis berdasarkan kriteria glukosa plasma darah, baik kadar glukosa puasa atau kadar glukosa plasma setelah pemberian glukosa oral sebanyak 75 gram atau menggunakan kriteria HbA1C. Kriteria diagnosis adalah sebagai berikut:

- a. Pemeriksaan glukosa plasma puasa  $\geq 126$  mg/dl, dimana puasa adalah kondisi tidak ada asupan kalori minimal 8 jam atau;
- b. Pemeriksaan glukosa plasma  $\geq 200$  mg/dl 2 jam setelah Tes Toleransi Glukosa Oral (TTGO), TTGO adalah pemeriksaan glukosa telah meminum 75 g glukosa anhydrous yang dilarutkan dalam air atau;
- c. Pemeriksaan glukosa plasma sewaktu  $\geq 200$  mg/dl dengan keluhan klasik atau;
- d. Pemeriksaan HbA1C  $\geq 6.5\%$  menggunakan metode HPLC yang terstandarisasi NGSP (ADA, 2017)

#### 2.1.6 Penatalaksanaan

Modalitas pada penatalaksanaan DM terdiri dari terapi non farmakologis dan terapi farmakologis. Terapi non farmakologis meliputi perubahan gaya hidup dengan melakukan pengaturan pola makan yang dikenal sebagai terapi nutrisi medis, meningkatkan aktivitas fisik, dan edukasi berbagai masalah terkait DM

secara terus-menerus. Terapi farmakologis meliputi pemberian obat anti diabetes oral dan injeksi insulin. Terapi farmakologis dilakukan jika perubahan gaya hidup tidak dapat mengendalikan kadar glukosa darah serta terapi farmakologis tetap harus diiringi dengan terapi non farmakologis (Yunir dan Soebardi, 2009).

a. Terapi Non Farmakologis

1) Terapi Nutrisi Medis (TNM)

Terapi nutrisi medis merupakan salah satu terapi yang direkomendasikan pada penderita diabetes dengan prinsip pengaturan pola makan yang didasarkan pada status gizi penderita DM dan melakukan modifikasi diet berdasarkan kebutuhan individual. Manfaat pada pemberian TNM antara lain menurunkan berat badan, menurunkan tekanan darah sistolik dan diastolik, menurunkan kadar glukosa darah, memperbaiki profil lipid, meningkatkan sensitivitas reseptor insulin, dan memperbaiki sistem koagulasi darah. Tujuan TNM adalah untuk mencapai dan mempertahankan:

- a) Kadar glukosa darah mendekati normal,
  - (1) Glukosa darah puasa 90-130 mg/dl
  - (2) Glukosa darah dua jam setelah makan <180 mg/dl
  - (3) Kadar HbA1C <7%
- b) Tekanan darah <130/80 mmHg
- c) Profil lipid:
  - (1) LDL <100 mg/dl
  - (2) HDL >40 mg/dl
  - (3) Trigliserida <150 mg/dl
- d) Berat badan senormal mungkin

Tenaga medis harus dapat menentukan jumlah, komposisi dari makanan yang akan dimakan oleh penderita DM. Perubahan pola makan harus dilakukan secara konsisten baik dalam jadwal, jumlah, dan jenis makanan. Pencapaian target perlu dibicarakan bersama dengan penderita DM agar perubahan pola makan yang dianjurkan dapat dengan mudah dilaksanakan, realistis, dan sederhana (Yunir dan Soebardi, 2009).

Komposisi bahan makanan terdiri dari makronutrien yang meliputi karbohidrat, protein, dan lemak, serta mikronutrien yang meliputi vitamin dan mineral. Jumlah yang dianjurkan adalah 45-65 % karbohidrat, 10-20% protein, 20-25% lemak, dan serat 20-35 gram/hari (Soelistijo *et al.*, 2015).

## 2) Latihan Fisik

Aktivitas fisik adalah pengertian umum untuk semua pergerakan tubuh yang meningkatkan penggunaan energi sedangkan latihan fisik lebih spesifik kepada bentuk aktivitas fisik yang terstruktur guna meningkatkan kebugaran tubuh. Aktifitas fisik dan latihan fisik keduanya sangat penting untuk DM. Latihan fisik telah menunjukkan manfaat antara lain meningkatkan kontrol glukosa darah, mengurangi resiko kardiovaskular, menurunkan berat badan, dan meningkatkan kualitas hidup. Latihan fisik terstruktur yang dilakukan paling sedikit delapan minggu telah menunjukkan penurunan HbA1C sekitar rata-rata 0,66% pada pasien DM tipe 2 (ADA, 2017).

Orang dewasa berusia di atas 18 tahun disarankan untuk melakukan aktifitas fisik aerobik selama 150 menit/minggu dengan intensitas sedang atau 75 menit/minggu untuk intensitas tinggi. Sebagai tambahan juga dianjurkan untuk melakukan aktivitas penguatan otot dua hari atau lebih per minggu. Individu yang telah berusia 65 tahun lebih dan orang dengan kecacatan disarankan untuk melakukan sesuai anjuran bagi orang dewasa jika mampu, bila tidak bisa dilakukan sesuai kemampuan (ADA, 2017).

### b. Terapi Farmakologis

Penderita DM tipe 1 direkomendasikan untuk diterapi dengan injeksi harian dengan insulin sebelum dan setelah makan atau dengan infus insulin subkutan secara kontinyu. Pemberian insulin yang direkomendasikan adalah insulin yang bekerja cepat guna mengurangi resiko hipoglikemia. Perlu dipertimbangkan pula untuk mengedukasi penderita DM tipe 1 tentang mengatur dosis insulin sesuai masukan karbohidrat, kadar glukosa sebelum makan, dan perkiraan aktivitas fisik. Pasien DM tipe 1 yang sukses menggunakan infus insulin subkutan secara kontinyu diharuskan melanjutkan terapi ini setelah umur mereka melewati 65 tahun.

Pada penderita DM tipe 2 penggunaan metformin direkomendasikan sebagai terapi awal jika tidak ada kontra indikasi. Defisiensi vitamin B12 dapat terjadi akibat efek jangka panjang dari penggunaan metformin sehingga perlu dipertimbangkan penghitungan kadar vitamin B12 pada pasien yang menggunakan metformin terutama pada pasien dengan anemia dan neuropati perifer. Jika dalam waktu tiga bulan pemberian monoterapi sampai dosis maksimal tidak mencapai target HbA1C maka perlu ditambahkan obat kedua. Setelah pemberian terapi obat apabila target kadar glukosa darah tidak tercapai maka terapi menggunakan insulin tidak boleh ditunda. Pada setiap pemberian terapi perlu untuk selalu mempertimbangkan keadaan pasien seperti resiko hipoglikemia, kenaikan berat badan, efek samping, harga obat, dan keputusan pasien (ADA, 2017).

#### 2.1.7 Komplikasi

##### a. Komplikasi Akut

Komplikasi akut akibat DM terdiri dari *diabetic ketoacidosis* (DKA), dan *hyperosmolar nonketotic state* (HONK). Penyebab terjadinya DKA adalah defisiensi insulin yang parah ditambah dengan pengeluaran glukagon mengakibatkan lipolisis dan peningkatan masif ketogenesis sehingga terjadi hiperketonemia parah yang menyebabkan asidosis metabolik. Perbedaan antar HONK dan DKA adalah tidak adanya hiperketonemia dan asidosis metabolik. Ketosis tidak terjadi karena kadar insulin masih cukup tinggi sehingga mampu menekan lipolisis dan ketogenesis. Hiperglikemia yang terjadi pada HONK mungkin lebih tinggi dari pada DKA. Dehidrasi progresif pada HONK terjadi karena tingginya kadar glukosa darah perifer (Dayan dan Williams, 2010).

##### b. Komplikasi Kronis

Kerusakan jaringan jangka panjang merupakan beban utama pada penyakit DM. Komplikasi kronis pada DM dapat dibagi menjadi dua yaitu komplikasi mikrovaskular dan makrovaskular. Komplikasi mikrovaskular yang ditimbulkan DM antara lain retinopati, nefropati, dan neuropati sedangkan komplikasi vaskular antara lain penyakit jantung koroner, stroke, dan penyakit arteri perifer (Dayan dan Williams, 2010).

## 2.2 Resistensi Insulin

Resistensi insulin merupakan istilah yang digunakan untuk mendefinisikan penurunan aktivitas biologis insulin, yang mana biasanya disamakan dengan gangguan penurunan glukosa darah. Tidak ada batasan nilai normal untuk sensitivitas insulin karena kemampuan insulin untuk menurunkan glukosa darah bervariasi antar individu.

Salah satu penyebab utama dari resistensi insulin adalah obesitas terutama resistensi insulin pada otot rangka. Resistensi insulin dikaitkan dengan obesitas sentral dimana lemak disimpan disekitar perut. Saat ini masih belum jelas diketahui bagaimana peningkatan masa lemak dapat menurunkan sensitivitas insulin, diperkirakan produk turunan lemak pada sirkulasi darah menjadi salah satu penyebab. Sel adiposit mensekresikan asam lemak bebas dan *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ) yang mana keduanya mengganggu insulin. Peningkatan kadar asam lemak bebas pada orang obesitas disebabkan oleh peningkatan lipolisis. Asam lemak bebas dapat menyebabkan hiperglikemia dengan cara bersaing dengan metabolisme glukosa di hati dan otot. Di hati, asam lemak bebas meningkatkan glukoneogenesis dengan cara menstimulasi pembatasan enzim *pyruvate carboxylase* dan meningkatkan produksi glukosa hati. Di otot, asam lemak bebas menghambat glikolisis pada tahap *phosphofructokinase* dan oksidasi glukosa lewat *pyruvate dehydrogenase* yang mana menyebabkan penurunan penggunaan glukosa dan pemasukan glukosa. Produksi TNF $\alpha$  yang dihasilkan oleh sel adiposa meningkat pada orang yang obesitas. Pada penelitian *in vitro* TNF $\alpha$  menghambat aktivitas *tyrosine kinase* pada reseptor insulin. Obesitas juga menyebabkan penyimpanan trigliserida di hati dan otot rangka yang berkorelasi pada gangguan aktivitas insulin (Dayan dan Williams, 2010).

Efek dari peningkatan asam lemak bebas dapat menyebabkan gangguan pada aktivitas dan *glucose transporter 4* (GLUT 4) (Shulman, 2000). Mekanisme molekuler yang mendasari gangguan *glucose transporter* adalah peningkatan hasil metabolisme lemak dalam sel otot sehingga mengganggu pensinyalan insulin lewat fosforilasi *Ser/Thr insulin receptor substrate* (Morino *et al.*, 2006).

### 2.3 *Glucose Transporter (GLUT)*

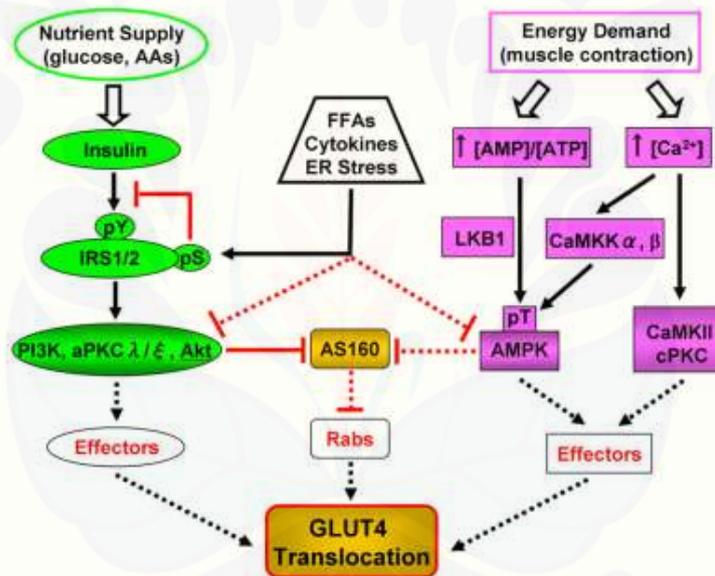
Membran plasma pada semua sel mamalia memiliki satu atau lebih sistem transpor untuk pertukaran glukosa masuk dan keluar sel. Pada mamalia, kadar glukosa darah dipertahankan pada rentang yang sempit lewat mekanisme homeostasis. Kebanyakan sel mengambil glukosa dari cairan interstisial secara pasif lewat proses menuruni gradien konsentrasi kecuali sel epitel usus halus dan tubulus kontortus proksimal ginjal yang mana glukosa diserap dengan cara melawan gradien elektrokimia. Famili GLUT terbagi menjadi tiga kelas antara lain kelas I yang terdiri dari GLUT1-4; kelas II yang terdiri dari GLUT5, 7, 9, dan 11; dan kelas III yang terdiri dari GLUT6, 8, 10, 12, dan HMIT. Protein GLUT dan tempat ekspresi dapat dilihat pada Tabel 2.1 (Zhao dan Keating, 2007).

Tabel 2.1 Tempat ekspresi protein GLUT

<b>Protein</b>	<b>Tempat Ekspresi Utama</b>
<b>GLUT1</b>	Terdistribusi dibanyak jaringan
<b>GLUT2</b>	Hati, islet pankreas, ginjal, usus halus
<b>GLUT3</b>	Otak, sel saraf
<b>GLUT4</b>	Otot rangka, jaringan lemak, jantung
<b>GLUT5</b>	Usus, ginjal, testis
<b>GLUT6</b>	Limpa, leukosit, otak
<b>GLUT7</b>	Usus halus, kolon, testis
<b>GLUT8</b>	Testis, blastokista, otak, otot, adiposit
<b>GLUT9</b>	Hati, ginjal
<b>GLUT10</b>	Hati, pankreas
<b>GLUT11</b>	Jantung, otot
<b>GLUT12</b>	Jantung, prostat, kelenjar <i>mammae</i>
<b>HMIT</b>	Otak

Sumber: Zhao dan Keating, (2007)

Insulin dan olahraga dapat menstimulasi translokasi GLUT 4 dari sitoplasma ke membran sel dan pemasukan glukosa dari ekstrasel ke intrasel. Pada sel yang tidak terstimulasi, GLUT4 disimpan dalam kompartemen intraseluler yang disebut GLUT4 *storage vesicles* (GSV). *Glucose transporter 4* juga disimpan pada beberapa kompartemen membran intraseluler diantaranya *early endosome* (EE), *endosomal recycling compartment* (ERC), dan *trans golgi network* (TGN). Molekul GLUT4 beredar secara dinamis diantara kompartemen intraseluler. Mekanisme pensinyalan translokasi GLUT4 dapat dilihat pada Gambar 2.1 (Huang dan Czezh, 2007; Satoh, 2014).



Gambar 2.1 Mekanisme pensinyalan dari jalur insulin dan kontraksi otot (Huang dan Czezh, 2007)

Insulin memiliki efek pada sel target lewat aktivasi reseptor spesifik. Saat terjadi ikatan dengan insulin, aktivitas protein tirosin kinase dari reseptor meningkat sehingga menginduksi fosforilasi dari beberapa target protein yang berbeda. *Insulin reseptor substrate 1* (IRS1) adalah substrat utama dari reseptor insulin yang mana bertindak sebagai dasar untuk rangkaian pensinyalan. *Phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) adalah sebuah komponen dari rangkaian yang mana mengkatalisasi fosforilasi pada cincin *inositol* ketiga dari *phosphoinositides*.

Produk dari PI3K seperti *phosphatidylinositol-3,4,5-triophosphate* dan *phosphatidylinositol-3,4-biphosphate* berikatan dengan PDK1 dan AKT2. Aktivasi AKT2 sangat krusial bagi pensinyalan insulin. Kemudian AKT2 memfosforilasi TBC1D4 atau dikenal juga sebagai AS160. Fosforilasi mengakibatkan penghambatan aktivitas AS160 sehingga GLUT4 *containing vesicles* (GCV) dapat bergerak dan melebur dengan membran sel. Pergerakan dan peleburan GCV dengan membran sel dapat terjadi karena penghambatan AS160 mengakibatkan aktivasi Rab yang mana berperan pada pergerakan sepanjang sitoskeleton dan peleburan dengan membran sel (Stöckli dan James, 2011; Satoh, 2014).

Kontraksi otot menghasilkan peningkatan konsentrasi kalsium intraseluler dan rasio *adenosine monophosphate* (AMP)/*adenosine triphosphate* (ATP) yang mana akan meningkatkan translokasi GLUT4 ke permukaan sel.  $Ca^{2+}$ /calmodulin (CaM) menyebabkan peningkatan *adenosine monophosphate kinase* (AMPK) lewat *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinases* (CaMKKs). Selain itu AMPK juga teraktivasi oleh peningkatan rasio AMP/ATP. *Adenosine monophosphate kinase* akan mempengaruhi aktivitas TBC1D4 atau AS160 sehingga terjadi translokasi GLUT4 (Huang dan Czezh, 2007; Richter dan Hargreaves, 2013).

#### 2.4 Beras Analog

Beras analog merupakan produk olahan yang dibuat dari sebagian atau seluruhnya bahan non-beras. Penggunaan bahan non beras dapat menjadikan beras analog memiliki nilai gizi lebih baik dan nilai indeks glikemik lebih rendah dari beras biasa (Noviasari *et al.*, 2015).

Metode pembuatan beras analog terdiri dari metode granulasi dan ekstrusi. Pada metode granulasi beras analog masih jauh dari yang diharapkan yaitu bentuk bulat, densitas rendah dan mudah pecah. Metode ekstrusi terbagi menjadi dua yaitu ekstrusi panas dan ekstrusi dingin. Penggunaan teknologi ekstrusi untuk membuat beras analog mempunyai banyak kelebihan seperti kapasitas besar, terjadinya proses pengaliran, pencampuran, pengadonan, pemanasan dan pembentukan

sehingga beras analog yang dihasilkan mempunyai karakteristik yang serupa dengan beras.

Beras merupakan sumber karbohidrat maka beras analog harus dibuat dari bahan yang juga dikenal sebagai sumber karbohidrat yang biasanya tersimpan pada tanaman dalam bentuk pati. Bahan lain yang diperlukan dalam pembuatan beras analog adalah serat atau tepung (pati yang mengandung serat), air, lipid, bahan pengikat dan penyetting serta bahan aditif yang bersifat opsional seperti pewarna, flavor, fortifikan dan antioksidan. Makanan dapat disebut sebagai sumber serat jika mengandung serat pangan minimal 3%, sedangkan makanan disebut tinggi serat jika mengandung serat pangan minimal 6% (Budi *et al.*, 2013; Noviasari *et al.*, 2015).

## 2.5 Serat Makanan

Serat makanan terutama diturunkan dari material tumbuhan dan tersusun dari karbohidrat non-pati dan lignin yang tidak dapat dicerna pada usus halus karena manusia tidak memproduksi enzim yang dapat menghidrolisis serat. Sebagai hasilnya serat difermentasikan oleh bakteri di kolon. Serat makanan berkontribusi nol kalori pada makanan, namun metabolit yang dilepaskan bakteri di kolon digunakan oleh manusia untuk memenuhi kebutuhan energi (Turner dan Lupton, 2011).

Terdapat beberapa sistem yang digunakan untuk mengklasifikasikan serat pangan yang didasarkan pada peran di tanaman, jenis polisakarida, kelarutan di saluran cerna, tempat penyerapan, produk pencernaan, dan klasifikasi fisiologis. Klasifikasi yang paling sesuai untuk serat pangan adalah membagi menjadi dua kategori yaitu serat tidak larut air atau kurang dapat difermentasi seperti selulosa, hemiselulosa, dan lignin; serat larut air atau dapat difermentasi dengan baik seperti pectin, *gum*, dan getah (Dhingra *et al.*, 2012).

Makanan yang kaya akan serat makanan bermanfaat bagi penatalaksanaan DM tipe 2. Serat makanan memperbaiki hiperglikemia setelah makan dengan menunda proses pencernaan, penyerapan karbohidrat, dan menambah rasa kenyang. Pada individu yang mengalami resistensi insulin, serat makanan mungkin

dapat meningkatkan sensitivitas insulin lewat SCFA yang diproduksi oleh fermentasi serat. Produksi SCFA paling banyak terjadi pada *caecum* dan kolon proksimal. Asetat, propionat, dan butirrat adalah SCFA yang paling melimpah di usus besar. *Short chain fatty acids* yang diserap di *caecum*, kolon asenden, atau kolon transversum akan dibawa melalui vena mesentrika superior, sedangkan SCFA yang diserap di kolon desenden dan sigmoid dibawa melalui vena mesentrika inferior, yang mana keduanya akan melewati vena porta dan hati (Fujii *et al.*, 2013; Canfora dan Blaak, 2016).

*Short chain fatty acids* dapat menghambat fosforilasi HSL sehingga menurunkan lipolisis. Penurunan asam lemak bebas di darah akibat penurunan lipolisis dapat menurunkan penyimpanan lemak ektopik di dalam sel otot yang mana dapat mengakibatkan metabolit oksidasi lemak dapat berkurang sehingga sensitivitas insulin membaik. *Short chain fatty acids* juga mampu meningkatkan GLP-1 yang mana dapat meningkatkan sensitivitas insulin. Pengaruh dari GLP-1 adalah meningkatkan aktivasi PI3K, AKT, dan AMPK yang mana akan meningkatkan fosforilasi TBC1D4 sehingga translokasi GLUT4 dapat terjadi (Andreozzi *et al.*, 2016; Canfora dan Blaak, 2016).

## 2.6 Immunohistochemistry

*Immunohistochemistry* (IHC) adalah metode pemeriksaan menggunakan antibodi monoklonal maupun poliklonal untuk mengidentifikasi antigen pada jaringan. Pemeriksaan IHC dapat digunakan untuk memeriksa antigen normal maupun abnormal yang ada pada jaringan. Keuntungan utama dari metode IHC dibandingkan dengan metode deteksi protein lainnya adalah dapat mendeteksi protein pada morfologi sel (Webster *et al.*, 2009; Duraiyan *et al.*, 2012).

Terdapat tiga metode perhitungan skor IHC yang sudah umum dan diterima secara internasional yaitu, *Allred-score*, *immunoreactive score (IRS)*, dan *H-score*. *Allred-score* mengkombinasikan nilai persentase sel positif dengan intensitas warna dari reaksi yang terjadi pada lapang pandang yang diamati. Skor persentase sel positif dijumlahkan dengan skor intensitas dengan nilai maksimal 8. Tabel yang

menjelaskan *Allred-score* dapat dilihat pada Tabel 2.2 (Fedchenko dan Reifenrath, 2014).

Tabel 2.2 *Allred-score*

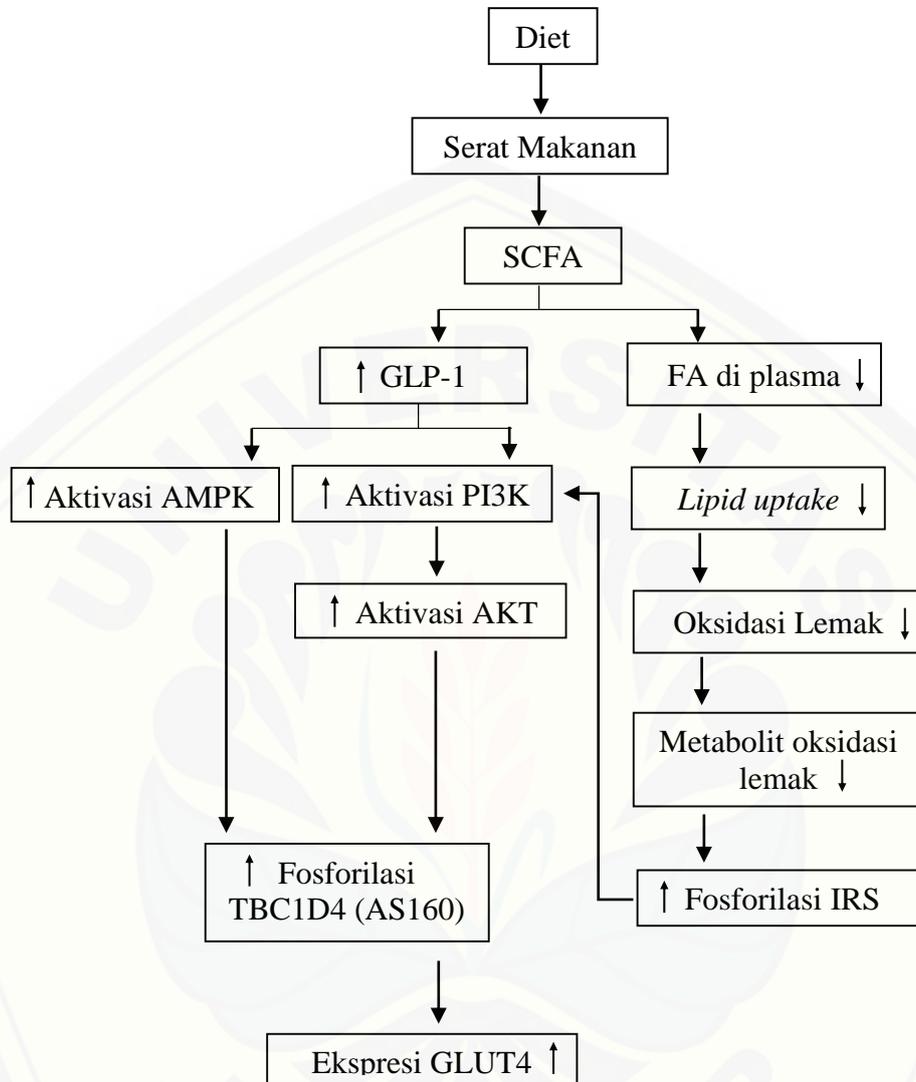
Skor A	Sel Positif, %	Skor B	Intensitas Warna
0	0	0	Negatif
1	<1	1	Lemah
2	1 - 10	2	Sedang
3	11 - 33	3	Kuat
4	34 - 66	Skor final (A+B): 0-8	
5	≥ 67		

Skor H ditentukan dengan penambahan hasil dari perkalian dari persentase sel dengan intensitas pewarnaan (0 untuk negatif - 3 untuk sangat kuat). Skor IRS memiliki jangkauan nilai dari 0-12 yang mana merupakan hasil perkalian antar persentase sel positif (0-4) dan intensitas warna (0-3). Tabel yang menjelaskan skor IRS dapat dilihat pada Tabel 2.3 (Fedchenko dan Reifenrath, 2014).

Tabel 2.3 Skor IRS

A (persentase sel positif)	B (intensitas warna)	Skor IRS
0 = tidak ada sel positif	0 = negatif	0-1 = negatif
1 = <10% sel positif	1 = lemah	2-3 = lemah
2 = 10-50% sel positif	2 = sedang	4-8 = sedang
3 = 51-80% sel positif	3 = kuat	9-12 = kuat
4 = >80% sel positif	Skor IRS (A x B) : 0-12	

## 2.7 Kerangka Teori



Gambar 2.2 Kerangka teori penelitian

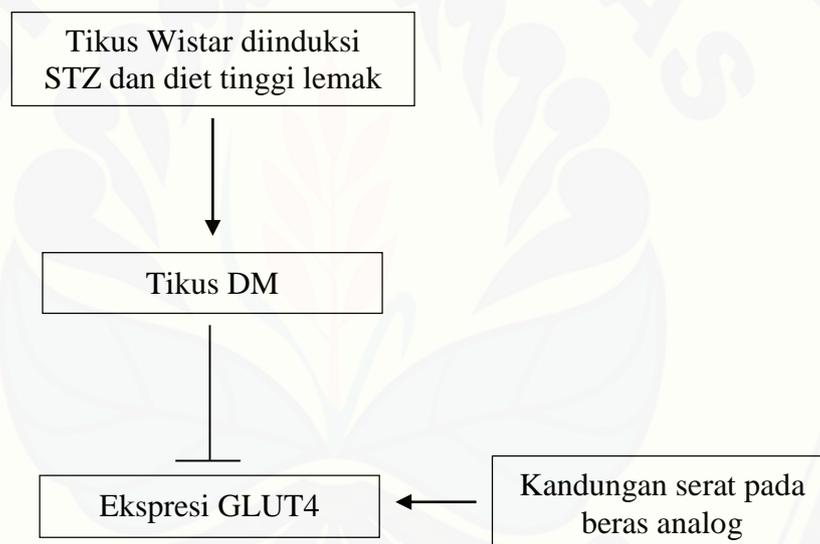
Penatalaksanaan DM tipe 2 salah satunya adalah dengan TNM. Salah satu nutrisi yang penting pada TNM adalah serat. Serat merupakan zat yang tidak bisa dicerna oleh manusia sehingga akan diubah menjadi SCFA di usus besar. Efek dari SCFA antara lain adalah peningkatan GLP-1 dan penurunan asam lemak di darah.

Peningkatan GLP-1 dapat meningkatkan ekspresi GLUT4 dengan cara meningkatkan aktivasi AMPK dan PI3K. Peningkatan aktivasi PI3K dapat meningkatkan AKT sehingga AS160 terfosforilasi, sedangkan peningkatan AMPK

langsung meningkatkan fosforilasi AS160. Fosforilasi AS160 menyebabkan terjadinya pergerakan dan fusi GCV ke membran sel sehingga terjadi translokasi GLUT4.

Penurunan asam lemak di darah akan mengakibatkan penurunan pengambilan lemak di sel otot sehingga oksidasi dan produksi metabolit lemak akan menurun. Fosforilasi IRS dapat meningkat ketika metabolit oksidasi lemak menurun sehingga aktivasi PI3K dapat meningkat. Pada akhirnya ekspresi GLUT4 akan meningkat.

## 2.8 Kerangka Konseptual



Gambar 2.3 Kerangka Konsep penelitian

→ : Memicu  
—| : Menghambat

## 2.9 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian ini adalah kandungan serat pada beras analog memiliki pengaruh terhadap peningkatan ekspresi GLUT 4 otot rangka tikus Wistar model diabetes.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental sungguhan (*true experiment*) dengan rancangan penelitian *post test only control group design* (Notoatmodjo, 2012).

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Februari hingga November 2017 dengan tempat sebagai berikut:

- a. laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk perawatan hewan coba;
- b. laboratorium Pengolahan Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember untuk analisa kandungan serat beras analog; dan
- c. laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga untuk pembuatan preparat otot skeletal tikus dan pengecatan IHC
- d. laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk pembacaan preparat IHC otot skeletal tikus.

### 3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

#### 3.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh tikus putih (*Rattus novergicus*) strain wistar dan berjenis kelamin jantan.

#### 3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah tikus wistar jantan (*Rattus novergicus*). Pemilihan jenis kelamin tikus Wistar ditujukan untuk menghindari efek hormonal yang dapat mempengaruhi hasil penelitian. Kriteria sampel meliputi tikus yang berada dalam kondisi sehat, bergerak aktif, berumur sekitar 3 bulan, berat badan  $\pm$  150-200. Kriteria inklusi ialah tikus dengan GDP > 135 mg/dl setelah diinduksi

streptozotosin. Kriteria eksklusi ialah tikus yang selama penelitian tidak mau makan dan mati.

### 3.3.3 Besar Sampel

Besar sampel hewan coba untuk masing-masing sampel (n) diperoleh dari rumus Federer sebagai berikut:

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

Dimana n adalah jumlah sampel dan t adalah jumlah kelompok perlakuan, sehingga:

$$(n-1)(4-1) \geq 15$$

$$(n-1)3 \geq 15$$

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

$$n \geq 6$$

Berdasarkan hasil perhitungan diatas, jumlah sampel tikus yang digunakan pada tiap kelompok penelitian ini adalah 6, maka jumlah tikus seluruhnya adalah 24 ekor.

## 3.4 Variabel Penelitian

### 3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kandungan beras analog.

### 3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah ekspresi GLUT4 otot rangka tikus Wistar.

### 3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian adalah galur, jenis kelamin, berat badan hewan coba, dan cara pembuatan *pellet*, dan jumlah pelet.

### 3.5 Definisi Operasional

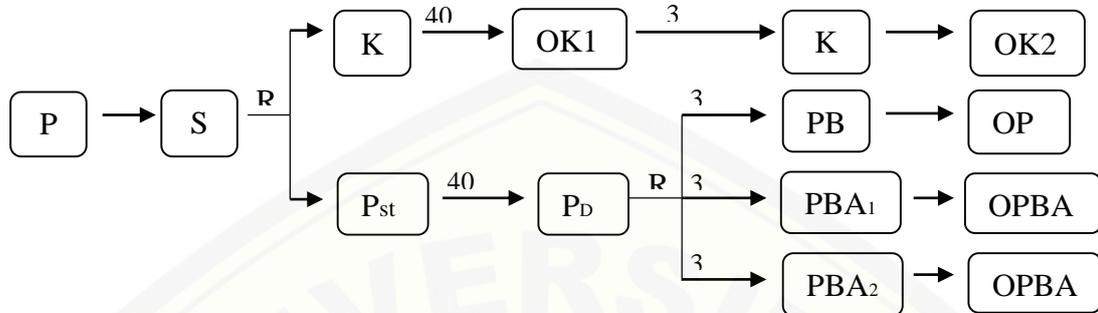
Definisi operasional dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Kategori	Teknik Pengambilan Data	Skala
1.	Beras	Beras dalam penelitian ini adalah beras IR64 yang diperoleh dari pedagang beras di Pasar Tanjung Jember. Beras dijadikan pelet dengan cara mencampur beras dan pelet formula ITB dengan perbandingan 60% beras dan 40% pelet formula ITB (lampiran 3.1). Pelet yang dihasilkan diberi tanda diet B dan diberikan kepada tikus kelompok PB <i>ad libitum</i> dengan cara diletakkan pada kandang selama tiga minggu. Pakan diberikan pagi dan sore.	-	Uji serat kasar metode gravimetri	Rasio
2.	Beras Analog	Beras analog pada penelitian ini adalah beras buatan dengan komposisi dapat dilihat di Lampiran 3.2. Beras analog dibuat menggunakan teknik Subagio <i>et al.</i> , (2012) dengan mereduksi komponen lemak sampai kandungan kalornya sama dengan beras biasa. Beras analog dijadikan pelet dengan cara mencampur beras analog dan pelet formula ITB dengan perbandingan 60% beras analog dan 40% pelet formula ITB. Pelet yang dihasilkan diberi tanda diet BA dan diberikan pada tikus kelompok PBA secara <i>ad libitum</i> dengan cara diletakkan pada kandang selama tiga minggu. Pakan diberikan pagi dan sore.	-	Uji serat kasar metode gravimetrik	Rasio
3.	Ekspresi GLUT4	Ekspresi GLUT4 di membran sel otot rangka dapat diketahui melalui pemeriksaan imunohistokimia dengan menggunakan antibodi poliklonal anti GLUT4 (Bioss USA). Teknik imunohistokimia yang dipakai adalah metode indirect dengan prinsip pembentukan ikatan antigen-antibodi. Ekspresi GLUT4 pada penelitian ini diukur dengan cara mengukur <i>immunoreactive score</i> (IRS-GLUT4) oleh dua orang pada lima lapang pandang dengan menggunakan mikroskop Olympus CX-21 LED pada perbesaran 400x.	Skor: 0-12 0-1: Negatif 2-3: Lemah 4-8: Sedang 8-12: Kuat	Imunohistokimia	Ordinal
4.	Kriteria DM	Kadar glukosa darah puasa adalah kadar glukosa darah yang diukur setelah tikus dipuaskan pada malam hari selama 8 – 12 jam yang diukur menggunakan glukotes <i>EasyTouch</i> dalam satuan mg/dl dengan cara <i>electrochemical</i> metode <i>amperometric</i> dalam satuan mg/dl. Tikus dikatakan hiperglikemia saat kadar glukosa darah puasa >135 mg/dL.	-	<i>Electrochemical</i>	Rasio

### 3.6 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *post test only control group design* (Notoatmodjo, 2012). Rancangan penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Skema Rancangan Penelitian

- Po : Populasi
- R : Randomisasi
- S : Sampel
- K : Kelompok kontrol yang tidak diinduksi DM
- P<sub>stz</sub> : Kelompok yang diinduksi DM menggunakan streptozosin dosis rendah dan diberi pakan tinggi lemak selama 40 hari
- OK1 : Pemeriksaan kadar glukosa darah kelompok kontrol setelah diberi pakan standart selama 3 minggu
- P<sub>DM</sub> : Kelompok tikus DM, kelompok P<sub>stz</sub> yang memiliki GDP > 135 mg/dl, pengukuran GDP dilakukan setelah 40 hari induksi
- KB : Kelompok kontrol yang diberi pakan standart selama 3 minggu
- PB : Kelompok tikus DM diberi pakan beras IR64 selama 3 minggu
- PBA<sub>1</sub> : Kelompok tikus DM diberi pakan beras analog 1 selama 3 minggu
- PBA<sub>2</sub> : Kelompok tikus DM diberi pakan beras analog 2 selama 3 minggu
- OK2 : Data kelompok kontrol
- OPB : Data kelompok PB
- OPBA<sub>1</sub>: Data kelompok PBA<sub>1</sub>
- OPBA<sub>2</sub>: Data kelompok PBA<sub>2</sub>

### 3.7 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.7.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah.

- a. Alat untuk pemeliharaan tikus terdiri dari kandang tikus dari plastic ukuran 34x24x10 cm dengan penutup terbuat dari anyaman kawat, tempat makan, botol minum, dan spidol.
- b. Alat untuk induksi tikus DM terdiri dari timbangan dan spuit 1 ml.
- c. Alat untuk pengambilan otot rangka tikus wistar jantan terdiri dari toples pembiusan, minor set, tabung penyimpanan organ.
- d. Alat untuk penghitungan ekspresi GLUT4 otot rangka terdiri dari mikroskop.

#### 3.7.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah.

- a. Bahan untuk induksi tikus DM terdiri dari streptozotosin (sigma) dan pakan diet tinggi lemak.
- b. Bahan untuk pakan terdiri dari beras IR64, MOCAF, jagung, dan *aquadest* untuk minum.
- c. Bahan untuk mengorbankan tikus terdiri dari kapas dan eter.
- d. Bahan untuk pengambilan sampel otot rangka tikus adalah buffer formalin.
- e. Bahan untuk pembuatan preparat *immunohistochemistry* (IHC) terdiri dari:
  - 1) *Xylene*
  - 2) *Ethanol* 100, 95, 70, dan 50%
  - 3) *Aquadest*
  - 4) *Buffer sodium citrate*
  - 5) *Tris-buffered saline tween 20* (TBST)
  - 6) *Hydogen peroxide*
  - 7) *Bovine serum albumin* (BSA)
  - 8) Antibodi primer poliklonal anti GLUT4 dari Bioss USA
  - 9) Antibodi sekunder
  - 10) *Chromogen*

### 3.8 Prosedur Penelitian

#### 3.8.1 Pemilihan Sampel Tikus

Hewan coba berupa tikus wistar jantan berusia 3 bulan dengan berat badan 150-200 gram, sebanyak 24 ekor terbagi dalam empat kelompok dengan perincian 6 ekor tikus untuk masing-masing kelompok.

#### 3.8.2 Persiapan Sampel Tikus

Tikus diadaptasikan selama tujuh hari sebelum diberi perlakuan. Satu tikus menempati satu kandang dengan ukuran kandang 34x24x10 sentimeter. tikus diberi pakan ayam 593 dan diberikan air minum secara *ad libitum*.

#### 3.8.3 Tahap perlakuan

##### a. Induksi tikus DM

Tikus diinduksi menggunakan streptozotosin dan pemberian diet tinggi lemak selama tiga minggu. Kombinasi ini dapat menghasilkan model tikus DM tipe 2. Dosis streptozosin yang digunakan adalah dosis rendah 35 mg/KgBB dilarutkan dalam dapar sitrat konsentrasi 0,05 M pH 4,3-4,5. Kandungan lemak sebesar 22,8% yang berasal dari lemak babi (Srinivasan *et al.*, 2005). Satu minggu setelah induksi dilakukan pengukuran kadar glukosa darah dengan mengambil darah dari ekor. Tikus dengan kadar glukosa > 135 mg/ml dijadikan model tikus DM.

##### b. Pemberian pakan beras analog

Tikus kontrol diberi pakan standart. Setelah tikus menjadi DM tikus dibagi menjadi tiga kelompok secara acak terdiri dari kelompok perlakuan beras, perlakuan beras analog 1, dan perlakuan beras analog 2. Kelompok perlakuan beras diberikan pakan beras IR64 selama 3 minggu *ad libitum*. Kelompok perlakuan beras analog 1 diberikan pakan beras analog 1 selama 3 minggu *ad libitum*. Kelompok perlakuan beras analog 2 diberikan pakan beras analog 2 selama 3 minggu *ad libitum*.

#### 3.8.4 Pengambilan Otot Rangka

Hewan coba diterminasi pada minggu ke-6. Tikus diterminasi menggunakan eter kemudian otot rangka yaitu *musculus quadriceps femoris* dari tikus diambil dengan cara dibedah. Otot rangka yang telah diambil direndam dalam larutan buffer formalin.

#### 3.8.5 Pembuatan Preparat IHC

Pewarnaan imunohistokimia dilakukan sesuai dengan prosedur tetap Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga (2015) sebagai berikut.

- a. Dilakukan deparafinisasi selama 5 menit.
- b. Direhidrasi alkohol 96% selama 4 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 5 menit.
- c. Dilakukan *blocking* endogen peroksidase 0,5% selama 30 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 5 menit.
- d. Dilakukan *decloaking chamber* 110° selama 30 menit dengan larutan diva kemudian didinginkan selama 30 menit dan dicuci dalam *phosphat buffer saline* (PBS) pH 7,4 selama 3 menit.
- e. Dilakukan *blocking* dengan *normal horse serum* 5% selama 30 menit.
- f. Ditambahkan antibodi primer protein tau 1:200 selama 60 menit kemudian dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 menit.
- g. Ditambahkan *universal link* selama 30 menit dan dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 menit.
- h. Ditambahkan tekravidin HRP label selama 30 menit kemudian dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 menit.
- i. Ditambahkan diamono benzidin (DAB) dan substrat *buffer* selama 2-5 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 5 menit.
- j. Dilakukan *counterstain* dengan hematoxilin eosin selama 5-10 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 5 menit dan direhidrasi dengan alkohol 96% selama 5 menit
- k. Dilakukan *clearing* selama 5 menit dan dibuat *mounting* dengan *cover glass*.

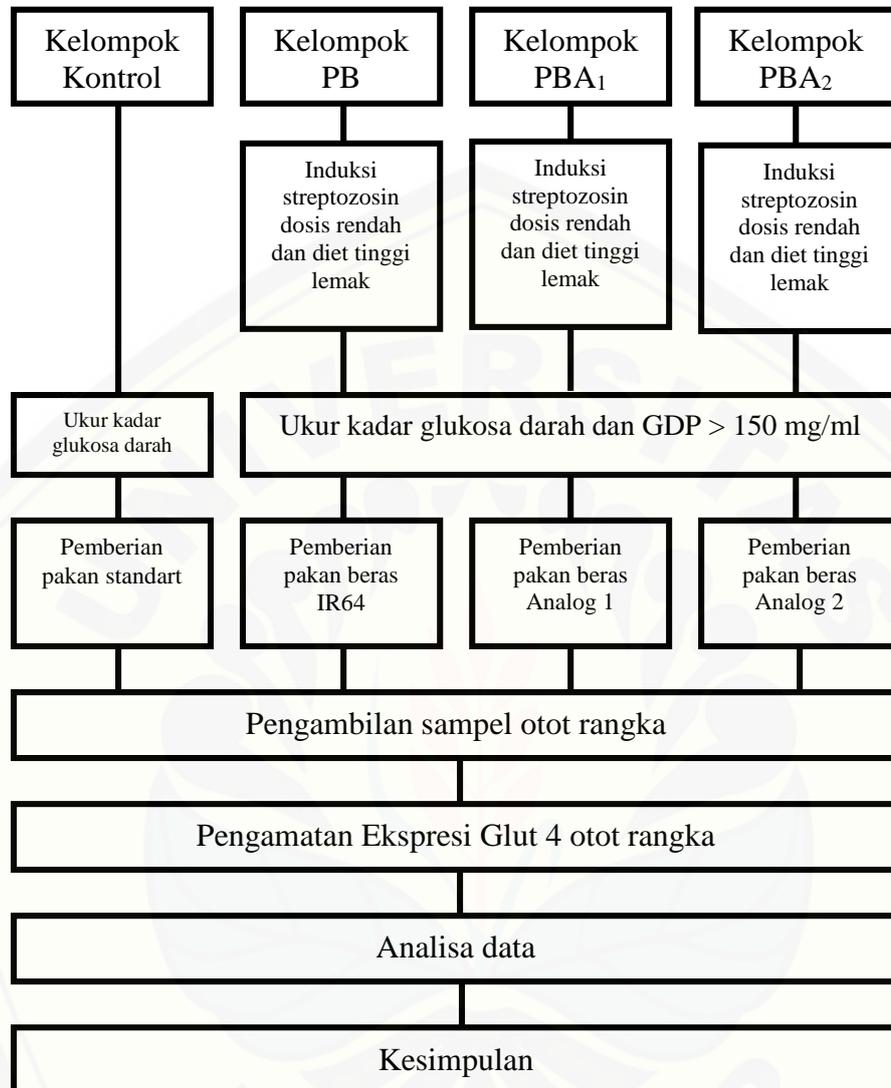
### 3.8.6 Pengamatan Preparat IHC

Pengamatan dilakukan untuk mengamati ekspresi GLUT 4 pada sediaan otot rangka tikus wistar jantan. Ekspresi GLUT 4 dihitung dengan perbesaran 400 kali. Foto preparat yang sudah diambil dengan menggunakan lensa objektif perbesaran 400 kali dilakukan pengukuran dengan cara mengukur *immunoreactive score* (IRS-GLUT4) dengan skor 0-12, dengan klasifikasi 0-1 = ekspresi negatif, 2-3 = ekspresi lemah, 4-8 = ekspresi sedang, 9-12 = ekspresi kuat (Fedchenko dan Reifenrath, 2014).

### 3.9 Analisis Data

Dari hasil pengamatan yang diperoleh, Data yang dianalisis ialah kadar glukosa darah tikus sebelum dan setelah induksi serta ekspresi GLUT4. Analisis data yang digunakan pada kadar glukosa darah ialah uji normalitas dan uji varian. Apabila diperoleh sebaran data normal dan homogen ( $p > 0,05$ ) digunakan analisis data *independent-sample T test*. Ekspresi GLUT4 dianalisis secara statistik untuk mengetahui perbedaan dengan analisis uji *Kruskal Wallis* dilanjutkan uji *Mann Whitney*. Kemudian untuk mengetahui korelasi antara kandungan serat dan ekspresi GLUT4 dilakukan uji *Spearman*.

### 3.10 Alur Kerja Penelitian



Gambar 3.2 Alur kerja Penelitian

### 3.11 Uji Kelayakan Etik

Penelitian ini mendapatkan ijin kelayakan etik penelitian dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Jember dengan nomer surat 1.167/H25.1.11/KE/2017.

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Terdapat pengaruh kandungan serat pada beras analog terhadap peningkatan ekspresi GLUT 4 otot rangka tikus Wistar model diabetes.

### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, peneliti memberikan saran sebagai berikut:

- a. Diperlukan peningkatan kadar serat beras analog diatas 3% agar beras analog dapat dikategorikan sebagai sumber serat.
- b. Diperlukan penambahan sodium alginate pada komposisi beras analog guna meningkatkan kadar serat.
- c. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai efek serat pada beras analog terhadap peningkatan SCFA dan GLP-1.
- d. Bagi pasien DM dianjurkan untuk mengkonsumsi serat karena terbukti meningkatkan ekspresi GLUT4

**DAFTAR PUSTAKA**

- Adam, T.C., M.S. Westerterp. 2005. Glucagon-like peptide-1 release and satiety after a nutrient challenge in normal-weight and obese subjects. *Br J Nutr.* 2005 Jun;93(6):845-51.
- American Diabetes Association. 2017. *Standards of Medical Care in Diabetes* 2017. USA: American Diabetes Association.
- Andreozzi, F., G. A. Raciti, C. Nigro, G. C. Mannino, T. Procopio, A. M. Davalli, F. Beguinot, G. Sesti, C. Miele, dan F. Folli. 2016. The GLP-1 Receptor Agonists Exenatide and Liraglutide Activate Glucose Transport by An AMPK-Dependent Mechanism. *J Transl Med.* 2016; 14: 229.
- Arif, A.B., A. Budiyo, dan Hoerudin. 2013. Nilai Indeks Glikemik Produk Pangan Dan Faktor-Faktor Yang Memengaruhinya. *J. Litbang Pert.* Vol. 32 No. 3 September 2013: 91-99.
- Budi, F.S., P. Hariyadi, S. Budijanto, dan D. Syah. 2013. Extrusion Process Technology of Analog Rice (Teknologi Proses Ekstrusi untuk Membuat Beras Analog). *Majalah PANGAN.* 22. 263-274.
- Besten, G.D., K.V. Eunen, A. K. Groen, K. Venema, D. J. Reijngoud, dan B M. Bakker. 2013. The Role of Short-Chain Fatty Acids in the Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Host Energy Metabolism. *J Lipid Res.* 2013 Sep; 54(9): 2325–2340.
- Canfora E.E., J. W. Jocken, dan E. E. Blaak. 2016. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Front Microbiol.* 2016; 7: 185.
- Covián, D.R, P.R. Madiedo, A. Margolles, M. Gueimonde, C. G. Gavilán, dan N. Salazar. 2015. Short-chain Fatty Acids in Control of Body Weight and Insulin Sensitivity. *Nat Rev. Endocrinol.* Advance online publication 11 August 2015.
- Chandalia, M., A. Garg, D. Lutjohann, K.V. Bergman, S.M. Grundy, dan L.J. Brinkley. 2000. Beneficial Effects of High Dietary Fiber Intake in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *N Engl J Med* 2000; 342:1392-1398.
- Covián, D.R, P.R. Madiedo, A. Margolles, M. Gueimonde, C. G. Gavilán, dan N. Salazar. 2016. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Front Microbiol.* 2016; 7: 185.

- Damasceno, D. C., A. O. Netto, I. L. Iessi, F. Q. Gallego, S. B. Corvino, B. Dallaqua, Y. K. Sinzato, A. Bueno, I. M. P. Calderon, dan M. V. C. Rudge. 2014. Streptozotocin-Induced Diabetes Models: Pathophysiological Mechanisms and Fetal Outcomes. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 819065.
- Dayan, C., dan G. Williams. 2010. *Oxford Textbook of Medicine 5<sup>th</sup> Edition*. New York: Oxford University Press.
- Dhingra, D., M. Michael, H. Rajput, dan R. T. Patil. 2011. Dietary fibre in foods: A Review. *J Food Sci Technol* (May–June 2012) 49(3):255–266.
- Duraiyan, J., R. Govindarajan, K. Kaliyappan, dan M. Palanisamy. 2012. Applications of immunohistochemistry. *J Pharm Bioallied Sci*. 2012 Aug; 4(Suppl 2): S307–S309
- Fitriani, A.N.F. 2013. Pengaruh Proporsi Tepung Jagung Dan Mocaf Terhadap Kualitas “Jamof Rice” Instan Ditinjau Dari Sifat Organoleptik. E-Jurnal Boga dan Gizi. Volume 02 Nomor 03, Yudisium Oktober Tahun 2013, hal 34-43
- Fedchenko, N., dan J. Reifenrath. 2014 Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. *Diagnostic Pathology* 2014, 9:221
- Fujii, H., M. Iwase, T. Ohkuma, S. O. Kaizu, H. Ide, Y. Kikuchi, Y. Idewaki, T. Joudai, Y. Hirakawa, K. Uchida, S. Sasaki, U. Nakamura, dan T. Kitazono. 2013. Impact of Dietary Fiber Intake on Glycemic Control, Cardiovascular Risk Factors and Chronic Kidney Disease in Japanese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: The Fukuoka Diabetes Registry. *Nutrition Journal* 2013, 12:159
- Ghani, M.A.A, dan R.A. DeFronzo. 2010. Pathogenesis of Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010: 476279.
- Green, C.J., T. I. Henriksen, B. K. Pedersen, T. P. J. Solomon. 2012. Glucagon Like Peptide-1-Induced Glucose Metabolism in Differentiated Human Muscle Satellite Cells Is Attenuated by Hyperglycemia. *PLoS ONE* 7(8): e44284.
- Guariguata, L., D.R. Whitting, I. Hambleton, J. Beagley, U. Linnekamp, dan J.E. Shaw. 2014. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Research and Clinical Practice*. IO3 (2014) 137-149.
- Heimann, E., M. Nyman, A. Palbrink, K. Lindkvist-Peterssonc, dan E. Degerman. 2016. Branched Short-Chain Fatty Acids Modulate Glucose And Lipid

- Metabolism In Primary Adipocytes. *ADIPOCYTE* 2016, VOL. 5, NO. 4, 359–368.
- Huang, S., dan M. P. Czech. 2007. The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metabolism* 5, April 2007.
- Ji, W., X. Chen, J. Lv, M. Wang, S. Ren, B. Yuan, B. Wang, dan L. Chen. 2014. Liraglutide Exerts Antidiabetic Effect via PTP1B and PI3K/Akt2 Signaling Pathway in Skeletal Muscle of KKAY Mice. *Int J Endocrinol.* 2014; 2014: 312452.
- Kemendes RI. 2013. *Riset Kesehatan Dasar 2013*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Liu, Z., I.Y. Patil, T. Jiang, H. Sancheti, J.P. Walsh, B.L. Stiles, F. Yin, dan E. Cadenas. 2015. High-fat diet induces hepatic insulin resistance and impairment of synaptic plasticity. *PLoS One.* 2015 May 29;10(5):e0128274.
- Morino, K., K.F. Petersen, G.I. Shulman. 2006 Molecular Mechanisms of Insulin Resistance in Humans and Their Potential Links With Mitochondrial Dysfunction. *Diabetes*, Vol. 55, Supplement 2, December 2006.
- Notoatmodjo, S. 2012. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Noviasari, S., F. Kusnandar, A. Setiyono, dan S. Budijanto. 2015. Beras Analog Sebagai Pangan Fungsional Dengan Indeks Glikemik Rendah. *J. Gizi Pangan*, November 2015, 10(3): 225-232.
- Peñacarrillo, M.L.V., J. Puente, A. Redondo, F. Clemente, dan I. Valverde. 2001. Effect of GLP-1 Treatment on GLUT2 and GLUT4 Expression in Type 1 and Type 2 Rat Diabetic Models. *Endocrine*, vol. 15, no. 2, 241–248, July 2001.
- Powers, A.C. 2015. *Harrison's Principles of Internal Medicine 19<sup>th</sup> Edition*. New York: Mc Graw-Hill.
- Purnamasari, Dyah. 2014. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Edisi VI*. Jakarta: Interna Publishing.
- Richter, E.A., dan M. Hargreaves. 2013. Exercise, Glut4, and Skeletal Muscle Glucose Uptake. *Physiol Rev* 93: 993–1017, 2013.
- Sakinah, E.N. 2013. Pharmacodynamics Study of Cholecalciferol to Glut4 Protein Translocation in Muscle Fiber of Hyperglycemia Mice Which Inducted by Streptozotocin. *Folia Medica Indonesiana* Vol. 49 No. 3 July - September 2013 : 134-138.

- Shanik, M.H., Y. Xu, J. Škrha, R. Dankner, Y. Zick, dan J. Roth. 2008 Insulin Resistance and Hyperinsulinemia. *Diabetes Care* 2008 Feb; 31(Supplement 2): S262-S268.
- Satoh, Takaya. 2014. Molecular Mechanisms for the Regulation of Insulin-Stimulated Glucose Uptake by Small Guanosine Triphosphatases in Skeletal Muscle and Adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 18677-18692.
- Shulman, G.I. 2000. Cellular Mechanisms of Insulin Resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, July 2000, Volume 106, Number 2.
- Soelistijo, S.A., H. Novida, A. Rudijanto, P. Soewondo, K. Suastika, A. Manaf, H. Sanusi, D. Lindarto, A. Shahab, B. Pramono, Y.A. Langi, D. Purnamasari, N.N. Soetedjo, M.R. Saraswati, M.P. Dwipayana, A. Yuwono, L. Sasiarini, Sugiarto, K.W. Sucipto, dan H. Zufry. 2015. *Konsensus Pengelolaan Dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 Di Indonesia 2015*. Jakarta: PB PERKENI.
- Song Y.J., M. Sawamura, K. Ikeda, S. Igawa, Y. Yamori. 2000. Soluble dietary fibre improves insulin sensitivity by increasing muscle GLUT-4 content in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000 Jan-Feb;27(1-2):41-5.
- 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* Volume 52, Issue 4, October 2005, Pages 313–320
- Stöckli, J., D.J. Fazakerley, dan D.E. James. 2011. GLUT4 exocytosis. *Journal of Cell Science* 124, 4147–4159.
- Subagio, A., Y. Witono, D. Hermanuadi, A. Nafi, dan W.S. Windrati. 2012. Pengembangan “Beras Cerdas” Sebagai Pangan Pokok Alternatif Berbahan Baku Mocaf. *Prosiding InSINas*: PG-157-PG160.
- Sudarmadji, S., B. Haryono, dan Suhardi. 1997. *Prosedur Analisis untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Supriyanto. 2004. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kedelai Terhadap Kolesterol Total, LDL, HDL, dan Rasio LDL/HDL Darah Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) yang Mengalami Hiperkolesterolemia. Tesis. Surabaya: Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.

- Tarigan, H. 2003. Dilema pangan beras Indonesia. *Tabloid Sinar Tani*: 23 April 2003.
- Tolhurst, G., H. Heffron, Y.S. Lam, H.E. Parker, A.M. Habib, E. Diakogiannaki, J. Cameron, J. Grosse, F. Reimann, F.M. Gribble. 2012. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes*. 2012 Feb;61(2):364-71.
- Turner, N.D., dan J. R. Lupton. 2011. Dietary Fiber. *Adv. Nutr.* 2: 151–152, 2011
- Webster, J.D., M. A. Miller, D. DuSold, dan J. Ramos-Vara. 2009. Effects of Prolonged Formalin Fixation on Diagnostic Immunohistochemistry in Domestic Animals. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* Volume 57(8): 753–761, 2009.
- Wilcox, G. 2005. Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem Rev.* 2005 May; 26(2): 19–39.
- Wulansari, D.D., A.Basori, Suhartati. 2017. Effect of Papaya Seed Extract (*Carica papaya Linn.*) on Glucose Transporter 4 (GLUT 4) Expression of Skeletal Muscle Tissue in Diabetic Mice Induced by High Fructose Diet. *Trad. Med. J.*, May - August 2017 Vol. 22(2), p 131-137.
- Yavorska, N. 2012. Sodium Alginate — A Potential Tool for Weight Management: Effect on Subjective Appetite, Food Intake, and Glycemic and Insulin Regulation. *Journal of Undergraduate Life Sciences*, Volume 6, Issue 1, Spring 2012.
- Yunir, E., dan S. Soebardi. 2009. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Edisi V*. Jakarta: Interna Publishing.
- Zhao, F., dan A. F. Keating. 2007. Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. *Current Genomics*, 2007, 8, 113-128.
- Zhang, M., X. Yan, J. Li, Z. 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; 2008: 704045.

**LAMPIRAN**

Lampiran 3.1 Susunan Diet Standar Formula ITB per 10 kg\* (Supriyanto, 2004)

<b>Bahan Makanan</b>	<b>Jumlah</b>
Tepung jagung	2,5 Kg
Tepung terigu	3,4 Kg
Tepung kacang hijau	1,4 Kg
Tepung ikan	1,6 Kg
Lemak babi	0,8 Kg
Vitamin B1	0,48 g
Vitamin B2	1,2 g
Nikotinamid	12,0 g
Kalsium pentotenat	2,4 g
Vitamin B6	0,4 g
Kolin bitartat	45,6 g
Multivitamin**	40,0 g

Keterangan:

\* Makanan dibuat dalam bentuk pelet

\*\* Tiap gram multivitamin mengandung:

- 100.000 UI vitamin A
- 1000 UI vitamin D
- 50 mg vitamin B2
- 80 UI vitamin E

Lampiran 3.2 Komposisi Beras Analog disusun oleh Hairrudin *et al.* (belum dipublikasikan)

Bahan	Kebutuhan Bahan 10 Kg/Kelompok	
	BA1	BA2
Mocaf (g)	2700	4050
Tepung beras (g)	3600	2250
Tepung jagung (g)	2700	2700
Minyak sawit (g)	374	420
Sodium alginat (g)	350	400
Soy protein (g)	310	180

#### Lampiran 4.1 Metode Pengukuran Serat

Sampel kering sebanyak 2 gram diekstraksi lemaknya dengan soxhlet kemudian dipindahkan ke dalam erlenmeyer 600 ml dan kalau ditambahkan 0,5 gram asbes yang telah dipijarkan dan 3 tetes anti buih. Kemudian ditambahkan 200 ml larutan  $H_2SO_4$  mendidih (1,25 g  $H_2SO_4$  pekat/100 ml = 0,225 N  $H_2SO_4$ ) dan ditutup pendingin balik kemudian dididihkan selama 30 menit dan digoyang-goyang. Suspensi kemudian disaring dengan kertas saring dan residu yang tertinggal dalam erlenmeyer dicuci dengan aquades mendidih. Residu dalam kertas saring dicuci sampai air cucian tidak bersifat asam lagi (uji dengan kertas lakmus). Residu dalam kertas saring dipindahkan secara kuantitatif ke dalam erlenmeyer kembali dengan spatula dan sisanya dicuci dengan larutan NaOH mendidih (1,25 g NaOH/100 ml = 0,313 N NaOH) sebanyak 200 ml sampai semua residu masuk ke dalam erlenmeyer. Cairan kemudian dididihkan dengan pendingin balik selama 30 menit sambil digoyang-goyangkan. Residu kemudian disaring dengan kertas saring yang diketahui beratnya sambil dicuci dengan larutan  $K_2SO_4$  10%. Residu kemudian dicuci dengan aquades mendidih dan dicuci dengan lebih kurang 15 ml alkohol 95%. Kertas saring dengan isinya kemudian dikeringkan pada suhu  $110^\circ C$  sampai berat konstan (1-2 jam), didinginkan dalam eksikator dan ditimbang.

$$\text{Kadar serat (\%)} = \frac{\text{berat serat kasar (g)}}{\text{berat serat sampel (g)}} \times 100\%$$

**Lampiran A. Ethical Clearance****A.1a Halaman Pertama Lembar Ethical Clearance**

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :  
fk\_unej@telkom.net**KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK***ETHICAL APPROVA*

Nomor : 1 167 /H25.1.11/KE/2017

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

*The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :*

**EFEK KANDUNGAN SERAT PADA BERAS ANALOG TERHADAP EKSPRESI GLUT 4 OTOT RANGKA TIKUS WISTAR MODEL DIABETES**

Nama Peneliti Utama : Azka Darajat  
*Name of the principal investigator*

NIM : 142010101085

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember  
*Name of institution*

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.  
*And approved the above mentioned proposal.*

Jember, 20 Oktober 2017  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
  
Rizki Rizanti, Sp.PK

**A.1b Halaman Kedua Lembar *Ethical Clearence*****Tanggapan Anggota Komisi Etik**

(Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya)

**Review Proposal :**

- Pemilihan, perawatan, perlakuan, pengorbanan dan pemusnahan hewan coba mengacu pada buku pedoman etik penelitian kesehatan ( Penggunaan hewan coba dengan prinsip 3R : *Reduced, Reused, Redefined*)
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan & pembacaan preparat IHC
- Pembacaan preparat IHC dilakukan oleh orang yang kompeten, minimal oleh 2 orang serta menggunakan metode blinding.
- Mohon diperhatikan pembuangan limbah medis dan limbah B3 agar tidak mencemari lingkungan

Mengetahui  
Ketua Komisi Etik Penelitian



dr. Desie Dwi Wisudanti, Sp.PK

Jember, 10 Oktober 2017

Reviewer

dr. Desie Dwi Wisudanti, M.Biomed

**Lampiran B. Perhitungan Dosis STZ**

1. Dosis STZ = 35 mg/KgBB
2. Kebutuhan STZ untuk 1 ekor tikus BB 180 gr  
 $180 \times 35 : 1000 = 6,3 \text{ mg/ekor}$
3. Kebutuhan STZ untuk 18 ekor tikus BB 180 gr  
 $6,3 \times 18 = 113,4 \text{ mg}$
4. Konsentrasi STZ dalam *buffer sitrat* adalah 22,5 mg/mL. Jumlah yang diinjeksikan ke setiap tikus secara intra peritoneal adalah sebagai berikut  
 $6,3 \times 1 : 22,5 = 0,28 \text{ mL}$

**Lampiran C. Dokumentasi Penelitian**



B.1 Mesin beras analog



B.2 Beras analog



B.3 Perawatan tikus



B.4 Terminasi hewan coba

## Lampiran D. Data Penelitian

## D.1 Lampiran hasil pengukuran IRS

Kelompok	Tikus	Pemeriksa 1					Pemeriksa 2					MEDIAN	IQR	Ekspresi
		LP1	LP2	LP3	LP4	LP5	LP1	LP2	LP3	LP4	LP5			
A1	2	8	8	4	8	8	8	8	4	8	8	8	0	SEDANG
	3	4	4	4	4	4	8	8	4	4	4	4	0	SEDANG
	7	4	4	4	8	8	8	8	8	8	8	8	3	SEDANG
	13	4	8	3	8	8	8	8	6	8	8	8	1,5	SEDANG
	22	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	SEDANG
	36	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0	SEDANG
A2	5	6	4	4	4	4	6	6	6	6	4	5	2	SEDANG
	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0	SEDANG
	10	8	8	6	8	8	8	8	8	8	8	8	0	SEDANG
	21	8	4	4	8	3	8	4	8	8	6	7	4	SEDANG
	29	8	8	4	8	4	8	8	6	8	6	8	2	SEDANG
	32	4	4	6	6	6	8	8	8	8	8	7	2	SEDANG
A4	6	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0	SEDANG
	16	2	2	3	3	3	3	3	4	4	4	3	0,75	LEMAH
	23	2	2	2	2	3	4	4	4	4	6	3,5	2	LEMAH
	28	4	4	2	2	2	4	4	2	2	2	2	2	LEMAH
	38	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1,5	1	NEGATIF
	40	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0	SEDANG
KO	44	4	4	4	6	6	4	6	6	6	8	6	2	SEDANG
	45	8	8	8	6	6	8	8	8	6	6	8	2	SEDANG
	46	4	4	4	2	4	8	6	6	6	6	5	2	SEDANG
	47	8	8	8	6	8	8	8	8	8	8	8	0	SEDANG
	48	4	4	8	8	6	8	6	8	8	8	8	2	SEDANG
	49	8	8	6	6	6	4	8	8	8	8	8	2	SEDANG

## D.2 Lampiran kadar glukosa sebelum dan setelah pemberian STZ

Kelompok	Tikus	Sebelum STZ	Setelah STZ	Setelah Perlakuan
PBA1	1	84	408	76
	2	72	579	70
	3	87	249	61
	4	89	408	66
	5	95	419	90
	6	101	401	85
PBA2	1	111	170	91
	2	75	522	143
	3	95	319	93
	4	101	445	81
	5	89	390	96
	6	106	374	79
PB	1	103	568	62
	2	100	369	102
	3	70	353	75
	4	107	408	95
	5	57	147	86
	6	85	429	116
KO*	1	81	78	77
	2	78	112	69
	3	76	81	77
	4	70	112	67
	5	89	120	85
	6	106	90	80

\*tidak diberikan HFD dan STZ

## D.3 Lampiran intake makanan per hari

Kelompok	Tikus	Intake per hari (gram)
PBA1	1	19,11
	2	17,82
	3	18,81
	4	18,43
	5	17,20
	6	17,47
PBA2	1	18,38
	2	18,30
	3	18,81
	4	18,23
	5	18,45
	6	18,16
PB	1	19,58
	2	17,80
	3	19,27
	4	17,95
	5	17,11
	6	19,33
KO	1	17,05
	2	17,00
	3	17,32
	4	17,20
	5	17,19
	6	17,36

## D.4 Lampiran rata-rata BB tikus setelah induksi DM

Kelompok	$\bar{X} \pm$ Standar Deviasi
PBA1	204 $\pm$ 20,96
PBA2	191 $\pm$ 26,37
PB	209 $\pm$ 14,79
KO*	149 $\pm$ 23,42

\*tidak diberikan HFD dan STZ

## Lampiran E. Analisis Data

### E.1 Analisis Data Induksi DM

#### E.1.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Tests of Normality							
	KELOMPOK	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
GDP	NORMAL	,267	6	,200*	,872	6	,236
	HFD+SZT	,163	18	,200*	,929	18	,184

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

#### E.1.2 Uji Levene dan independent-sample T test

Independent Samples Test									
	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
GDP Equal variances assumed	3,807	,064	-6,007	22	,000	-287,72222	47,90113	387,06308	188,38137
GDP Equal variances not assumed			-10,229	19,237	,000	-287,72222	28,12819	346,54613	228,89831

## E.2 Analisis Data Ekspresi GLUT4

### E.2.1 Uji *Kruskal Wallis*

	KELOMPOK	N	Mean Rank
IRS	PBA1	6	14,50
	PBA2	6	14,50
	PB	6	6,50
	KO	6	14,50
	Total	24	

	IRS
Chi-Square	13,714
df	3
Asymp. Sig.	,003

### E.2.2 Uji *Mann Whitney*

#### a. Kelompok PBA1 terhadap PBA2

	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IRS	PBA1	6	6,50	39,00
	PBA2	6	6,50	39,00
	Total	12		

	IRS
Mann-Whitney U	18,000
Wilcoxon W	39,000
Z	,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000 <sup>b</sup>

#### b. Kelompok PBA1 terhadap PB

	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IRS	PBA1	6	8,50	51,00
	PB	6	4,50	27,00
	Total	12		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	IRS
Mann-Whitney U	6,000
Wilcoxon W	27,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,065 <sup>b</sup>

c. Kelompok PBA1 terhadap KO

**Ranks**

	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IRS	PBA1	6	6,50	39,00
	KO	6	6,50	39,00
	Total	12		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	IRS
Mann-Whitney U	18,000
Wilcoxon W	39,000
Z	,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000 <sup>b</sup>

d. Kelompok PBA2 terhadap PB

**Ranks**

	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IRS	PBA2	6	8,50	51,00
	PB	6	4,50	27,00
	Total	12		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	IRS
Mann-Whitney U	6,000
Wilcoxon W	27,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,065 <sup>b</sup>

## e. Kelompok PBA2 terhadap KO

Ranks				
	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IRS	PBA2	6	6,50	39,00
	KO	6	6,50	39,00
	Total	12		

Test Statistics <sup>a</sup>		IRS
Mann-Whitney U		18,000
Wilcoxon W		39,000
Z		,000
Asymp. Sig. (2-tailed)		1,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		1,000 <sup>b</sup>

## f. Kelompok PB terhadap KO

Ranks				
	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IRS	PB	6	4,50	27,00
	KO	6	8,50	51,00
	Total	12		

Test Statistics <sup>a</sup>		IRS
Mann-Whitney U		6,000
Wilcoxon W		27,000
Z		-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)		,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		,065 <sup>b</sup>

E.2.3 Uji Korelasi *Spearman*

Correlations				
			Serat	IRS
Spearman's rho	Serat	Correlation Coefficient	1,000	,651**
		Sig. (2-tailed)	.	,003
		N	18	18
	IRS	Correlation Coefficient	,651**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,003	.
		N	18	18

### E.3 Analisis Data Intake Makanan

#### E.3.1 Uji *Kruskal Wallis*

	KELOMPOK	N	Mean Rank
INTAKE	PBA1	6	13,83
	PBA2	6	15,92
	PB	6	15,67
	KO	6	4,58
	Total	24	

	INTAKE
Chi-Square	10,347
df	3
Asymp. Sig.	,016

#### E.3.2 Uji *Mann Whitney*

##### a. Kelompok PBA1 terhadap PBA2

	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
INTAKE	PBA1	6	6,08	36,50
	PBA2	6	6,92	41,50
	Total	12		

	INTAKE
Mann-Whitney U	15,500
Wilcoxon W	36,500
Z	-,401
Asymp. Sig. (2-tailed)	,688
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,699 <sup>b</sup>

##### b. Kelompok PBA1 terhadap PB

	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
INTAKE	PBA1	6	5,67	34,00
	PB	6	7,33	44,00
	Total	12		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	INTAKE
Mann-Whitney U	13,000
Wilcoxon W	34,000
Z	-,801
Asymp. Sig. (2-tailed)	,423
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,485 <sup>b</sup>

## c. Kelompok PBA1 terhadap KO

**Ranks**

	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
INTAKE	PBA1	6	9,08	54,50
	KO	6	3,92	23,50
	Total	12		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	INTAKE
Mann-Whitney U	2,500
Wilcoxon W	23,500
Z	-2,486
Asymp. Sig. (2-tailed)	,013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,009 <sup>b</sup>

## d. Kelompok PBA2 terhadap PB

**Ranks**

	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
INTAKE	PBA1	6	9,08	54,50
	KO	6	3,92	23,50
	Total	12		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	INTAKE
Mann-Whitney U	2,500
Wilcoxon W	23,500
Z	-2,486
Asymp. Sig. (2-tailed)	,013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,009 <sup>b</sup>

## e. Kelompok PBA2 terhadap KO

Ranks				
	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IRS	PBA2	6	6,50	39,00
	KO	6	6,50	39,00
	Total	12		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	IRS
Mann-Whitney U	18,000
Wilcoxon W	39,000
Z	,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000 <sup>b</sup>

## f. Kelompok PB terhadap KO

Ranks				
	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
INTAKE	PB	6	8,83	53,00
	KO	6	4,17	25,00
	Total	12		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	INTAKE
Mann-Whitney U	4,000
Wilcoxon W	25,000
Z	-2,242
Asymp. Sig. (2-tailed)	,025
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,026 <sup>b</sup>