



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KAYU SECANG
(*Caesalpinia sappan* L.) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHID
PLASMA DAN JARINGAN HATI TIKUS DIABETES YANG
DIINDUKSI ALOKSAN**

SKRIPSI

Oleh:

Dwi Aftianingsih

NIM 152210101131

**BAGIAN FARMASI KLINIK DAN KOMUNITAS
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KAYU SECANG
(*Caesalpinia sappan* L.) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHID
PLASMA DAN JARINGAN HATI TIKUS DIABETES YANG
DIINDUKSI ALOKSAN**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan pendidikan di Fakultas Farmasi
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh:

**Dwi Aftianingsih
NIM 152210101131**

**BAGIAN FARMASI KLINIK DAN KOMUNITAS
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayahNya.
2. Bapak Suroto dan Ibu Painten sebagai tanda bakti, hormat, dan rasa terimakasih atas segala doa dan dukungan yang telah dilakukan demi kebahagiaan dan kesuksesan penulis.
3. Guru, Dosen, dan pendidik Fakultas Farmasi Universitas Jember, SMAN 1 Purwoharjo, SMPN 1 Purwoarjo, MI/NU 1 Sidorejo, dan TK Kartini Sidorejo yang telah memberikan ilmu dan pengetahuan.
4. Teman-teman angkatan 2015 LIBITUM yang telah memberikan semangat dan pengalaman selama masa perkuliahan.
5. Almamater tercinta, Fakultas Farmasi Universitas Jember

MOTO

Boleh jadi kamu tidak menyenangi sesuatu, padahal ia amat baik bagimu, dan boleh jadi kamu menyukai sesuatu, padahal itu tidak baik bagimu. Allah mengetahui, sedang kamu tidak mengetahui.

(terjemahan Surat *Al-Baqarah* ayat 216)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Dwi Aftianingsih

NIM : 152210101131

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) Terhadap Kadar Malondialdehid Plasma dan Jaringan Hati Tikus Diabetes yang Diinduksi Aloksan” 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 dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 25 Juli 2019

Yang menyatakan,

Dwi Aftianingsih

NIM 152210101131

SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KAYU SECANG (*Caesalpinia sappan* L.) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHID PLASMA DAN JARINGAN HATI TIKUS DIABETES YANG DIINDUKSI ALOKSAN

Oleh:

Dwi Aftianingsih
NIM 152210101131

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Diana Holiday, S.F., M.Farm., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : Ika Puspita Dewi, S.Farm., M. Biomed., Apt.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) Terhadap Kadar Malondialdehid Plasma dan Jaringan Hati Tikus Diabetes yang Diinduksi Aloksan” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : Jumat, 26 Juli 2019

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Tim Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Diana Holidah, S.F., M.Farm., Apt.
NIP. 197812212005012002

Ika Puspita Dewi, S.Farm., M. Biomed., Apt.
NIP. 198406132008122001

Tim Penguji :

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,

Fransiska Maria C., S.Farm., M.Farm., Apt.
NIP. 198404062009122008

Sinta Rachmawati, S.Farm., M.P.H., Apt.
NIP. 198610172009122006

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember

Lestyo Wulandari, S. Si., M. Farm., Apt.
NIP. 197604142002122001

RINGKASAN

Pengaruh Pemberian Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) Terhadap Kadar Malondialdehid Plasma dan Jaringan Hati Tikus Diabetes yang Diinduksi Aloksan: Dwi Aftianingsih, 152210101131; 68 halaman: Fakultas Farmasi Universitas Jember.

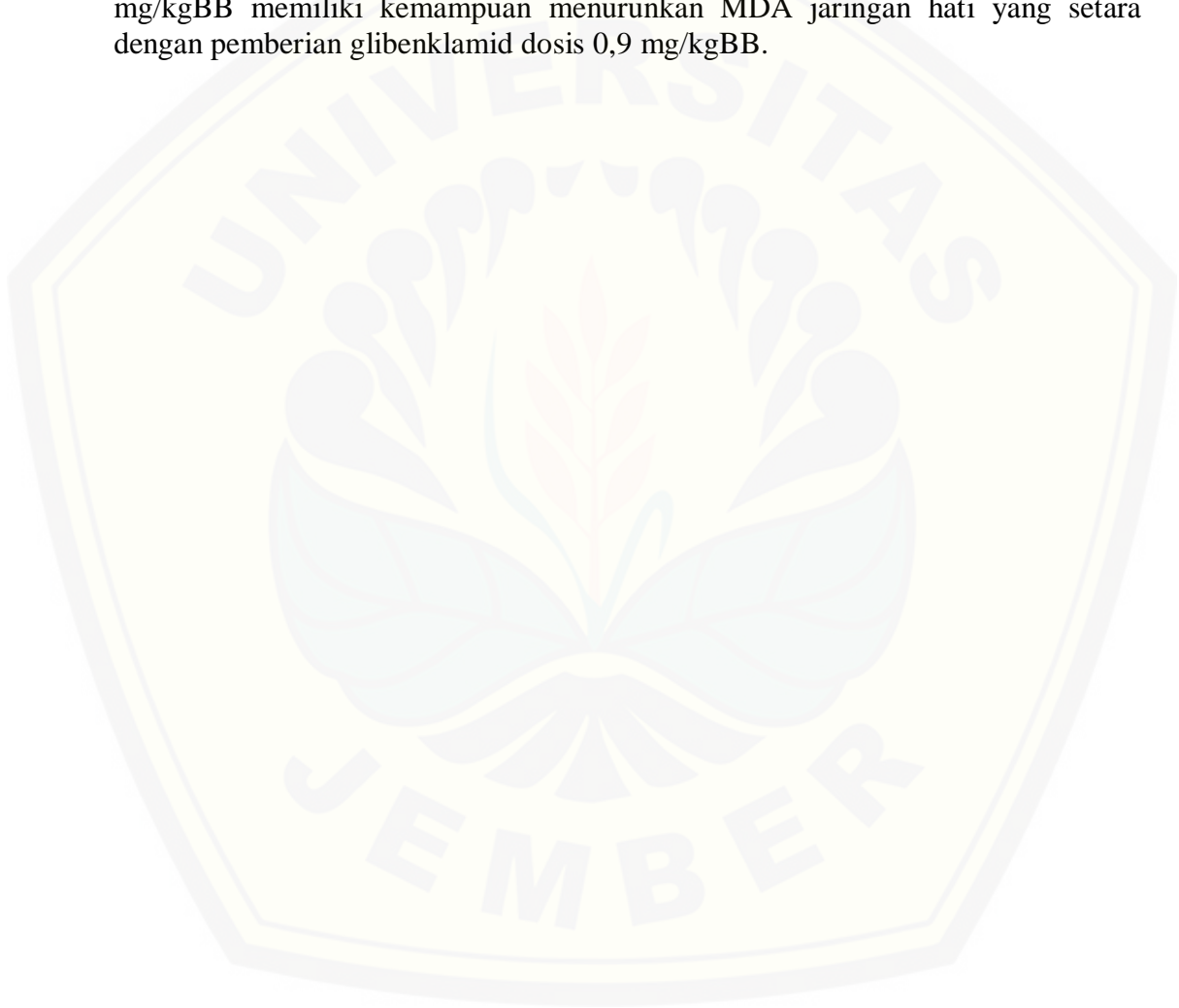
Diabetes melitus (DM) adalah penyakit metabolik yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemia) serta gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. Diabetes melitus dapat terjadi karena defisiensi insulin, resistensi insulin, atau keduanya. Hiperglikemia pada DM menyebabkan terbentuknya radikal bebas karena proses autooksidasi glukosa dan glikosilasi protein. Radikal bebas yang terbentuk akan mengaktifkan sejumlah mekanisme pro-oksidatif yaitu peningkatan ekspresi *receptor advanced glycation end products* (RAGEs), peningkatan produksi *advanced glycation end products* (AGEs) intraseluler, peningkatan fluks glukosa dan gula lain melalui jalur poliol, aktivasi isoform protein kinase C, dan peningkatan aktivasi jalur heksosamin. Kelima mekanisme tersebut menyebabkan peningkatan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) yang memicu terjadinya stres oksidatif. ROS akan bereaksi dengan membran lipid yang kaya *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) dan menyebabkan peroksidasi lipid. Aktivitas radikal bebas dan peroksidasi lipid yang tinggi berperan penting dalam kerusakan sel beta pankreas, penuaan (*aging*), aterosklerosis, dan menyebabkan kerusakan jaringan seperti jaringan hati. Kerusakan jaringan hati terjadi karena resistensi insulin pada DM akan menghambat pengambilan glukosa dan menstimulasi pelepasan *free fatty acid* (FFA) sehingga terjadi akumulasi lipid dalam sel hepatosit. ROS akan menyerang karbon-karbon ikatan rangkap lipid kaya *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) sehingga menyebabkan peroksidasi lipid dan menghasilkan produk akhir berupa malondialdehid (MDA). Peningkatan kadar MDA di dalam tubuh dapat dikurangi dengan pemberian antioksidan dari luar tubuh. Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai sumber antioksidan adalah kayu secang.

Kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) mengandung senyawa brazilin yang termasuk ke dalam golongan flavonoid. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa brazilin memiliki kapasitas antioksidan yang mampu menangkal radikal bebas di dalam tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol kayu secang dengan dosis 50, 100, dan 400 mg/kgBB terhadap kadar malondialdehid plasma dan jaringan hati tikus diabetes yang diinduksi aloksan.

Jenis penelitian ini adalah *True Experimental Laboratories* dengan rancangan penelitian *Post-test Control Group Design*. Sampel yang digunakan adalah 24 tikus jantan yang dibagi menjadi 6 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol normal, kontrol negatif, kontrol positif, dan tiga kelompok perlakuan ekstrak etanol kayu secang dengan dosis 50, 100, dan 400 mg/kgBB. Setiap kelompok diinduksi dengan aloksan, kecuali kelompok kontrol normal. Perlakuan diberikan selama 14 hari setelah tikus dinyatakan diabetes dengan kadar glukosa ≥ 200 mg/dL. Pada hari ke-15, tikus diambil darah dari jantung untuk mengukur MDA plasma dan diambil organ hatinya untuk mengukur MDA jaringan hati. Pengukuran kadar MDA plasma dan jaringan hati menggunakan metode

Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) dengan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 532 nm.

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan pada rata-rata kadar MDA plasma dan jaringan hati tikus keenam kelompok perlakuan. Kelompok kontrol negatif berbeda signifikan dengan ketiga kelompok dosis ekstrak etanol kayu secang ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan ekstrak etanol kayu secang memiliki aktivitas menurunkan kadar MDA plasma dan jaringan hati tikus diabetes yang diinduksi aloksan. Selain itu, kelompok kontrol positif tidak berbeda signifikan dengan kelompok ekstrak dosis 100 dan 400 mg/kgBB ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol kayu secang dosis 100 dan 400 mg/kgBB memiliki kemampuan menurunkan MDA jaringan hati yang setara dengan pemberian glibenklamid dosis 0,9 mg/kgBB.



PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) Terhadap Kadar Malondialdehid Plasma dan Jaringan Hati Tikus Diabetes yang Diinduksi Aloksan”. Skripsi ini disusun guna memenuhi persyaratan untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi (S1) di Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Allah SWT atas semua rahmat dan karunia yang telah diberikan;
2. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
3. Ibu Diana Holiday, S.F., M.Farm., Apt. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Ika Puspita Dewi, S.Farm., M.Biomed., Apt. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, serta perhatiannya untuk memberikan ilmu, bimbingan dan pengarahan demi terselesaikannya penulisan skripsi ini;
4. Ibu Fransiska Maria C., S.Farm., M.Farm., Apt. dan Ibu Sinta Rachmawati, S.Farm., M.P.H., Apt. selaku Dosen Penguji yang telah memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
5. Ibu Diana Holiday, S.F., M.Farm., Apt. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah meluangkan waktu untuk membimbing selama masa perkuliahan;
6. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah mengajarkan ilmu pengetahuan yang berguna dalam menyelesaikan skripsi;
7. Mbak Dinik dan Mbak Indri, selaku Teknisi Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah bersedia dengan sabar memberikan banyak bantuan selama menempuh penelitian ini;
8. Bapak Suroto, Ibu Painten, Mbah Giyem, Mbak Ika, Mas Hendra, Mas Amin, Dek Agus, dan Dek Nikmah tercinta yang telah menjadi orangtua dan saudara terbaik yang selalu memberikan banyak motivasi dan nasehat, yang tiada lelah

memberikan kasih sayang, perhatian serta doa yang tiada henti di setiap langkah penulis;

9. Sahabat Lab “PENENTANG TAKDIR” (Noer Sidqi Muhammadiy, Nur Huda, dan Iskandar Parlindungan Artha Siregar) yang telah memberikan dukungan, kebersamaan dalam susah dan senang serta kerjasama terbaik dalam penelitian ini;
10. Sahabatku, “TEMAN SATU ATAP” (Zidni Hafizha, Alik Almawaddah, Nurlaila Velayati, dan Weka Agustin Pratesya) untuk semangat, nasihat dalam hal kebaikan, kebersamaan, canda dan tawa selama perkuliahan ini;
11. Sahabat-sahabat kelas (Mayrani Sholihania, Lelyta Septiandini, Fara Sukma Farkha, Taffana Windy Hananta, dan Iskandar Parlindungan Artha Siregar. Terimakasih telah menerima setiap kekuranganku, berbagi semangat, kebersamaan, dan canda tawa selama di perantauan ini;
12. Keluarga KKN 129 (Yoga, Kafaa, Mas Nizar, Lely, dan Ika. Terimakasih untuk canda tawa 45 hari, dukungan dan semangat bagi penulis untuk segera menyelesaikan skripsi;
13. Keluarga UKKI Asy-Syifa. Terimakasih untuk pengalaman, bimbingan, dukungan, kritik dan saran untuk terus menjadi lebih baik lagi;
14. Keluarga besar LIBITUM Angkatan 2015 atas persaudaraan dan kebersamaan selama perkuliahan;
15. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu dan seluruh do’a yang terucap tanpa sepengetahuan penulis.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran dan kritik dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan maupun penelitian di masa mendatang.

Jember, Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN.....	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan tentang Secang.....	5
2.1.1 Klasifikasi Tanaman Secang	5
2.1.2 Deskripsi Tanaman Secang	5
2.1.3 Kandungan dan Manfaat Kayu Secang	7
2.2 Tinjauan tentang Diabetes Melitus	8
2.2.1 Definisi Diabetes Melitus.....	8
2.2.2 Klasifikasi Diabetes Melitus	8
2.2.3 Manifestasi Klinik Diabetes Melitus	10
2.2.4 Diagnosis Diabetes Melitus.....	10
2.2.5 Penatalaksanaan Diabetes Melitus.....	11
2.3 Tinjauan tentang Glibenklamid.....	13

2.4 Tinjauan tentang Aloksan	14
2.5 Tinjauan tentang Radikal Bebas dan Stres Oksidatif	15
2.5.1 Radikal Bebas.....	15
2.5.2 Hubungan Stres Oksidatif dan Diabetes Melitus	16
2.6 Tinjauan tentang Malondialdehid	17
2.7 Tinjauan tentang Analisis MDA	18
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	20
3.1 Jenis Penelitian	20
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	20
3.3 Jumlah Sampel	20
3.4 Rancangan Penelitian	21
3.5 Alat dan Bahan	22
3.5.1. Alat	22
3.5.2. Bahan.....	22
3.6. Variabel Penelitian	22
3.6.1. Variabel Bebas	22
3.6.2. Variabel Terikat	22
3.6.3 Variabel Terkendali.....	23
3.7. Definisi Operasional	23
3.8. Prosedur Penelitian	23
3.8.1 Tahapan Persiapan	23
3.8.2 Adaptasi Hewan Uji	25
3.8.3 Induksi Aloksan	25
3.8.4 Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Uji	25
3.8.5 Pengambilan Sampel Darah.....	26
3.8.6 Penentuan Kadar MDA	27
3.8.7 Pengambilan Sampel Jaringan Hati Hewan Uji.....	28
3.8.8 Pengukuran Kadar MDA Jaringan Hati Hewan Uji.....	28
3.9 Analisis Data	29
3.10 Skema Rangkaian Kerja	30
3.10.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Kayu Secang	30

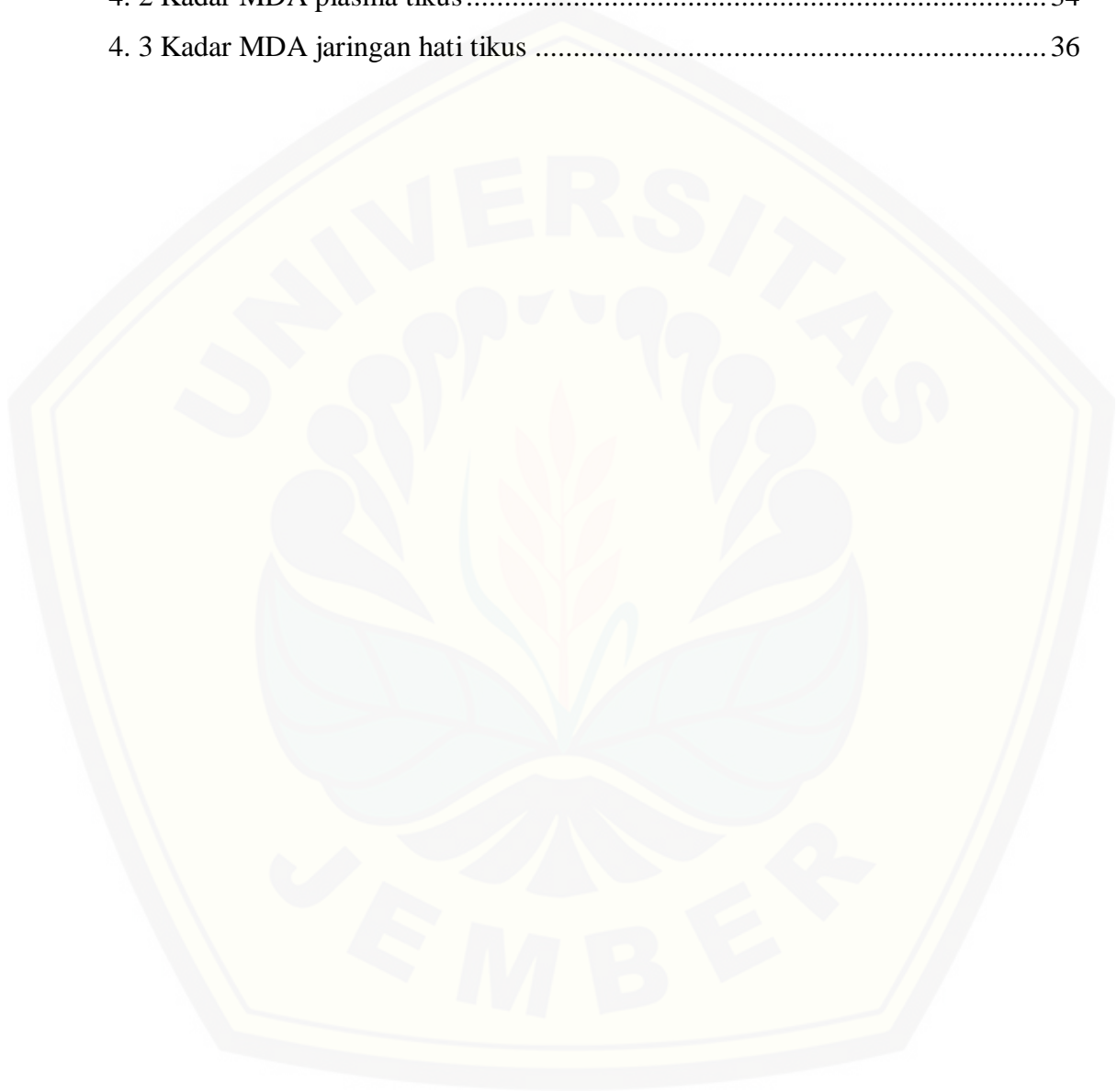
3.10.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kayu Secang terhadap Kadar MDA Plasma dan Jaringan Hati.....	31
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
4.1 Hasil.....	32
4.1.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Kayu Secang	32
4.1.2 Pengukuran Kadar MDA Plasma.....	32
4.1.3 Pengukuran Kadar MDA Jaringan Hati Tikus.....	36
4.2 Pembahasan.....	38
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	43
5.1 Kesimpulan.....	43
5.2 Saran.....	43
DAFTAR PUSTAKA.....	44
LAMPIRAN	50

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Tanaman <i>Caesalpinia sappan</i> L.	6
2.2 Struktur glibenklamid.....	13
2.3 Struktur aloksan	15
2.4 Skema pembentukan MDA dari PUFA.....	18
2.5 Reaksi membentuk kompleks MDA-TBA	19
3. 1 Skema rancangan penelitian	21
3. 2 Skema Pembuatan Ekstrak Kayu Secang	30
3. 3 Skema Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kayu Secang terhadap Kadar MDA Plasma dan Jaringan Hati	31

DAFTAR TABEL

	Halaman
4. 1 Kadar glukosa darah tikus sebelum dan sesudah perlakuan.....	33
4. 2 Kadar MDA plasma tikus.....	34
4. 3 Kadar MDA jaringan hati tikus	36



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
4. 1 Determinasi Kayu Secang	50
4. 2 Persetujuan Komisi Etik Penelitian Kesehatan.....	51
4. 3 Perhitungan Larutan Alokasan Dosis 135 mg/kgBB	52
4. 4 Perhitungan Dosis Glibenklamid 0,9 mg/kgBB	53
4. 5 Perhitungan Dosis Ekstrak Etanol Kayu Secang	54
4. 6 Perhitungan Konsentrasi Baku MDA.....	56
4. 7 Perhitungan Pembuatan Reagen	59
4. 8 Perhitungan Rendemen Ekstrak Etanol Kayu Secang	60
4. 9 Kurva Baku MDA	61
4. 10 Kadar MDA Plasma	62
4. 11 Kadar MDA Jaringan Hati.....	63
4. 12 Hasil Analisis Data Kadar MDA Plasma	64
4. 13 Hasil Analisis Data Kadar MDA Jaringan Hati.....	66
4. 14 Dokumentasi	68

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus (DM) adalah penyakit metabolik yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemia) serta gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein (DiPiro dkk., 2015). Diabetes melitus dapat dibedakan menjadi 3 tipe yaitu diabetes melitus tipe 1 yang ditandai dengan defisiensi insulin yang disebabkan oleh kerusakan sel β pankreas karena proses autoimun, diabetes melitus tipe 2 yang ditandai dengan produksi insulin yang tidak memadai (defisiensi insulin) dan resistensi insulin, serta *Gestational Diabetes Mellitus* (GDM) yang merupakan kondisi intoleransi glukosa yang terjadi pada masa kehamilan. DM tipe 2 merupakan tipe diabetes yang paling sering terjadi dan memiliki prevalensi 90% dari total keseluruhan kasus diabetes (IDF, 2017).

Prevalensi diabetes melitus cenderung meningkat setiap tahunnya. Jumlah penderita DM usia >18 tahun mengalami peningkatan dari 108 juta penderita (4,7%) pada tahun 1980 menjadi 422 juta penderita (8,5%) pada tahun 2014 (WHO, 2016). Prevalensi DM di Indonesia berdasarkan diagnosis dokter pada penduduk usia ≥ 15 tahun meningkat dari 1,5% pada tahun 2013 menjadi 2,0% pada tahun 2018 (Riskesdas, 2018). Indonesia merupakan negara dengan jumlah penderita DM tertinggi ke-6 di dunia setelah China, India, Amerika Serikat, Brazil, dan Mexico, dengan jumlah penderita sekitar 10,3 juta (8,9-11,1%) pada tahun 2017 dan diprediksi meningkat menjadi 16,7 juta (14,6-18,2%) pada tahun 2045 (IDF, 2017).

Hiperglikemia pada DM menyebabkan terbentuknya radikal bebas karena proses autooksidasi glukosa dan glikosilasi protein (Fatani dkk., 2016). Radikal bebas yang terbentuk akan mengaktifkan sejumlah mekanisme pro-oksidatif yaitu peningkatan ekspresi *receptor advanced glycation end products* (RAGEs), peningkatan produksi *advanced glycation end products* (AGEs) intraseluler, peningkatan fluks glukosa dan gula lain melalui jalur poliol, aktivasi isoform protein kinase C, dan peningkatan aktivasi jalur heksosamin. Kelima mekanisme tersebut menyebabkan peningkatan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) dalam mitokondria yang memicu terjadinya stres oksidatif (Madiseh dkk., 2016).

Stres oksidatif adalah suatu kondisi ketika produksi ROS melebihi aktivitas pertahanan antioksidan dari dalam tubuh (Fatani dkk., 2016). Jika pembentukan ROS melebihi kapasitas antioksidan, ROS dapat bereaksi dengan makromolekul seperti lipid, protein, dan DNA yang menyebabkan disfungsi sel. Reaksi ROS dengan membran lipid yang kaya *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) akan menyebabkan peroksidasi lipid dan membentuk produk akhir berupa malondialdehid (MDA) (Jusman dan Halim, 2009). Tingginya aktivitas radikal bebas dan peroksidasi lipid berperan penting dalam kerusakan sel beta pankreas, penuaan (*aging*), aterosklerosis, dan komplikasi diabetes (Ghazizadeh dkk., 2019). Selain itu, peroksidasi lipid juga akan menyebabkan kerusakan jaringan seperti jaringan hati (Wikanta dkk., 2010).

Hati merupakan organ yang bertanggung jawab pada proses glukoneogenesis dan glikogenesis. Resistensi insulin akan menghambat pengambilan glukosa dan menstimulasi pelepasan *free fatty acid* (FFA) sehingga terjadi akumulasi lipid dalam sel hepatosit (Salway, 2012; Szendroedi dkk., 2012). Peningkatan lipid hepatoseluler menyebabkan membran mikrosom hati sangat rentan terhadap peroksidasi lipid. Proses peroksidasi lipid pada mikrosom hati dapat berlangsung secara enzimatis dan nonenzimatis (Catala, 2012). ROS akan menyerang lipid yang mengandung karbon-karbon ikatan rangkap terutama *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) sehingga menghasilkan produk utama berupa lipid hidroperoksida dan produk sekunder berupa aldehid seperti *malondialdehyde* (MDA), *propanal*, *hexanal*, dan *4-hydroxynonenal* (Fatani dkk., 2016).

Biomarker yang sering digunakan untuk mengevaluasi stres oksidatif adalah malondialdehid (MDA) (Fatani dkk., 2016). MDA terbentuk sebagai hasil dari peroksidasi lipid dan memberikan indikasi tingkat peroksidasi lipid keseluruhan (Ghazizadeh dkk., 2019). Hubungan antara kadar MDA dan derajat kerusakan hati adalah makin berat kerusakan hati maka kadar MDA makin tinggi (Safithri dkk., 2018). Pemberian antioksidan dari luar tubuh dapat dilakukan untuk mengurangi peningkatan kadar MDA di dalam tubuh (Winarsi, 2007).

Kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) merupakan salah satu tanaman yang berpotensi sebagai sumber antioksidan. Secang mengandung berbagai macam

komponen bioaktif seperti flavonoid, fenol, brazilin, brazilein, dan protosappanin yang berperan sebagai antioksidan. Antioksidan bekerja dengan menangkal radikal bebas di dalam tubuh sehingga mencegah terjadinya stres oksidatif. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa komponen aktif yang terkandung dalam secang memiliki kemampuan antimikroba, antidiabetik, sitotoksik, hepatoprotektif, dan antitumor (Badami dkk., 2003; Badami dkk., 2004).

Brazilin adalah salah satu senyawa utama di dalam kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) yang termasuk ke dalam golongan flavonoid sebagai isoflavonoid. Flavonoid memiliki beberapa efek diantaranya sebagai agen hipoglikemik, menurunkan kolesterol darah, menghambat pertumbuhan mikroba, bersifat antibiotik, dan menimbulkan efek peningkatan kekebalan tubuh (Fuhrman dan Aviram, 2001). Beberapa penelitian lain menunjukkan bahwa brazilin memiliki kapasitas antioksidan yang berguna untuk menangkal radikal bebas di dalam tubuh. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian *Caesalpinia sappan* dapat menurunkan kadar malondialdehid yang berarti menurunkan kadar peroksidasi lipid pada tikus yang mengalami kerusakan hati (Sarumathy dkk., 2011). Kandungan brazilin dan brazilein yang diisolasi dari ekstrak kayu secang menunjukkan aktivitas antioksidan yang mempengaruhi kondisi stres oksidatif (Choi dkk., 2007).

Berdasarkan uraian diatas, kayu secang memiliki potensi untuk menurunkan kadar MDA pada tikus DM. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol kayu secang dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB terhadap kadar malondialdehid plasma dan jaringan hati tikus diabetes yang diinduksi aloksan. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai efek antioksidan ekstrak etanol kayu secang sebagai alternatif antioksidan alami pada terapi DM.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut:

- a. Apakah pemberian ekstrak etanol kayu secang dapat berpengaruh terhadap kadar MDA plasma dan jaringan hati tikus diabetes yang diinduksi dengan aloksan?
- b. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak etanol kayu secang dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB terhadap kadar malondialdehid plasma dan jaringan hati tikus diabetes yang diinduksi aloksan ?

1.3 Tujuan Penelitian

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

- a. Menentukan pengaruh pemberian ekstrak etanol kayu secang terhadap kadar malondialdehid plasma dan jaringan hati tikus diabetes yang diinduksi dengan aloksan.
- b. Menentukan pengaruh pemberian ekstrak etanol kayu secang dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB terhadap kadar malondialdehid plasma dan jaringan hati tikus diabetes yang diinduksi aloksan.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang pengaruh pemberian ekstrak etanol kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) terhadap penurunan kadar malondialdehid plasma dan jaringan hati tikus diabetes yang diinduksi aloksan sehingga dapat digunakan sebagai alternatif dalam mengatasi stres oksidatif pada pasien diabetes melitus.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Secang

Secang (*Caesalpinia sappan* L.) merupakan salah satu spesies tanaman dari genus *Caesalpinia* yang memiliki sekitar 500 spesies. Secang banyak terdistribusi di seluruh dunia terutama di daerah tropis dan subtropis. Tanaman secang dapat ditemukan secara luas di China, Indonesia, Thailand, Vietnam, Myanmar, Sri Lanka, dan India (Kaur dkk., 2016). Kayu secang umumnya dikenal sebagai *Brazil Wood*, *Sappan Wood*, *patanga-chekke sappanga* (Kanada), dan *Sumu* (Jepang). Kayu secang banyak digunakan dalam Ayurveda dan pengobatan tradisional China (Saefudin dkk., 2014; Nirmal dkk., 2015).

2.1.1 Klasifikasi Tanaman Secang

Klasifikasi tanaman secang menurut *Integrated Taxonomic Information System* (2019) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Infrakingdom	: Streptophyta
Superdivisi	: Embryophyta
Divisi	: Tracheophyta
Subdivisi	: Spermatophytina
Kelas	: Magnosiopsida
Superordo	: Rosanae
Ordo	: Fabales
Famili	: Fabaceae
Genus	: <i>Caesalpinia</i>
Spesies	: <i>Caesalpinia sappan</i> L.

2.1.2 Deskripsi Tanaman Secang

Secang merupakan jenis tanaman perdu berupa pohon kecil, berduri, dengan tinggi mencapai 5–10 meter. Tanaman ini tumbuh pada ketinggian 500 - 1000 meter

di atas permukaan laut dan dapat ditemukan di daerah tropis (Hariana, 2006). Kayu secang banyak dimanfaatkan sebagai pewarna pada minuman. Warna kayu secang adalah jingga (brazilin) dan berubah menjadi merah (brazilein) jika terpapar dengan oksigen (Adawiyah dan Indriati, 2003).



Gambar 2.1 Tanaman *Caesalpinia sappan* L. (Nirmal dkk., 2015).

Tanaman secang memiliki duri berbentuk bengkok dan tersebar di seluruh batang dan cabangnya. Kayu secang berakar tunggang dengan warna cokelat, daun berbentuk majemuk menyirip ganda dengan panjang daun 25 - 40 cm, anak daun berjumlah 10 - 20 pasang dan letaknya berhadapan (Hariana, 2006). Anak daun tidak memiliki tangkai, berbentuk lonjong dengan panjang 10 - 25 mm, dan lebar 3 - 11 mm (Direktorat Obat Asli Indonesia, 2008).

Tanaman secang memiliki jenis bunga majemuk yang tumbuh dari ujung tangkai dengan panjang 10-40 cm, mahkota bunga berbentuk tabung dan berwarna kuning (Prasetyono, 2012). Secang memiliki buah berjenis polong, berbentuk lonjong dan pipih dengan panjang 8 - 10 cm, lebar 3 - 4 cm, ujung seperti paruh berisi 3 - 4 biji dan jika masak akan berwarna hitam. Biji buah secang berbentuk bulat memanjang dengan panjang 15 - 18 mm, lebar 8 - 11 mm, tebal 5 - 7 mm, dan berwarna kuning kecokelatan (Hariana, 2006).

2.1.3 Kandungan dan Manfaat Kayu Secang

Kayu secang secara empiris diketahui memiliki banyak manfaat dan sering dikonsumsi oleh masyarakat sebagai minuman kesehatan. Hasil isolasi senyawa pada ekstrak secang menunjukkan terdapat kandungan senyawa diterpenoid, senyawa aktif flavonoid dan komponen fenolik berupa 4-O-metilsapanol, protosappanin A, protosappanin B, protosappanin E, brazilin, brazilein, caesalpin, *brazilide A*, *neosapanone*, 7,3,4-trihidroksi-3-benzil-2H (Batubara dkk., 2010). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa komponen aktif yang terkandung dalam secang memiliki kemampuan antimikroba, antidiabetik, sitotoksik, hepatoprotektif, dan antitumor (Badami dkk., 2004).

Brazilin adalah salah satu komponen utama penyusun kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.). Senyawa brazilin berupa kristal berwarna kuning yang dapat berubah menjadi merah kecoklatan (brazilein) apabila teroksidasi dan dapat larut dalam air. Brazilin merupakan senyawa golongan flavonoid yang termasuk ke dalam kelompok isoflavonoid. Flavonoid mempunyai sifat menurunkan kadar glukosa darah, menurunkan kolesterol darah, menghambat pertumbuhan mikroba, bersifat antibiotik dan menimbulkan efek peningkatan kekebalan tubuh (Fuhrman dan Aviram, 2001).

Ekstrak metanol kayu secang terbukti memiliki aktivitas antihipoglikemik pada tikus diabetes. Penelitian Chinnala dkk. (2015) membuktikan bahwa pemberian ekstrak metanol kayu secang dari India dengan dosis 200 dan 400 mg/kg BB selama 21 hari mampu menurunkan kadar glukosa darah, kolesterol total, dan trigliserida pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan dibandingkan dengan pemberian glibenklamid 10 mg/kg BB. Mekanisme brazilin dari kayu secang sebagai agen hipoglikemik adalah dengan menghambat glukoneogenesis hepatic. Brazilin meningkatkan kadar *fructose-2,6-bisphosphate* dalam hepatosit dengan cara meningkatkan kadar *fructose-6-phosphate* / *hexose-6-phosphate* intraseluler dan aktivitas *6-phosphofructo-2-kinase*. Peningkatan aktivitas piruvat kinase juga dapat berperan dalam aksi antiglukoneogenik brazilin (You dkk., 2005; Chinnala dkk., 2015).

Ekstrak metanol kayu secang terbukti memiliki aktivitas antioksidan. Penelitian Badami dkk. (2003) membuktikan bahwa pemberian ekstrak metanol dan air kayu secang dosis 50 dan 100 mg/kgBB selama 4 hari meningkatkan kadar superoksida dismutase (SOD) dan katalase serta menurunkan kadar zat reaktif asam tiobarbiturat (TBARS) secara signifikan pada hati dan ginjal dibandingkan dengan kontrol yang diinduksi CCl₄. Pemberian ekstrak metanol kayu secang 100 mg/kgBB menunjukkan perubahan yang sebanding dengan pemberian standar vitamin E 50 mg/kg.

2.2 Tinjauan tentang Diabetes Melitus

2.2.1 Definisi Diabetes Melitus

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit metabolik yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemia) dan gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein (DiPiro dkk., 2015). Kondisi hiperglikemia terjadi karena tubuh tidak dapat memproduksi insulin yang cukup atau tidak dapat menggunakan insulin secara efektif. Insulin merupakan hormon yang diproduksi di dalam kelenjar pankreas dan berfungsi untuk mengubah glukosa menjadi sumber energi. Kurangnya insulin atau ketidakmampuan sel untuk merespon insulin menyebabkan tingginya kadar glukosa dalam darah (hiperglikemia). Hiperglikemia jika dibiarkan dalam jangka panjang dapat memicu timbulnya berbagai komplikasi seperti penyakit kardiovaskular, neuropati, nefropati, retinopati dan kebutaan (IDF, 2017).

2.2.2 Klasifikasi Diabetes Melitus

Diabetes melitus dapat diklasifikasikan menjadi tiga kategori (IDF, 2017), yaitu:

a. DM Tipe 1

Diabetes tipe 1 disebabkan oleh reaksi autoimun dimana sistem kekebalan tubuh menyerang sel beta pankreas sehingga tubuh tidak dapat memproduksi insulin yang menyebabkan terjadinya defisiensi insulin absolut (ADA, 2018). Orang dengan diabetes tipe 1 membutuhkan injeksi insulin setiap hari untuk

mempertahankan kadar glukosa darah berada dalam kisaran yang tepat (IDF, 2017). Persentase penderita DM tipe 1 sekitar 5%-10% dari keseluruhan prevalensi penderita DM dan biasanya berkembang pada masa anak-anak (DiPiro dkk., 2015).

b. DM Tipe 2

Diabetes tipe 2 disebabkan oleh menurunnya kemampuan sekresi insulin sel β pankreas secara progresif dan resistensi insulin (ADA, 2018). Pasien yang resisten terhadap insulin mengalami kondisi dimana ikatan antara insulin dan reseptornya terganggu yang menyebabkan stimulasi terhadap pengambilan glukosa oleh jaringan menjadi tidak efektif. Produksi insulin akan ditingkatkan oleh sel beta pankreas sebagai respon dalam mengatasi resistensi insulin sehingga kadar glukosa akan dipertahankan dalam kondisi normal. Jika sel beta tidak dapat mengimbangi peningkatan kebutuhan terhadap insulin, maka terjadi hiperglikemia (IDF, 2017). Peningkatan lipolisis dan produksi asam lemak bebas peningkatan produksi glukosa hati, dan penurunan penyerapan glukosa pada otot rangka merupakan manifestasi dari resistensi insulin. Persentase penderita DM tipe 2 sekitar 90% dari keseluruhan prevalensi penderita DM (DiPiro dkk., 2015).

c. *Gestational Diabetes Mellitus* (GDM)

GDM didefinisikan sebagai intoleransi glukosa yang terjadi selama kehamilan, umumnya pada trimester kedua atau ketiga (ADA, 2018). Kondisi ini terjadi ketika kadar glukosa darah melebihi normal tetapi masih di bawah kadar diagnostik DM (WHO, 2016). Prevalensi hiperglikemia pada masa kehamilan adalah sebesar 16,2% atau 21,3 jiwa dan diperkirakan 85,1% disebabkan oleh diabetes gestasional. 50% dari wanita yang memiliki riwayat GDM terus berkembang menjadi DM tipe 2 dalam 5-10 tahun setelah melahirkan (IDF, 2017). Tubuh memproduksi beberapa hormon pada usia kehamilan lebih dari 26 minggu seperti estrogen, progesteron, leptin, kortisol, laktogen plasenta, dan *placental growth hormone* yang memiliki efek meningkatkan resistensi insulin. Hormon-hormon tersebut meningkatkan glukosa darah yang kemudian diangkut melintasi plasenta untuk membantu pertumbuhan janin. Untuk mempertahankan homeostasis glukosa, tubuh mengkompensasi perubahan ini melalui hipertrofi dan hiperplasia sel β pankreas, serta peningkatan *glucose-stimulated insulin secretion* (GSIS).

Diabetes gestasional terjadi jika sel-sel β pankreas gagal menghasilkan insulin yang cukup dan menurunnya sensitivitas insulin sehingga menyebabkan hiperglikemia (Plows dkk., 2018).

2.2.3 Manifestasi Klinik Diabetes Melitus

Manifestasi klinis dari diabetes melitus merupakan akibat dari kegagalan metabolik pada kondisi defisiensi insulin. Pasien dengan defisiensi insulin tidak dapat mempertahankan kadar glukosa normal dalam darah, sehingga terjadi glikosuria (adanya glukosa dalam urin). Peningkatan pengeluaran urin (poliuria) dan timbulnya rasa haus (polidipsia) merupakan akibat dari diuresis osmotik yang disebabkan oleh kondisi glikosuria. Pasien mengalami keseimbangan kalori negatif dan berat badan berkurang karena glukosa hilang bersama urin. Rasa lapar yang semakin besar (polifagia) dapat timbul sebagai akibat kehilangan kalori (Price dan Wilson, 2005). Pada DM tipe 1 sekitar 20%-40% pasien cenderung mengalami diabetik ketoasidosis jika insulin ditahan atau dalam kondisi stres berat. Hal ini berbeda dengan DM tipe 2 yang seringkali terjadi tanpa gejala (asimptomatik) (DiPiro dkk., 2015).

2.2.4 Diagnosis Diabetes Melitus

Kriteria diagnosis diabetes melitus menurut standar pelayanan medis *American Diabetes Association* (ADA) tahun 2018 adalah sebagai berikut:

- a. Kadar glukosa darah pada waktu puasa > 126 mg/dL (7,0 mmol/L), puasa didefinisikan sebagai tidak ada asupan kalori selama setidaknya 8 jam.
- b. Kadar glukosa darah dua jam setelah *Oral Glucose Tolerance Test* (OGTT) > 200 mg/dL sesuai standar WHO menggunakan beban glukosa yang setara dengan 75 g glukosa anhidrat.
- c. HbA1C $> 6,5\%$ (48 mmol/mol).
- d. Pada pasien dengan gejala klasik hiperglikemia atau krisis hiperglikemik, glukosa plasma sewaktu ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L).

2.2.5 Penatalaksanaan Diabetes Melitus

Tujuan utama penatalaksanaan diabetes melitus adalah untuk membantu meringankan gejala, mengurangi risiko komplikasi mikrovaskular dan makrovaskular, mengurangi mortalitas dan meningkatkan kualitas hidup penderita DM (DiPiro dkk., 2015). Terapi DM dapat dibedakan menjadi 2, yaitu terapi non farmakologi dan terapi farmakologi (NDCP, 2010).

a. Terapi Non-Farmakologi

1). Diet

Diet direkomendasikan untuk semua pasien DM. Diet seimbang untuk DM tipe 1 berfokus pada pengaturan insulin secara fisiologis sehingga berat badan yang sehat dapat dicapai dan dipertahankan. Perencanaan nutrisi untuk pasien DM tipe 1 harus cukup karbohidrat dan rendah lemak jenuh. Diet pada pasien dengan DM tipe 2 berfokus untuk menurunkan berat badan dengan mengurangi asupan kalori (DiPiro dkk., 2015). Penurunan berat badan telah dibuktikan dapat mengurangi resistensi insulin dan memperbaiki respons sel-sel β terhadap stimulus glukosa (Depkes RI, 2005).

2). Olahraga

Aktivitas fisik atau olahraga adalah salah satu komponen penting dalam pencegahan dan manajemen DM tipe 2. Aktivitas fisik yang teratur meningkatkan kontrol metabolisme, meningkatkan sensitivitas insulin, meningkatkan kesehatan jantung, dan membantu menurunkan dan mempertahankan berat badan (NDCP, 2010). Beberapa contoh olahraga yang disarankan bagi penderita DM adalah lari pagi, berenang dan bersepeda. Otot yang aktif bergerak ketika berolahraga menyebabkan peningkatan sensitivitas reseptor insulin, sehingga pengambilan glukosa dalam darah meningkat (Depkes RI, 2005).

b. Terapi Farmakologi

1). Terapi Insulin

DM tipe 1 terjadi ketika sel β pankreas tidak mampu untuk menghasilkan insulin sehingga pada tipe ini penderita sangat tergantung dengan pemberian insulin. Sementara pada DM tipe 2 umumnya tanpa insulin (Price dan Wilson, 2005). Insulin eksogen digunakan untuk meniru pola normal fisiologis tubuh

sehingga dapat melakukan metabolisme karbohidrat, protein dan lemak (DiPiro dkk., 2008).

2). Obat Antidiabetes Oral

Obat antidiabetes oral dapat dibagi menjadi tiga golongan berdasarkan mekanisme kerjanya (Depkes RI, 2005), yaitu:

a. Obat-obat yang meningkatkan sekresi insulin

1). Sulfonilurea

Golongan sulfonilurea bekerja dengan cara merangsang sel β pankreas untuk mensekresikan insulin (DiPiro dkk., 2015). Obat ini hanya efektif pada penderita diabetes yang sel-sel β pankreasnya masih berfungsi dengan baik (Depkes RI, 2005). Contoh obat golongan sulfonilurea adalah glibenklamid, glipizida, glikazida, glimepirida, glikuidon.

2). Meglitinida

Golongan meglitinida memiliki mekanisme kerja menurunkan kadar glukosa dengan merangsang sekresi insulin di kelenjar pankreas. Contoh obat meglitinida adalah repaglinid dan nateglinid (DiPiro dkk., 2015).

b. Sensitiser insulin

1). Biguanida

Golongan biguanida bekerja langsung pada hati (hepar) dengan meningkatkan sensitivitas insulin hepatik dan jaringan perifer. Contoh obat golongan ini adalah metformin (Depkes RI, 2005).

2). Tiazolidindion

Golongan tiazolidindion bekerja dengan cara berikatan dengan *peroxisome proliferator activated reseptor gamma* (PPAR γ) di otot, jaringan lemak, dan hati sehingga terjadi peningkatan sensitivitas tubuh terhadap insulin. Obat golongan ini dapat menurunkan kecepatan glikoneogenesis. Contoh obat golongan tiazolidindion adalah pioglitazon, rosiglitazon dan troglitazon (Depkes RI, 2005).

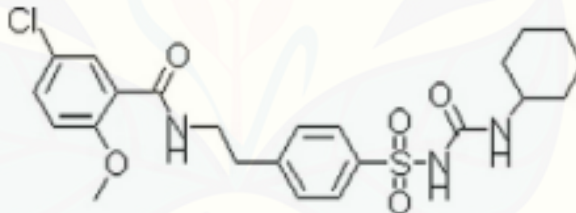
c. Inhibitor katabolisme karbohidrat

Golongan inhibitor katabolisme karbohidrat bekerja dengan menghambat kerja enzim α -glukosidase di saluran cerna pada proses metabolisme dan absorpsi karbohidrat sehingga absorpsi glukosa ke dalam darah terhambat. Golongan ini juga

digunakan untuk mengendalikan hiperglikemia post-prandial (*post-meal hyperglycemia*). Contoh obat golongan ini meliputi akarbose dan miglitol (Depkes RI, 2005).

2.3 Tinjauan tentang Glibenklamid

Glibenklamid (*glyburide*) adalah sulfonilurea generasi kedua, yang memiliki rumus molekul $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$. Glibenklamid digunakan sebagai agen hipoglikemik oral dalam mengobati diabetes melitus tipe 2 (Furman, 2017). Glibenklamid merangsang sekresi insulin dengan mengikat subunit afinitas tinggi (SUR1) dari *ATP-sensitive potassium channel* (KATP channel) sel beta pankreas. Pengikatan ini akan menghambat pengeluaran K^+ sehingga terjadi depolarisasi sel beta dan pembukaan kanal Ca^{2+} yang tergantung pada voltase (*voltage-dependent calcium channels*). Pembukaan kanal ini memungkinkan masuknya Ca^{2+} ekstraseluler. Peningkatan kadar Ca^{2+} akan memicu pelepasan insulin (Papich, 2016).



Gambar 2.2 Struktur glibenklamid (Furman, 2017).

Glibenklamid hampir sepenuhnya terabsorpsi setelah pemberian oral. Onset hipoglikemik mulai dicapai dalam 45-60 menit dan maksimal dalam 1,5-3 jam. Lamanya durasi pada pasien diabetes yang tidak puasa, aksi hipoglikemik dapat bertahan hingga 24 jam. Makanan tidak mempengaruhi laju atau tingkat absorpsi. Konsentrasi glibenklamid dalam serum dapat meningkat pada pasien dengan gangguan ginjal atau hati. Glibenklamid didistribusikan dalam jumlah besar ke dalam empedu dan melewati plasenta. Pengikatan protein plasma sebesar > 99% (untuk *glyburide*) dan > 97% (untuk metabolit utama *4-trans-hydroxyglyburide*). Glibenklamid dimetabolisme seluruhnya di hati dan diekskresikan sebagai

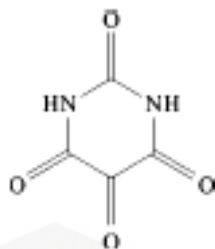
metabolit dalam urin dan feses. Waktu paruh 1,4-1,8 jam (untuk *glyburide*) atau sekitar 10 jam (untuk *glyburide* dan metabolit) (McEvoy dkk., 2011).

Sulfonilurea juga dapat dikombinasikan dengan agen antidiabetes lainnya seperti metformin, pioglitazon, dipeptidyl peptidase 4 inhibitor; inhibitor SGLT2, dan agonis reseptor GLP-1. Glibenklamid dikontraindikasikan pada pasien diabetes tipe 1, koma diabetes, gangguan fungsi hati, ginjal, atau adrenokortikal, pada pasien yang hipersensitif terhadap glibenklamid, atau pada masa kehamilan. Efek samping yang dapat terjadi adalah hipoglikemik, karena glibenklamid memiliki durasi kerja yang panjang. Selain itu, efek samping lain yang dilaporkan adalah gangguan visual sementara pada awal terapi, reaksi gastrointestinal ringan, reaksi kulit alergi (sensitivitas terhadap sulfonamid), leukopenia reversibel dan trombositopenia, agranulositosis, pansitopenia, anemia hemolitik, gangguan fungsi hati, dan ikterus kolestatik (Furman, 2017).

Glibenklamid dapat menurunkan glukosa darah tetapi tidak memiliki efek terhadap *total antioxidant status* (TAS) (Siddique dkk., 2016). Penelitian yang dilakukan oleh Obi dkk. (2016) membuktikan bahwa pemberian glibenklamid 2,5 mg/kg pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan dapat meningkatkan enzim antioksidan superoksida dismutase (SOD) dan *glutathione peroxidase* (GSH), serta menurunkan kadar MDA tetapi tidak signifikan dibandingkan dengan kontrol diabetes. Pemberian glibenklamid tersebut juga dapat meningkatkan aktivitas enzim katalase secara signifikan. Hasil ini membuktikan bahwa glibenklamid mungkin memiliki beberapa efek perlindungan terhadap peroksidasi lipid yang mengarah pada kerusakan oksidatif pada diabetes (Obi dkk., 2016).

2.4 Tinjauan tentang Aloksan

Aloksan (2,4,5,6-tetraoksipirimidin) merupakan turunan pirimidin dengan rumus molekul $C_4H_2N_2O_4$ (Royal Society of Chemistry, 2013). Aloksan bersifat sangat tidak stabil sehingga mudah terdekomposisi. Aloksan memiliki waktu paruh yang pendek, yakni 1,5 menit pada pH 7,4 dan suhu 37°C. Selain itu, aloksan memiliki afinitas tinggi terhadap air dan oleh karena itu biasa ditemukan sebagai aloksan monohidrat (PubChem, 2005; Lenzen, 2008).



Gambar 2.3 Struktur aloksan (Royal Society of Chemistry, 2013)

Aloksan dikenal sebagai agen diabetogenik yang bekerja selektif pada sel β pankreas. Aloksan biasa digunakan untuk menginduksi DM tipe 1 maupun tipe 2 pada hewan percobaan seperti kelinci, tikus, mencit dan anjing (Etuk, 2010). Kekurangan dari aloksan yaitu bersifat tidak stabil pada kondisi fisiologis tubuh dan memiliki waktu paruh yang singkat. Efek diabetogenik akan hilang jika aloksan terdekomposisi menjadi asam aloksanat. Oleh karena itu, aloksan harus segera terakumulasi dengan cepat ke sel β pankreas setelah diinduksikan. Aloksan diadministrasikan secara parenteral melalui intravena, intraperitoneal atau subkutan. Dosis aloksan yang digunakan juga berpengaruh terhadap tingkat kerusakan yang ditimbulkan pada sel β pankreas (Szkudelski, 2001; Lenzen, 2008; Ellis dan West, 2011). Aloksan memiliki dua mekanisme patologis, yaitu menghambat sekresi insulin melalui penghambatan spesifik terhadap enzim glukokinase dan membentuk ROS (Szkudelski, 2001; Lenzen, 2008).

2.5 Tinjauan tentang Radikal Bebas dan Stres Oksidatif

2.5.1 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah entitas kimia reaktif yang mengandung satu atau lebih elektron bebas (Bansal dan Bilaspuri, 2011). Radikal bebas menginduksi kerusakan sel dengan melewati elektron bebas kemudian menghasilkan produk oksidasi komponen dan molekul sel yang umumnya bersifat tidak stabil dan sangat reaktif. Radikal bebas dapat diklasifikasikan menjadi 3 tipe, yaitu *reactive oxygen species* (ROS), *reactive nitrogen species* (RNS), dan *reactive chlorine species* (RCS) (Ullah dkk., 2016).

Senyawa eksogen maupun endogen menghasilkan radikal bebas di dalam sel dan sekitarnya. Radikal bebas dapat diproduksi dari reaksi non-enzimatik senyawa organik dengan oksigen, inisiasi oleh radiasi pengion, atau melalui fosforilasi oksidatif dalam mitokondria. Tubuh memiliki mekanisme untuk melawan efek buruk dari radikal bebas yaitu dengan menghasilkan antioksidan endogen maupun eksogen yang akan menetralkan jumlah radikal bebas dan menjaga sel-sel terlindungi dari efek toksiknya (Pham-huy dkk., 2008).

2.5.2 Hubungan Stres Oksidatif dan Diabetes Melitus

Stres oksidatif dapat didefinisikan sebagai gangguan pada keseimbangan jumlah pro-oksidan yang lebih banyak dibandingkan jumlah antioksidan dalam tubuh (Fatani dkk., 2016). Stres oksidatif menyebabkan sel-sel tubuh yang sehat kehilangan fungsi dan strukturnya dengan menyerang sel-sel tersebut. Istilah “antioksidan” digunakan untuk setiap senyawa yang dapat menghambat atau menunda oksidasi substrat. Beberapa jenis antioksidan biologis diantaranya adalah glutathione, vitamin C & E, sistin, dan lain-lain. Peningkatan kadar ROS pada diabetes dapat disebabkan karena penurunan aktivasi enzim pertahanan antioksidan seperti katalase (CAT – enzimatis/non-enzimatis), superoksid dismutase (SOD), dan glutathione peroksidase (GSH-Px). Peningkatan tersebut menyebabkan jaringan rentan terhadap stres oksidatif yang mengarah pada pengembangan komplikasi diabetes (Lipinski, 2001). Komplikasi DM akibat stres oksidatif diantaranya adalah penyakit arteri koroner, neuropati, nefropati, retinopati dan stroke. Peningkatan kadar glukosa dan insulin bersama dengan dislipidemia pada pasien diabetes mengembangkan makroangiopati yang mengarah pada aterosklerosis (Ullah dkk., 2016).

Stres oksidatif berperan dalam patogenesis diabetes tipe 1 dan tipe 2. Pembentukan radikal bebas pada diabetes oleh glikasi protein non-enzimatis, oksidasi glukosa, dan peningkatan peroksidasi lipid menyebabkan kerusakan enzim, komponen seluler dan peningkatan resistensi insulin (Maritim dkk., 2003). Sumber utama stres oksidatif pada diabetes melitus adalah mitokondria. Selama metabolisme oksidatif di mitokondria, komponen oksigen yang digunakan

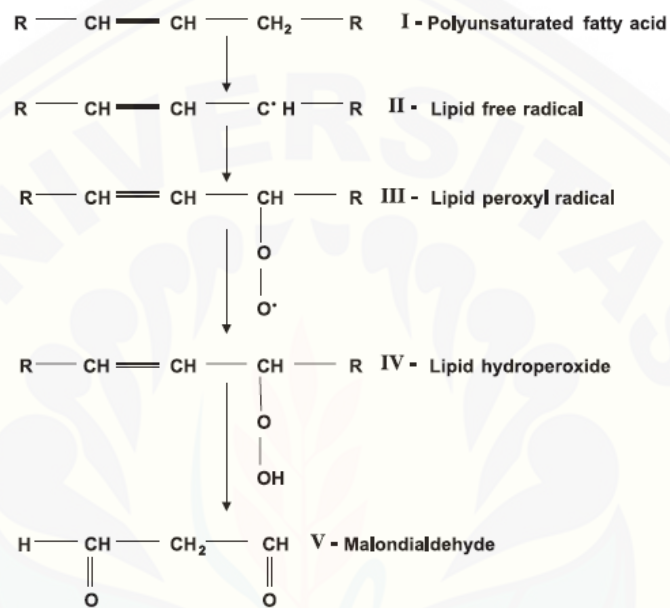
direduksi menjadi air dan sisa oksigen ditransformasikan menjadi oksigen radikal ($O\cdot$) yang akan diubah menjadi spesies reaktif lain seperti $ONOO^-$, OH dan H_2O_2 . Adanya radikal bebas ROS/RNS dalam pensinyalan insulin ini diinterpretasikan sebagai pemicu terjadinya resistensi insulin yang menjadi faktor risiko DM tipe 2 (Ullah dkk., 2016). Hubungan antara DM dan stres oksidatif dapat diukur menggunakan biomarker kerusakan DNA dan produk peroksidasi lipid. Malondialdehid merupakan produk yang dihasilkan dari peroksidasi lipid yang dapat digunakan untuk mengukur peroksida lipid setelah bereaksi dengan asam tiobarbiturat (Fatani dkk., 2016).

2.6 Tinjauan tentang Malondialdehid

Gangguan metabolisme pada tubuh akibat diabetes melitus membuat sel lebih rentan terhadap peroksidasi lipid (Pe´rez-Matute dkk., 2009). Peroksidasi lipid menyebabkan rantai asam lemak terputus dan membentuk produk akhir berupa malondialdehid (MDA) (Urso dan Clarkson, 2003). Peningkatan kadar MDA di dalam darah dapat menunjukkan tingginya reaksi antara radikal bebas dan lemak tak jenuh dalam tubuh, sehingga MDA dapat dijadikan sebagai parameter pengukuran aktivitas antioksidan dan antidiabetes dalam sel (Arora dkk., 2013).

Proses pembentukan MDA terjadi melalui beberapa langkah sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 2.4. (I) Target utama radikal bebas adalah karbon-karbon ikatan ganda dari *poly unsaturated fatty acid* (PUFA) pada membran fosfolipid yang merupakan komponen penyusun membran sel. Proses autooksidasi PUFA oleh radikal bebas diawali dengan tahap inisiasi yaitu tahap pembentukan radikal bebas. (II) Radikal bebas hidroksil yang menyerang PUFA mampu melepaskan atom H dari gugus metilen ($-CH_2-$) dan membentuk suatu radikal yang disebut *carbon-centered radical*. (III) Selanjutnya tahap propagasi yaitu tahap pemanjangan rantai radikal. Radikal mengalami penataulangan molekul menjadi diena terkonjugasi yang akan bereaksi dengan molekul O_2 membentuk radikal lipid peroksil. (IV) Kemudian tahap terminasi dimana terjadi reaksi antara senyawa radikal dengan radikal lain. Radikal lipid peroksi mampu menarik atom H dari PUFA lainnya sehingga terbentuk lipid hidroperoksida. (V) Lipid hidroperoksida

tidak stabil dan fragmentasinya menghasilkan produk seperti MDA (Grotto dkk., 2009; Tangvarasittichai dan Tangvarasittichai, 2009). MDA bersifat toksik karena dapat memutus ikatan dan beragregasi dengan protein membran untuk membentuk adisi yang dapat menghasilkan kerusakan biomolekuler. Pengukuran kadar MDA adalah metode yang dapat digunakan untuk menentukan sejauh mana peroksidasi lipid telah menyebabkan kerusakan (Sharma dkk., 2003).

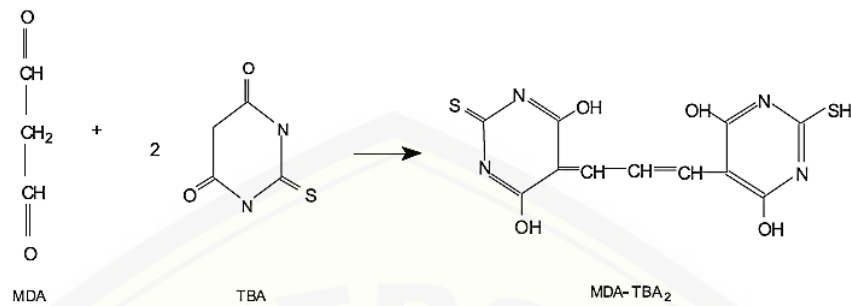


Gambar 2.4 Skema pembentukan MDA dari PUFA (Grotto dkk., 2009).

2.7 Tinjauan tentang Analisis MDA

MDA merupakan produk peroksidasi lipid (produk dekomposisi dari peroksidasi PUFA) yang dapat digunakan untuk menganalisis radikal bebas (Grotto dkk., 2009). Metode penentuan peroksidasi lipid yang paling sering dan relatif mudah dikerjakan menggunakan metode *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS). Prinsip metode ini didasarkan pada reaksi kondensasi antara 1 molekul MDA dengan 2 molekul TBA menghasilkan produk akhir stabil berupa MDA-TBA *adduct* yang kecepatan reaksinya dipengaruhi oleh suhu, pH dan konsentrasi TBA (Khoubnasabjafari dkk., 2015). Reaksi ini berjalan pada pH 2-3 dan akan memberikan warna pink-kromogen yang dapat diperiksa menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 532-535 nm. Kadar MDA dapat diperiksa dari plasma, jaringan, maupun urin (Tangvarasittichai dan

Tangvarasittichai, 2009). Reaksi pembentukan kompleks MDA-TBA dapat dilihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Reaksi membentuk kompleks MDA-TBA (Grotto dkk., 2009).

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *True Experimental Laboratories* yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dengan dosis berbeda terhadap kadar MDA plasma dan jaringan hati tikus diabetes yang diinduksi aloksan.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Jember pada bulan April hingga Juni 2019.

3.3 Jumlah Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian adalah tikus jantan galur Wistar sebanyak 24 ekor masing-masing 4 ekor hewan coba tiap kelompok dengan berat badan 200-300 gram dan berumur 2-3 bulan. Penentuan jumlah sampel didasarkan pada perhitungan menggunakan rumus Federer dikutip dari (Ridwan, 2013) yaitu :

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

Keterangan :

n : jumlah sampel

t : jumlah kelompok kontrol dan perlakuan

jika, t = 6 maka, $\{(6-1)(n-1)\} \geq 15$

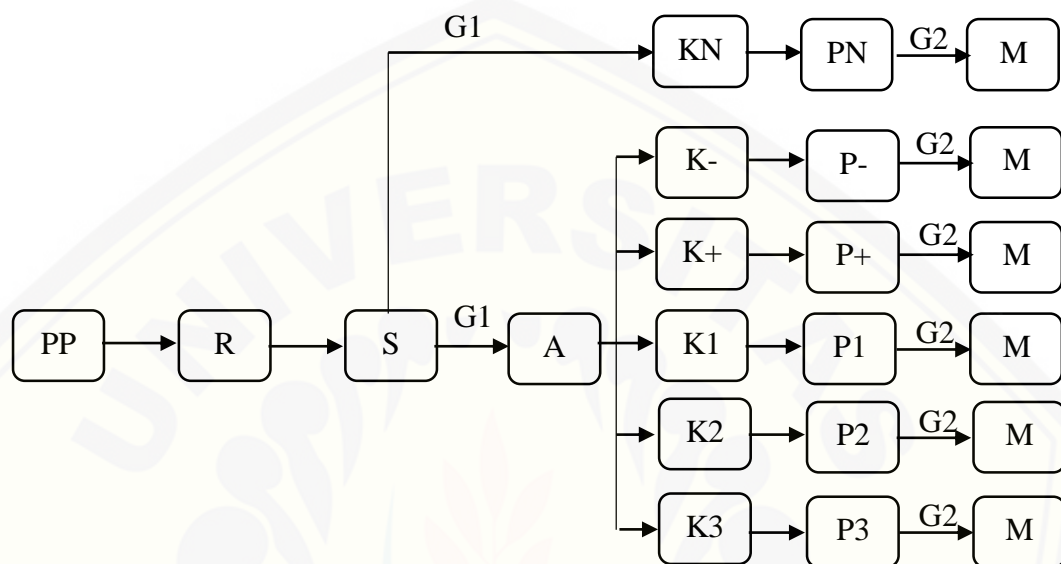
$$5n - 5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, pada setiap kelompok perlakuan terdapat minimal 4 ekor hewan coba.

3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *Post-test Control Group Design* untuk parameter MDA plasma dan jaringan hati. Rancangan penelitian yang dilakukan sebagai berikut:



Gambar 3. 1 Skema rancangan penelitian

Keterangan:

PP : Populasi hewan coba

S : Sampel hewan coba

A : Induksi aloksan dosis 135 mg/kgBB secara intraperitoneal

G1 : Pengukuran kadar glukosa darah sebelum perlakuan

R : Randomisasi hewan coba

K : Kelompok

N : Kontrol normal yang diberi CMC-Na 1% per oral pada tikus normal

- : Kontrol negatif yang diberi CMC-Na 1% per oral pada tikus DM

+ : Kontrol positif dengan pemberian glibenklamid 0,9 mg/kgBB per oral pada tikus DM

1 : Pemberian suspensi ekstrak etanol kayu secang dosis 50 mg/kgBB pada tikus DM

2 : Pemberian suspensi ekstrak etanol kayu secang dosis 100 mg/kgBB pada tikus DM

- 3 : Pemberian suspensi ekstrak etanol kayu secang dosis 400 mg/kgBB pada tikus DM
- P : Perlakuan selama 14 hari
- G2 : Pengukuran kadar glukosa darah setelah 14 hari perlakuan
- M : Pengukuran kadar MDA plasma dan jaringan hati hewan coba

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut: alat-alat gelas, fotometer (*BioLyzer 100*), spektrofotometer UV-Vis (Labomed, Inc UVD-2950), timbangan hewan, neraca analitik (Ohaus), sentrifuge (*Hettich, EBA 20*), alat bedah (gunting/scalpel, papan bedah, pinset), maserator, *rotary evaporator*, kertas saring, mikropipet (*Socorex Swiss*), mikrotube, mortir, stamper, penangas air, pinset, pipa kapiler, sonde, spuit injeksi, vortex.

3.5.2. Bahan

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah kayu secang (*Caesalpinia sappan L.*). Bahan lainnya yang digunakan yaitu etanol 96%, aloksan monohidrat (TCI), CMC Na 1%, glibenklamid (PT Paphros), NaOH, NaCl 0,9%, *trichloroacetic acid* atau TCA (Sigma-Aldrich), *thiobarbituric acid* atau TBA (Sigma-Aldrich), 1,1,3,3-tetraetoksi propana atau TEP (Sigma-Aldrich), dan aquadest.

3.6. Variabel Penelitian

3.6.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis ekstrak etanol kayu secang, yaitu dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB secara peroral.

3.6.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar MDA plasma dan jaringan hati tikus dalam satuan μM .

3.6.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah cara ekstraksi, tikus galur Wistar usia 2-3 bulan, berjenis kelamin jantan, dengan berat badan 200-300 gram, dan pemeliharaan tikus meliputi pemberian pakan, minum serta frekuensi pemberian ekstrak etanol kayu secang yang seragam dan prosedur pengujian kadar MDA plasma dan jaringan hati tikus.

3.7. Definisi Operasional

- a. Kayu secang yang digunakan pada penelitian ini adalah kayu dewasa yaitu mulai batang yang tumbuh di atas tanah hingga 1,5 meter dengan tinggi tanaman sekitar 5 meter yang berasal dari daerah Madura yang telah dideterminasi di Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember.
- b. Hewan uji dianggap diabetes apabila kadar glukosa dalam darah ≥ 200 mg/dL (Ighodaro dkk., 2018). Sebelum penelitian dilakukan, protokol penelitian diajukan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- c. Ekstrak etanol kayu secang dikatakan memiliki pengaruh sebagai antidiabetes dan antioksidan jika ekstrak etanol kayu secang mampu menurunkan kadar glukosa darah, MDA plasma dan jaringan hati tikus dibandingkan kontrol negatif.

3.8. Prosedur Penelitian

3.8.1 Tahapan Persiapan

a. Penyiapan Simplisia

Kayu secang yang sudah dewasa yaitu mulai dari pangkal batang paling bawah atau batang yang tumbuh tepat di atas tanah sampai 1,5 meter dari permukaan tanah dipilih dari pohon dewasa dengan tinggi sekitar 5 meter lalu dibersihkan dari bagian kulit batang dan pengotor. Batang yang telah bersih dari kulit dan pengotornya kemudian diserut untuk menghasilkan serutan yang lebih kecil agar mempermudah proses pembuatan serbuk kayu. Selanjutnya, serutan kayu secang diangin-anginkan untuk mengurangi kadar air dan menghindari degradasi senyawa

oleh tumbuhnya jamur. Kayu secang yang telah kering dihaluskan menggunakan alat penggiling untuk menghasilkan serbuk kayu secang (Fardhyanti dan Riski, 2015).

b. Pembuatan Ekstrak Etanol Kayu Secang

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menimbang serbuk kayu secang dan diekstraksi secara maserasi. Sebanyak 250 gram simplisia direndam dalam pelarut etanol 96% selama 2 x 24 jam. Filtrat disaring menggunakan corong *buchner* lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental dan sisa pelarut diuapkan dengan oven pada suhu 40°C sampai bobot ekstrak kayu secang konstan (Fardhyanti dan Riski, 2015).

c. Pembuatan Larutan Aloksan Dosis 135 mg/kgBB

Dosis aloksan yang digunakan untuk menginduksi diabetes pada tikus bervariasi mulai dari 90-200 mg/kgBB (Ighodaro dkk., 2018). Hasil optimasi yang telah dilakukan menunjukkan dosis aloksan yang digunakan adalah 135 mg/kgBB. Sediaan dibuat dengan melarutkan aloksan monohidrat 135 mg dalam NaCl 0,9% sampai 10 ml. Selanjutnya larutan aloksan diinjeksikan secara intraperitoneal pada tikus. Perhitungan pembuatan larutan aloksan dapat dirujuk pada Lampiran 4.1.

d. Pembuatan Mucilago CMC Na 1%

Pembuatan mucilago CMC Na 1% dilakukan dengan menimbang 1 gram CMC Na lalu ditaburkan di atas air panas 20 mL setelah itu dibiarkan agar mengembang selanjutnya diaduk sampai homogen dan terbentuk masa kental kemudian ditambahkan air hingga 100 ml.

e. Pembuatan Suspensi Glibenklamid Dosis 0,9 mg/kgBB

Suspensi glibenklamid dibuat dengan menimbang 1,3 mg glibenklamid yang disuspensikan kedalam mucilago CMC-Na 1% sampai 10 mL. Suspensi glibenklamid diberikan pada tikus kelompok kontrol positif dengan dosis 0,9

mg/kgBB. Perhitungan pembuatan suspensi glibenklamid dapat dirujuk pada Lampiran 4.2.

f. Pembuatan Suspensi Ekstrak Etanol Kayu Secang Dosis 50, 100, dan 400 mg/kgBB

Ekstrak etanol kayu secang masing-masing sebanyak 50, 100 dan 400 mg/kgBB disuspensikan ke dalam CMC-Na 1% sampai 10 mL kemudian diaduk sampai homogen. Perhitungan dosis ekstrak etanol kayu secang dapat dirujuk pada Lampiran 4.3.

3.8.2 Adaptasi Hewan Uji

Tikus diadaptasikan pada kondisi laboratorium selama satu minggu dan diberi makan *ad libitum* pada semua kandang. Hewan uji yang digunakan adalah tikus yang tidak ada perubahan berat badan yang melebihi 10% selama adaptasi serta secara visual menunjukkan perilaku yang normal (Ridwan, 2013).

3.8.3 Induksi Aloksan

Hewan uji dipuaskan selama 8-10 jam (tetap diberi air minum). Kemudian semua kelompok hewan uji (kecuali kelompok normal) diinduksi menggunakan larutan aloksan dengan dosis 135 mg/kgBB dalam pelarut NaCl 0,9% secara intraperitoneal. Untuk kelompok kontrol normal, hewan uji diinduksi dengan larutan NaCl 0,9% secara intraperitoneal. Kadar glukosa darah hewan uji diukur sebagai glukosa darah *pre-test* pada hari ke-3. Hewan uji dengan kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dL adalah hewan yang digunakan untuk penelitian (Holidah dkk., 2016).

3.8.4 Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Uji

Pengelompokan dan perlakuan hewan uji merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Holidah dkk. (2016). Hewan uji dibagi menjadi 6 kelompok diantaranya terdiri dari 3 kelompok kontrol yaitu kelompok kontrol normal, kontrol

positif dan kontrol negatif serta 3 kelompok perlakuan dosis 50, 100 dan 400 mg/kgBB. Pembagian tiap kelompok terdiri dari 4 tikus sebagai berikut :

1. N (kelompok normal) : tikus normal diberi suspensi CMA Na 1% secara per oral
2. (-) (kelompok kontrol negatif) : tikus diabetes yang diinduksi aloksan diberi suspensi CMC Na 1% secara per oral.
3. (+) (kelompok kontrol positif) : tikus diabetes yang diinduksi aloksan diberi suspensi glibenklamid dosis 0,9 mg/kgBB secara per oral
4. (1) (kelompok uji I) : tikus diabetes yang diinduksi aloksan diberi suspensi ekstrak etanol kayu secang dosis 50 mg/kgBB secara per oral
5. (2) (kelompok uji II) : tikus diabetes yang diinduksi aloksan diberi suspensi ekstrak etanol kayu secang dosis 100 mg/kgBB secara per oral
6. (3) (kelompok uji III) : tikus diabetes yang diinduksi aloksan diberi suspensi ekstrak etanol kayu secang dosis 400 mg/kgBB secara per oral

Tikus diberi perlakuan sekali setiap hari selama 14 hari. Selama perlakuan, berat tikus ditimbang setiap hari untuk menentukan volume sediaan yang diberikan.

3.8.5 Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan darah dilakukan pada hari ke-15. Tikus dipuasakan selama 8-10 jam sebelum pengambilan darah. Darah tikus diambil secara intrakardial dengan cara jarum spuit disuntikkan langsung ke dalam jantung. Darah 1,5 mL ditampung menggunakan vaculab K3 EDTA. Untuk mendapatkan plasma selanjutnya darah disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Plasma yang sudah terpisah diambil menggunakan mikropipet dan ditampung pada *microtube* dan siap untuk pemeriksaan kadar MDA plasma (Lailatul dkk., 2015).

3.8.6 Penentuan Kadar MDA

Penentuan kadar MDA plasma dan jaringan hati tikus diabetes merujuk pada metode yang dilakukan oleh (Grotto dkk., 2009) sebagai berikut:

a. Persiapan reagen

Reagen yang digunakan untuk mengukur kadar MDA plasma adalah TCA 20%, Na-TBA 1% dan HCl 1 N. Pembuatan TCA 20% dilakukan dengan melarutkan 1 gram TCA ke dalam aquadest sampai 5 mL. Na-TBA 1% diperoleh dengan melarutkan TBA sebanyak 0,1 gram ke dalam NaOH 1 M sampai 10 mL. NaOH 1 M dibuat dengan melarutkan 1 gram NaOH ke dalam aquadest sampai 25 mL, sedangkan HCl 1 N dibuat dengan mengencerkan 2 mL HCl 6 N dalam aquadest sampai 12 mL.

b. Penentuan kurva baku MDA

Larutan stok I dibuat dengan cara memipet *1,1,3,3-tetraethoxypropane* (TEP) sebanyak 5 μL kemudian dilarutkan dalam aquadest sampai 10 mL. Selanjutnya, larutan stok I diambil 1 mL dan diencerkan dengan aquadest sampai 10 mL sehingga didapatkan larutan stok II. Kurva baku dibuat dengan cara mengambil larutan stok II kemudian dibuat 10 seri konsentrasi berbeda yaitu 5, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35 dan 39 μM . Masing-masing konsentrasi diambil 50 μL kemudian ditambahkan 1 mL aquadest, 100 μL TCA 20%, 250 μL HCl 1 N dan 100 μL Na-TBA 1%, setiap penambahan 2 reagen dihomogenkan dengan vortex. Tabung yang berisi supernatan dengan reagen ditutup aluminium foil dan dipanaskan dalam air suhu 100°C selama 30 menit. Setelah itu didinginkan pada suhu ruang selama 10 menit, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 532 nm.

c. Prosedur Pengukuran Kadar MDA Plasma

Plasma darah tikus sebanyak 50 μL dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 mL aquadest, 100 μL TCA 20%, 250 μL HCl 1 N dan 100 μL Na-TBA 1%, setiap penambahan 2 reagen dihomogenkan dengan vortex. Campuran tersebut dipanaskan dalam air suhu 100°C selama 30 menit dan didinginkan pada

suhu ruang selama 10 menit. Campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit dan hasil supernatannya dipindahkan ke dalam kuvet. Sampel diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 532 nm.

3.8.7 Pengambilan Sampel Jaringan Hati Hewan Uji

Tikus dibedah dan diambil organ hatinya pada hari ke-15. Hati tikus ditimbang sebanyak 100 mg lalu ditambahkan larutan fisiologis NaCl 0,9% sebanyak 500 μ l dan digerus hingga halus. Homogenat disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil menggunakan mikropipet kemudian ditampung menggunakan *micro tube* dan siap untuk dilakukan pengukuran kadar MDA jaringan hati tikus.

3.8.8 Pengukuran Kadar MDA Jaringan Hati Hewan Uji

a. Persiapan reagen

Reagen-reagen yang digunakan untuk mengukur kadar MDA jaringan hati adalah TCA 20%, HCl 1 N, dan Na-TBA 1%. Pembuatan TCA 20% dilakukan dengan cara melarutkan 2 gram TCA ke dalam aquadest hingga 10 ml. HCl 1 N diperoleh dengan mengencerkan 2 mL HCl 6 N dalam aquadest sampai 12 ml, sedangkan Na-TBA 1% dibuat dengan cara melarutkan TBA sebanyak 0,1 gram ke dalam NaOH 1M hingga 10 ml. NaOH 1M didapatkan dengan cara menimbang 0,4 gram NaOH kemudian dilarutkan dengan aquadest hingga 10 ml.

b. Penetapan kadar MDA jaringan hati hewan uji

Supernatan homogenat sampel jaringan hati tikus diambil 50 μ l lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah 1 ml aquadest dan 100 μ l TCA 20% lalu divortex. Selanjutnya, campuran tersebut ditambah 250 μ l HCl 1 N dan 100 μ l Na-TBA 1% kemudian divortex dan diinkubasi pada suhu 100°C selama 30 menit. Setelah dingin, sampel disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Supernatan dipisahkan kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 532 nm. Kadar MDA jaringan

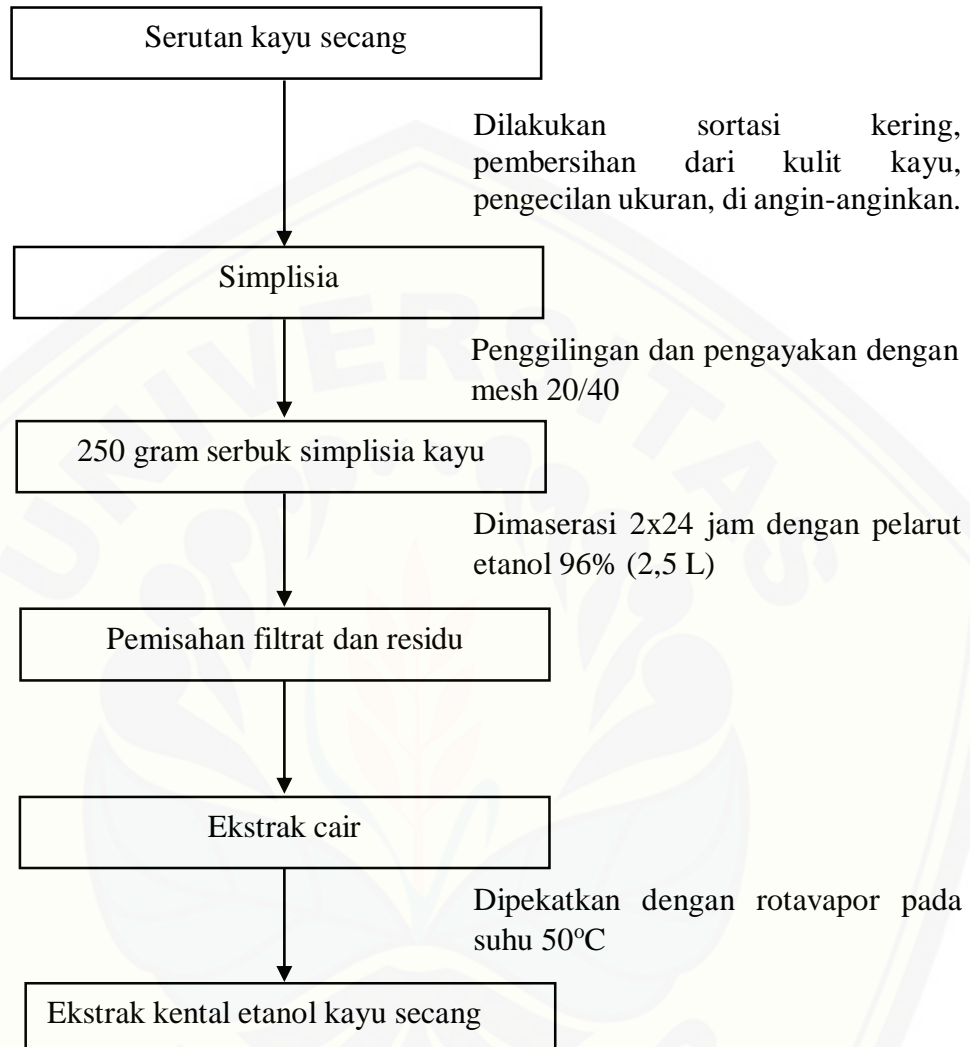
hati tikus dihitung menggunakan persamaan regresi pada kurva baku yang telah ditetapkan.

3.9 Analisis Data

Data kadar MDA plasma dan jaringan hati hewan uji yang diperoleh dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui normal atau tidaknya distribusi data. Kemudian dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Levene* untuk mengetahui varian data. Uji *One-way Anova* dilakukan apabila data terdistribusi normal dan homogen. Uji ini bertujuan untuk mengetahui signifikansi tiap kelompok perlakuan. Nilai $p < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna sehingga dapat dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BLT) atau uji *Least Significant Differences (LSD)* untuk menentukan kelompok yang memberikan nilai berbeda secara signifikan. Data dianalisis menggunakan uji non parametrik yaitu uji *Kruskal-Wallis* apabila data normalitas dan homogenitas tidak dapat dipenuhi kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Uji statistik dilakukan pada derajat kepercayaan 95% ($p < 0,05$).

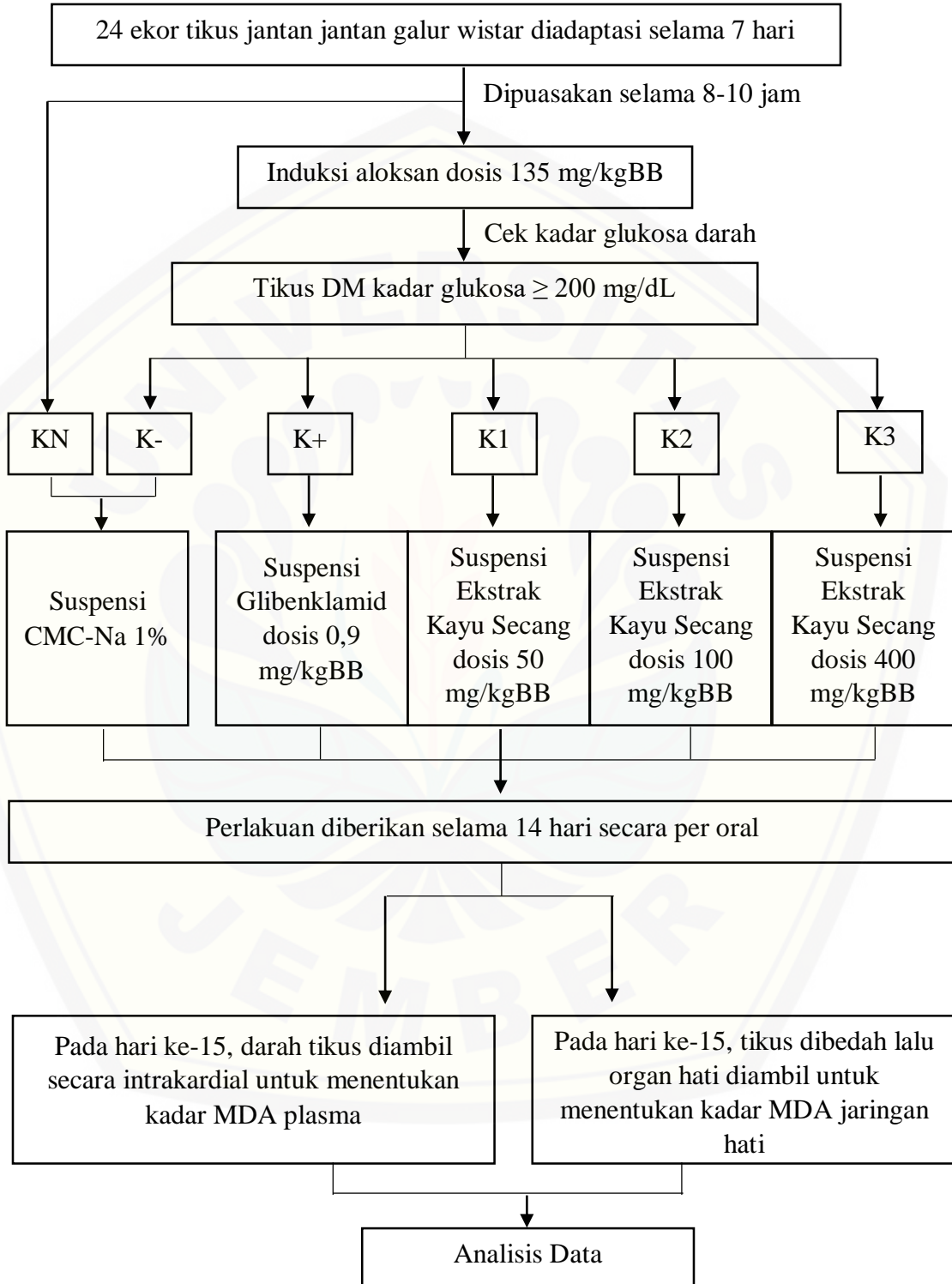
3.10 Skema Rangkaian Kerja

3.10.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Kayu Secang



Gambar 3. 2 Skema Pembuatan Ekstrak Kayu Secang

3.10.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kayu Secang terhadap Kadar MDA Plasma dan Jaringan Hati



Gambar 3.3 Skema Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kayu Secang terhadap Kadar MDA Plasma dan Jaringan Hati

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Pemberian ekstrak etanol kayu secang dapat menurunkan kadar MDA plasma dan jaringan hati tikus diabetes yang diinduksi dengan aloksan.
2. Ekstrak ekstrak etanol kayu secang dosis 100 dan 400 mg/kgBB merupakan dosis yang paling efektif dibandingkan dosis 50 mg/kgBB dalam menurunkan kadar MDA plasma dan jaringan hati.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, saran yang diberikan oleh peneliti adalah:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas ekstrak etanol kayu secang untuk mengetahui batas keamanan penggunaan.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai isolasi dan uji aktivitas brazilin terhadap status oksidan pada tikus diabetes.

DAFTAR PUSTAKA

- Adawiyah, D. R. dan Indriati. 2003. Color stability of natural pigment from secang woods (*Caesalpinia sappan* L.). *Proceeding of the 8th Asean Food Conference*.
- American Diabetes Association (ADA). 2018. Standards of medical care in diabetes — 2018. *J. Clin. App. Res. Edu.* 40: 51-5135.
- Arora, R., A. P. Vig, dan S. Arora. 2013. Lipid peroxidation : a possible marker for diabetes. *Journal of Diabetes and Metabolism.* 11(7): 1–6.
- Badami, S., S. Moorkoth, S. R. Rai, E. Kannan, dan S. Bhojraj. 2003. Antioxidant activity of *Caesalpinia sappan* heartwood. *Bio. Pharm. Bull.* 26(11):1534–1537.
- Badami, S., S. Moorkoth, dan B. Suresh. 2004. *Caesalpinia sappan* a medicinal and dye yielding plant. *Natural Product Radiance.* 3(2):75–82.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2018. *Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 2018.* Laporan Nasional 2018.
- Bajaj, Sarita., Khan, Afreen. 2019. Antioxidants and diabetes. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism.* 16(2): 267-271.
- Bansal, A. K. dan G. S. Bilaspuri. 2011. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International.* 2011:1–7.
- Batubara, I., M. Rafi, S. Sa'diah, M. A. Zaim, S. Indariani, dan T. Mitsunaga. 2010. Brazilin content, antioxidative and lipase inhibition effects of sappanwood (*Caesalpinia sappan*) from indonesia. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering.* 4(10):50–55.
- Brereton, M. F., M. Iberl, dan K. Shimomura. 2014. Reversible changes in pancreatic islet structure and function produced by elevated blood glucose. *Nature Communications.* 5:1–11.
- Catala, A. 2012. *Lipid Peroxidation.* Croatia: InTech.
- Chang, R. 2006. *Kimia Dasar: Konsep-Konsep Inti.* Edisi Edisi Ketu. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Chinnala, K. M., M. M. Elsani, dan M. K. Nalla. 2015. Anti diabetic activity of methanolic extract of *Caesalpinia sappan* Linn. on alloxan induced diabetes

- mellitus in rats. *International Journal of Experimental Pharmacology*. 5(2):65–69.
- Choi, B., J.-A. Lee, S. S. Gao, S. Y. Eun, Y.-S. Kim, S.-Y. Ryu, Y.-H. Choi, R. Park, D. Y. Kwon, dan B.-R. Kim. 2007. Brazilin and the extract from *Caesalpinia sappan* L. protect oxidative injury through the expression of heme oxygenase-1. *BioFactors*. 30:149–157.
- Depkes RI. 2005. Pharmaceutical care untuk penyakit diabetes mellitus. 1–85.
- DiPiro, J. T., R. L. Talbert, G. C. Yess, G. R. Matzke, B. G. Wells, dan L. M. Posey. 2008. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach Seventh Edition*. New York: MC Graw Hill Education.
- DiPiro, J. T., B. G. Wells, T. L. Schwinghammer, dan C. V. DiPiro. 2015. *Pharmacotherapy Handbook Ninth Edition*. New York: MC Graw Hill Education.
- Direktorat Obat Asli Indonesia. 2008. *Caesalpinia sappan* L. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Ellis, G. P. dan G. B. West. 2011. *Progress in Medicinal Chemistry*. Edisi Volume 8. Inggris: Butterworth-Heinemann.
- Etuk, E. U. 2010. Animals models for studying diabetes mellitus. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 1(2):130–134.
- Fardhyanti, D. S. dan R. D. Riski. 2015. Pemungutan brazilin dari kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dengan metode maserasi dan aplikasinya untuk pewarnaan kain. *Jurnal Bahan Alam Terbarukan*. 4(1):6–13.
- Fatani, S. H., A. T. Babakr, E. M. NourEldin, dan A. A. Almarzouki. 2016. Lipid peroxidation is associated with poor control of type-2 diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 28–31.
- Febriyenti, N. Suharti, H. Lucida, E. Husni, dan O. Sedona. 2018. Karakterisasi dan studi aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol secang (*Caesalpinia sappan* L.). *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*. 5(1):23–27.
- Fuhrman, B. dan M. Aviram. 2001. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Nutrition and Metabolism*. 12:41–48.
- Furman, B. 2017. Glibenclamide. *Reference Module in Biomedical Sciences*. 1–4.
- Ghazizadeh, Z., P. Khaloo, H. Alemi, S. Rabizadeh, H. Mirmiranpour, A. Esteghamati, dan M. Nakhjavani. 2019. Definition of an oxidative stress status

by combined assessment of malondialdehyde and oxidized-LDL : a study in patients with type 2 diabetes and control. *Meta Gene*. 19:91–97.

Grotto, D., L. S. Maria, J. Valentini, C. Paniz, dan C. Garcia. 2009. Importance of lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim. Nova*. 32(1):169–174.

Gwarzo, M. Y., J. H. Ahmadu, M. B. Ahmad, dan A. U. A. Dikko. 2014. Serum glucose and malondialdehyde levels in alloxan induced diabetic rats supplemented with methanolic extract of *Tacazzea apiculata*. *International Journal of Biomedical Science*. 10(4):236–242.

Hariana, A. 2006. *Tumbuhan Obat Dan Khasiatnya*. Depok: Niaga Swadaya.

Holidah, D., F. M. Christianty, dan W. Z. Ilma. 2016. Green tea extract effect on blood glucose level and liver histopathology in diabetic mice. *Proceeding ICMHS*. 2016. 35–38.

Ighodaro, O. M., A. M. Adeosun, dan O. A. Akinloye. 2018. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. *Medicina*. 53:365–374.

Integrated Taxonomic Information System. 2019. *Caesalpinia sappan* L. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=506349#null.

International Diabetes Federation. 2017. *IDF Diabetes Atlas Seventh Edition*. Belgium.

Jusman, S. W. A. dan A. S. Halim. 2009. Oxidative stress in liver tissue of rat induced by chronic systemic hypoxia. *Makara Kesehatan*. 13(1):34–38.

Kaur, H., M. H. Amini, P. K. Prabhakar, A. Singh, dan A. Suttee. 2016. Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Caesalpinia sappan* L. leaves. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 8(6):1040–1045.

Khil, L., S. Han, S. Kim, C. TS, S. Jeon, dan D. So. 1999. Effects of brazilin on GLUT4 recruitment in isolated rat epididymal adipocytes. *Biochem Pharmacol*. 58(11):1705–1712.

Khoubnasabjafari, M., K. Ansarin, dan A. Jouyban. 2015. Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *BioImpacts*. 5(3):123–127.

- Lailatul, N. F., D. Lyrawati, dan M. Handaru. 2015. Efek pemberian asam alfa lipoat terhadap kadar mda dan gambaran histologi pada hati tikus wistar jantan dengan diabetes melitus tipe 1. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 28(3):170–176.
- Lenzen, S. 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 51:216–226.
- Lipinski, B. 2001. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 15:203–210.
- Madiseh, M. R., A. M. Tehrani, M. Bahmani, dan M. R. Kopaei. 2016. The research and development on the antioxidants in prevention of diabetic complications. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 9(9):825–831.
- Maritim, A. C., R. A. Sanders, dan J. B. Watkins. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants : a review. *Journal of Biochemical Molecular Toxicology*. 17(1):24–38.
- McEvoy, G. K., E. K. Snow, L. Kester, K. Litvak, J. L. Miller, dan O. H. Welsh. 2011. *AHFS Drug Information Essentials: Point of Care Drug Information for Health Care Professionals*. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists.
- National Diabetes Control Programme (NDCP). 2010. *National Clinical Guidelines for Management of Diabetes Mellitus*. Kenya: Ministry of Public Health and Sanitation.
- Nirmal, N. P., M. S. Rajput, R. G. S. V Prasad, dan M. Ahmad. 2015. Brazilin from *Caesalpinia sappan* heartwood and its pharmacological activities : a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 8(6):421–430.
- Novidiyanto., Farmawati, Arta., Lestari, Lily L., 2016. Pengaruh pemberian kecambah kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) terhadap kadar malondealdehid (MDA) plasma dan jaringan hati tikus *Sprague Dawley* yang diberi pakan lemak tinggi. *Jurnal Gizi Klinik Indonesia*. 13(2): 82-89.
- Obi, B. C., T. C. Okoye, V. E. Okpashi, C. N. Igwe, dan E. O. Alumanah. 2016. Comparative study of the antioxidant effects of metformin, glibenclamide, and repaglinide in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Diabetes Research*. 1–5.
- Papich, M. G. 2016. *Glyburide*. Saunders Handbook of Veterinary Drugs.
- Pe´rez-Matute, P., M. A. Zulet, dan J. A. Martı´nez. 2009. Reactive species and diabetes : counteracting oxidative stress to improve health. *Current Opinion in Pharmacology*. 9:771–779.

- Pham-huy, L. A., H. He, dan C. Pham-huy. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*. 4(2):89–96.
- Plows, J. F., J. L. Stanley, P. N. Baker, C. M. Reynolds, dan M. H. Vickers. 2018. The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*. 19:1–21.
- Prasetyono, D. S. 2012. *A-Z Daftar Tanaman Obat Ampuh Di Sekitar Kita*. Yogyakarta: Flashbooks.
- Price, S. A. dan L. M. Wilson. 2005. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Edisi Edisi 6, V. Penerbit Buku Kedokteran EGC: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- PubChem. 2005. Alloxan. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5781#section=Top>.
- Ridwan, E. 2013. Etika pemanfaatan hewan percobaan dalam penelitian kesehatan. *J Indon Med Assoc*. 63(3):112–116.
- Royal Society of Chemistry. 2013. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Royal Society of Chemistry.
- Saefudin, G. Pasaribu, Sofnie, dan E. Basri. 2014. The effect of sappan wood (*Caesalpinia sappan* L.) extract on blood glucose level in white rats. *Indonesian Journal of Forestry Research*. 1(2):109–115.
- Safithri, F., A. N. Fauziyah, dan D. Hermayanti. 2018. Penurunan stres oksidatif setelah pemberian ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.). *Saintika Medika : Jurnal Ilmu Kesehatan Dan Kedokteran Keluarga*. 14(2):81–86.
- Salway, J. G. 2012. *Medical Biochemistry at a Glance*. Edisi Third Edit. Surrey, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Sarumathy, K., T. Vijay, S. Palani, K. Sakthivel, dan M. S. D. Rajan. 2011. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Caesalpinia sappan* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Int J Pharm & Therapeutics*. 1:19–31.
- Sayuti, K. dan R. Yenrina. 2015. *Antioksidan Alami Dan Sintetik*. Padang: Andalas University Press.
- Sharma, A., S. Bansal, dan R. K. Nagpal. 2003. Lipid peroxidation in bronchial asthma. *Indian Journal of Pediatrics*. 70:715–717.
- Siddique, M. A. H., A. Begum, S. Begum, M. H. Khan, M. Saiedullah, A. Haque,

- M. A. Rahman, dan L. Ali. 2016. Comparison of antioxidative effects of biguanides and sulfonylureas monotherapy on total antioxidant status in newly-diagnosed patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Case Reports*. 1(1):104.
- Szendroedi, J., E. Phielix, dan M. Roden. 2012. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*. 8:92–103.
- Szkudelski, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b cells of the rat pancreas. *Physiological Research*. 50:536–546.
- Tangvarasittichai, S. dan O. Tangvarasittichai. 2009. Serum levels of malondialdehyde in type 2 diabetes mellitus thai subjects. *Sriraj Medical Journal*. 61(1):20–23.
- Tapas, A., D. Sakarkar, dan R. Kakde. 2008. Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 7(3):1089–1099.
- Ullah, A., A. Khan, dan I. Khan. 2016. Diabetes mellitus and oxidative stress — a concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 24:547–553.
- Urso, M. L. dan P. M. Clarkson. 2003. Oxidative stress, exercise , and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 189:41–54.
- Villamena, F. A. 2013. *Molecular Basis of Oxidative Stress: Chemistry, Mechanisms, and Disease Pathogenesis*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Volk, B. W., dan E. R. Arquilla. 2012. *The Diabetic Pancreas*. California: Springer Science & Business Media.
- Wikanta, T., R. Prehati, L. Rahayu, dan N. D. Fajarningsih. 2010. Pengaruh pemberian ekstrak etanol *Turbinaria decurrens* terhadap perbaikan kerusakan hati tikus putih. *Jurnal Pascapanen Dan Bioteknologi Kelautan Dan Perikanan*. 5(1):19–28.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami Dan Radikal Bebas: Potensi Dan Aplikasi Dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius.
- World Health Organization. 2016. *Global Report on Diabetes*.
- You, E.-J., L.-Y. Khil, W.-J. Kwak, H.-S. Won, S.-H. Chae, B.-H. Lee, dan C.-K. Moon. 2005. Effects of brazilin on the production of fructose-2, 6-bisphosphate in rat hepatocytes. *Journal of Ethnopharmacology*. 102:53–57.

LAMPIRAN

Lampiran 4. 1 Determinasi Kayu Secang

Kode Dokumen : FR-AUK-064 Revisi : 0

 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
POLITEKNIK NEGERI JEMBER
LABORATORIUM TANAMAN
Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531
E-mail : Polije@polije.ac.id Web Site : <http://www.Polije.ac.id>

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN
No: 63/PL17.3.1.02/LL/2018

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Farmasi Universitas Jember No: 2670/UN25.13/LL/2018 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Dwi Aftianingsih
NIM : 152210101131
Jur/Fak/PT : Fakultas Farmasi/ Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:
Kingdom/Regnum: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Ordo: Fabales; Famili: Caesalpiniaceae; Genus: Caesalpinia; Spesies: Caesalpinia sappan, L

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 6 Desember 2018
Laboratorium Tanaman

Liliik Mastuti, MP
NIP. 195808201987032001

Lampiran 4. 2 Persetujuan Komisi Etik Penelitian Kesehatan

	KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER (THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)
ETHIC COMMITTEE APPROVAL <u>No.455/UN25.8/KEPK/DL/2019</u>	
Title of research protocol	: "Antidiabetic Efficacy of Ethanol Caesalpinia Sappan Wood (Caesalpinia Sappan) in Alloxan Induced Diabetic Rat"
Document Approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Diana Holidah, S.F., M.Farm., Apt
Member of research	: 1. Noer Sidqi Muhannadiy 2. Nur Huda 3. Iskandar Parlindungan Artha Siregar 4. Dwi Aftianingsih
Responsible Physician	: Diana Holidah, S.F., M.Farm., Apt
Date of approval	: May-August 21 st , 2019
Place of research	: Laboratorium Farmasi Klinik Dan Komunitas Fakultas Farmasi Universitas Jember
The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember States That the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.	
Jember, June 21 st , 2019	
 Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember (Dr. Bahardyan P. M. Kes, Sp. Pros)	 Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember (Dr. Ayu Ratna Dewanti, M.Si)

Lampiran 4. 3 Perhitungan Larutan Aloksan Dosis 135 mg/kgBB

Dosis aloksan yang dipakai = 135 mg/kgBB

Dimisalkan berat badan tikus = 200 gram

Dosis tikus = $\frac{135 \text{ mg}}{1000 \text{ gram}} \times 200 \text{ gram}$

= 27 mg dalam 0,2 ml

Volume maksimal sediaan untuk 1 tikus 200 gram = 0,2 ml

Volume yang dibutuhkan :

= \sum Tikus x Volume pemberian tiap tikus

= 20 ekor x 0,2 ml

= 4 ml untuk 20 ekor tikus (kecuali kelompok normal)

Volume yang dibuat 5 ml

Jumlah aloksan yang di timbang untuk 5 ml:

= $\frac{27 \text{ mg}}{0,2 \text{ ml}} \times 5 \text{ ml}$

= 675 mg dalam 5 ml NaCl 0,9%

Lampiran 4. 4 Perhitungan Dosis Glibenklamid 0,9 mg/kgBB

Dosis terapi glibenklamid pada manusia = 10 mg/hari

Dosis konversi tikus 200 mg = $0,018 \times 10 \text{ mg}$

$$= 0,18 \text{ mg}$$

Dosis mg/kgBB = $\frac{1000 \text{ gram}}{200 \text{ gram}} \times 0,18 \text{ mg}$

$$= 0,9 \text{ mg/kgBB}$$

Misal berat badan tikus 200 gram maka:

Dosis = $\frac{0,9 \text{ mg}}{1000 \text{ gram}} \times 200 \text{ gram}$

$$= 0,18 \text{ mg dalam } 2 \text{ ml}$$

Volume maksimal sediaan untuk 1 ekor tikus 200 gram = 2 ml

Volume yang dibutuhkan :

$$= \sum \text{ tikus } \times \text{ Volume pemberian } \times \sum \text{ lama perlakuan}$$

$$= 4 \text{ ekor } \times 2 \text{ ml } \times 7 \text{ hari}$$

$$= 56 \text{ ml}$$

Volume dibuat = 100 ml

Jumlah glibenklamid yang ditimbang untuk 100 ml:

$$= \frac{0,18 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml}$$

$$= 9 \text{ mg dalam } 100 \text{ ml CMC Na } 1\%$$

Lampiran 4. 5 Perhitungan Dosis Ekstrak Etanol Kayu Secang

4.3.1 Kelompok uji ekstrak kayu secang dosis 50 mg/kgBB

$$\begin{aligned} \text{Dosis tikus 200 gram} &= \frac{50 \text{ mg}}{1000 \text{ gram}} \times 200 \text{ gram} \\ &= 10 \text{ mg dalam 2 ml} \end{aligned}$$

Volume maksimal sediaan untuk 1 tikus = 2 ml

Volume yang dibutuhkan:

$$\begin{aligned} &= \sum \text{ tikus} \times \text{ volume pemberian} \times \sum \text{ lama perlakuan} \\ &= 4 \text{ ekor} \times 2 \text{ ml} \times 7 \text{ hari} \\ &= 56 \text{ ml} \end{aligned}$$

Volume dibuat = 100 ml

Jumlah ekstrak yang ditimbang untuk 100 ml:

$$\begin{aligned} &= \frac{10 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml} \\ &= 500 \text{ mg dalam 100 ml CMC Na 1\%} \end{aligned}$$

4.3.2 Kelompok uji ekstrak kayu secang dosis 100 mg/kgBB

$$\begin{aligned} \text{Dosis tikus 200 gram} &= \frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ gram}} \times 200 \text{ gram} \\ &= 20 \text{ mg dalam 2 ml} \end{aligned}$$

Volume maksimal sediaan untuk 1 tikus = 2 ml

Volume yang dibutuhkan:

$$\begin{aligned} &= \sum \text{ tikus} \times \text{ Volume pemberian} \times \sum \text{ lama perlakuan} \\ &= 4 \text{ ekor} \times 2 \text{ ml} \times 7 \text{ hari} \\ &= 56 \text{ ml} \end{aligned}$$

Volume dibuat = 100 ml

Jumlah ekstrak yang ditimbang untuk 100 ml:

$$\begin{aligned} &= \frac{20 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml} \\ &= 1000 \text{ mg dalam 100 ml CMC Na 1\%} \end{aligned}$$

4.3.3 Kelompok uji ekstrak kayu secang dosis 400 mg/kgBB

$$\begin{aligned}\text{Dosis tikus 200 gram} &= \frac{200 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} \times 200 \text{ gram} \\ &= 80 \text{ mg dalam 2 ml}\end{aligned}$$

Volume maksimal sediaan untuk 1 tikus = 2 ml

Volume yang dibutuhkan:

$$\begin{aligned}&= \sum \text{ tikus} \times \text{Volume pemberian} \times \sum \text{ lama perlakuan} \\ &= 4 \text{ ekor} \times 2 \text{ ml} \times 7 \text{ hari} \\ &= 56 \text{ ml}\end{aligned}$$

Volume dibuat = 100 ml

Jumlah ekstrak yang ditimbang untuk 100 ml:

$$\begin{aligned}&= \frac{80 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml} \\ &= 4000 \text{ mg dalam 100 ml CMC Na 1\%}\end{aligned}$$

Lampiran 4. 6 Perhitungan Konsentrasi Baku MDA

4.4.1 Profil TEP

Kadar : $\geq 96\%$

Mr : 220,31 g/mol

Massa Jenis : 0,919 g/mL

4.4.2 Konsentrasi TEP

Molaritas : $\frac{\text{Massa jenis} \times 1000 \times \text{kadar}}{\text{Mr}}$ Molaritas : $\frac{0,919 \text{ g/ml} \times 1000 \times \frac{96}{100}}{220,31 \text{ g/mol}}$

Molaritas : 4,0045 mol/L

4.4.3 Larutan Stok 1

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$4,0045 \text{ mol/L} \times (5 \mu\text{L} \times 10^{-3}) \text{ mL} = M_2 \times 10 \text{ mL}$$

$$0,02002 \text{ mol} = M_2 \times 10 \text{ mL}$$

$$0,002002 \text{ mol/mL} = M_2$$

$$2002 \mu\text{M} = M_2$$

Dipipet 5 μL TEP dilarutkan dalam aquadest sampai 10 mL.

4.4.4 Larutan Stok 2

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$2002 \mu\text{mol/mL} \times 1 \text{ mL} = M_2 \times 10 \text{ mL}$$

$$2002 \mu\text{mol} = M_2 \times 10 \text{ mL}$$

$$0,002002 \text{ mol/mL} = M_2$$

$$200,2 \mu\text{M} = M_2$$

Dipipet 1 mL Larutan Stok 1 dilarutkan dalam aquadest sampai 10 mL.

4.4.5 Pengenceran

Konsentrasi 5, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35 dan 39 μM

1) Konsentrasi 5 μM

$$\frac{x}{10 \text{ ml}} \times 200,2 \mu\text{M} = 5 \mu\text{M}$$

$$x = 0,250 \text{ mL} = 250 \mu\text{L}$$

2) Konsentrasi 7 μM

$$\frac{x}{10 \text{ ml}} \times 200,2 \mu\text{M} = 7 \mu\text{M}$$

$$x = 0,350 \text{ mL} = 350 \mu\text{L}$$

3) Konsentrasi 11 μM

$$\frac{x}{10 \text{ ml}} \times 200,2 \mu\text{M} = 11 \mu\text{M}$$

$$x = 0,550 \text{ mL} = 550 \mu\text{L}$$

4) Konsentrasi 15 μM

$$\frac{x}{10 \text{ ml}} \times 200,2 \mu\text{M} = 15 \mu\text{M}$$

$$x = 0,750 \text{ mL} = 750 \mu\text{L}$$

5) Konsentrasi 19 μM

$$\frac{x}{10 \text{ ml}} \times 200,2 \mu\text{M} = 19 \mu\text{M}$$

$$x = 0,950 \text{ mL} = 950 \mu\text{L}$$

6) Konsentrasi 23 μM

$$\frac{x}{10 \text{ ml}} \times 200,2 \mu\text{M} = 23 \mu\text{M}$$

$$x = 1,150 \text{ mL} = 1150 \mu\text{L}$$

7) Konsentrasi 27 μM

$$\frac{x}{10 \text{ ml}} \times 200,2 \mu\text{M} = 27 \mu\text{M}$$

$$x = 1,350 \text{ mL} = 1350 \mu\text{L}$$

8) Konsentrasi 31 μM

$$\frac{x}{10 \text{ ml}} \times 200,2 \mu\text{M} = 31 \mu\text{M}$$

$$x = 1,550 \text{ mL} = 1550 \mu\text{L}$$

9) Konsentrasi 35 μM

$$\frac{x}{10 \text{ ml}} \times 200,2 \mu\text{M} = 35 \mu\text{M}$$

$$x = 1,750 \text{ mL} = 1750 \mu\text{L}$$

10) Konsentrasi 39 μM

$$\frac{x}{10 \text{ ml}} \times 200,2 \mu\text{M} = 39 \mu\text{M}$$

$$x = 1,950 \text{ mL} = 1950 \mu\text{L}$$



Lampiran 4. 7 Perhitungan Pembuatan Reagen

4.5.1 Pembuatan TCA 20%

dibutuhkan 100 μ L TCA untuk 11 konsentrasi = 1,1 mL TCA

$$20\% = \frac{20 \text{ g}}{100 \text{ mL}} = \frac{1 \text{ g}}{5 \text{ mL}}$$

menimbang 1 gram TCA dilarutkan dalam aquadest sampai 5 mL.

4.5.2 Pembuatan Na-TBA 1%

TBA larut dalam NaOH 1 M. Untuk membuat Na-TBA 1%, dibuat larutan NaOH 1 M sebagai berikut :

$$\text{Molaritas} = \frac{\text{Massa}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{V}$$

$$1 \text{ M} = \frac{\text{Massa}}{40} \times \frac{1000}{25 \text{ mL}}$$

$$\text{Massa} = 1 \text{ gram}$$

Melarutkan 1 gram NaOH dalam aquadest sampai 25 mL.

Setelah itu, membuat larutan Na-TBA 1% :

$$1\% = \frac{1 \text{ g}}{100 \text{ mL}} = \frac{0,1 \text{ g}}{10 \text{ mL}}$$

Menimbang 0,1 gram TBA dan dilarutkan dalam NaOH 1 M sampai 10 mL.

4.5.3 Pembuatan larutan HCl 1 N

Mengencerkan HCL 12 N menjadi HCl 1 N :

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$12 \text{ N} \times 1 \text{ mL} = 1 \text{ N} \times V_2$$

$$V_2 = 12 \text{ mL}$$

Memipet 1 mL HCL 12 N, dilarutkan dalam aquadest sampai 12 mL

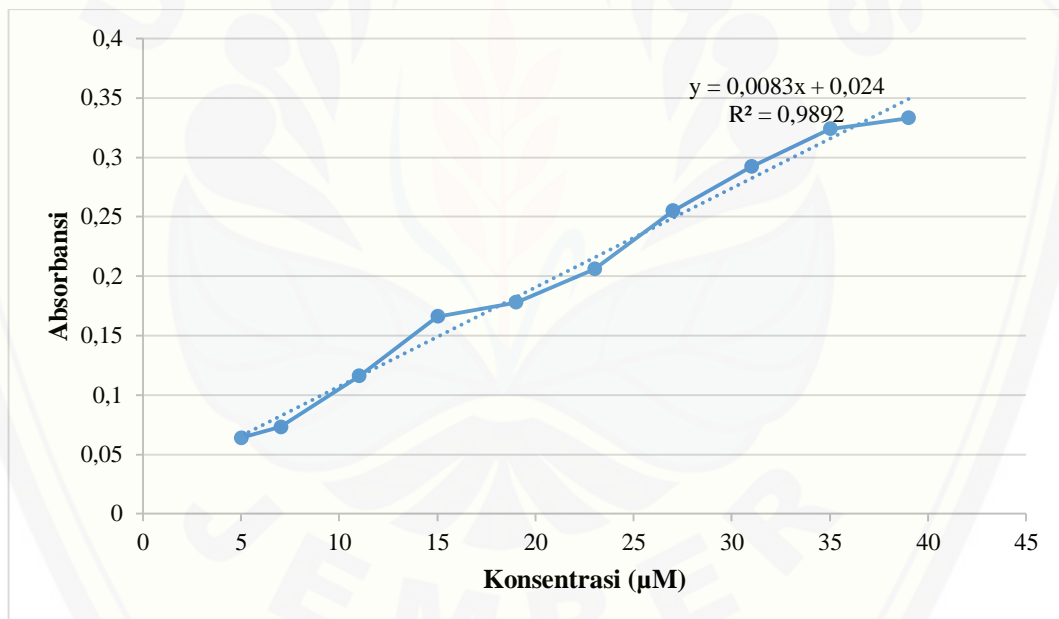
Lampiran 4. 8 Perhitungan Rendemen Ekstrak Etanol Kayu Secang

$$\begin{aligned} \text{Berat simplisia kayu secang} &= 250 \text{ gram} \\ \text{Berat ekstrak kayu secang} &= 40,42 \text{ gram} \\ \text{Rendemen ekstrak kayu secang} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{40,42 \text{ gram}}{250 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 16,16 \% \end{aligned}$$



Lampiran 4. 9 Kurva Baku MDA

Konsentrasi (μM)	Absorbansi
5	0,064
7	0,073
11	0,116
15	0,166
19	0,178
23	0,206
27	0,255
31	0,292
35	0,324
39	0,333



Lampiran 4. 10 Kadar MDA Plasma

Perlakuan	Kadar MDA (μM)	Rata-rata \pm SD
Kontrol Normal	1,819	2,331 \pm 0,845
	2,181	
	1,578	
	3,747	
Kontrol (-) CMC-Na 1%	13,747	13,175 \pm 1,128
	12,422	
	11,819	
	14,711	
Kontrol (+) Glibenklamid	5,434	4,470 \pm 0,584
	4,229	
	4,349	
	3,867	
Ekstrak Etanol Kayu Secang Dosis 50 mg/kgBB	10,614	8,837 \pm 1,141
	7,964	
	9,048	
	7,723	
Ekstrak Etanol Kayu Secang Dosis 100 mg/kgBB	5,916	5,343 \pm 1,191
	3,988	
	7,000	
	4,470	
Ekstrak Etanol Kayu Secang Dosis 400 mg/kgBB	3,145	3,657 \pm 1,657
	1,699	
	3,506	
	6,277	

Lampiran 4. 11 Kadar MDA Jaringan Hati

Perlakuan	Kadar MDA (μM)	Rata-rata \pm SD
Kontrol Normal	5,916	5,133 \pm 0,725
	5,554	
	5,072	
	3,988	
Kontrol (-) CMC-Na 1%	15,795	13,355 \pm 1,840
	13,627	
	13,386	
	10,614	
Kontrol (+) Glibenklamid	7,602	5,675 \pm 1,905
	7,361	
	4,711	
	3,024	
Ekstrak Etanol Kayu Secang Dosis 50 mg/kgBB	10,735	10,524 \pm 2,058
	13,506	
	10,133	
	7,723	
Ekstrak Etanol Kayu Secang Dosis 100 mg/kgBB	7,361	8,416 \pm 2,622
	7,120	
	6,277	
	12,904	
Ekstrak Etanol Kayu Secang Dosis 400 mg/kgBB	7,602	7,964 \pm 0,571
	7,482	
	8,928	
	7,843	

Lampiran 4. 12 Hasil Analisis Data Kadar MDA Plasma

4.9.1 Uji Normalitas

Tests of Normality

KELOMPOK	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
HASIL POSITIF	,321	4	.	,881	4	,343
NEGATIF	,218	4	.	,957	4	,762
NORMAL	,311	4	.	,842	4	,201
DOSIS 50	,246	4	.	,902	4	,442
DOSIS 100	,237	4	.	,941	4	,662
DOSIS 400	,281	4	.	,936	4	,630

a. Lilliefors Significance Correction

Makna : nilai Sig. > 0,05 pada semua kelompok, maka dapat disimpulkan bahwa data sampel terdistribusi normal.

4.9.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

HASIL

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,803	5	18	,562

Makna : nilai Sig. > 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa data memiliki varian yang sama atau tidak terdapat perbedaan yang signifikan (homogen).

4.9.3 Uji One-Way Anova

ANOVA

HASIL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	322,809	5	64,562	37,277	,000
Within Groups	31,175	18	1,732		
Total	353,984	23			

Makna : nilai Sig. < 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan kadar MDA plasma yang signifikan antar kelompok perlakuan.

4.9.4 Uji Least Significant Different (LSD)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: HASIL

LSD

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
POSITIF	NEGATIF	-8,70500*	,93058	,000	-10,6601	-6,7499
	NORMAL	2,13850*	,93058	,034	,1834	4,0936
	DOSIS 50	-4,36750*	,93058	,000	-6,3226	-2,4124
	DOSIS 100	-,87375	,93058	,360	-2,8288	1,0813
	DOSIS 400	,81300	,93058	,394	-1,1421	2,7681
NEGATIF	POSITIF	8,70500*	,93058	,000	6,7499	10,6601
	NORMAL	10,84350*	,93058	,000	8,8884	12,7986
	DOSIS 50	4,33750*	,93058	,000	2,3824	6,2926
	DOSIS 100	7,83125*	,93058	,000	5,8762	9,7863
	DOSIS 400	9,51800*	,93058	,000	7,5629	11,4731
NORMAL	POSITIF	-2,13850*	,93058	,034	-4,0936	-,1834
	NEGATIF	-10,84350*	,93058	,000	-12,7986	-8,8884
	DOSIS 50	-6,50600*	,93058	,000	-8,4611	-4,5509
	DOSIS 100	-3,01225*	,93058	,005	-4,9673	-1,0572
	DOSIS 400	-1,32550	,93058	,171	-3,2806	,6296
DOSIS 50	POSITIF	4,36750*	,93058	,000	2,4124	6,3226
	NEGATIF	-4,33750*	,93058	,000	-6,2926	-2,3824
	NORMAL	6,50600*	,93058	,000	4,5509	8,4611
	DOSIS 100	3,49375*	,93058	,001	1,5387	5,4488
	DOSIS 400	5,18050*	,93058	,000	3,2254	7,1356
DOSIS 100	POSITIF	,87375	,93058	,360	-1,0813	2,8288
	NEGATIF	-7,83125*	,93058	,000	-9,7863	-5,8762
	NORMAL	3,01225*	,93058	,005	1,0572	4,9673
	DOSIS 50	-3,49375*	,93058	,001	-5,4488	-1,5387
	DOSIS 400	1,68675	,93058	,087	-,2683	3,6418
DOSIS 400	POSITIF	-,81300	,93058	,394	-2,7681	1,1421
	NEGATIF	-9,51800*	,93058	,000	-11,4731	-7,5629
	NORMAL	1,32550	,93058	,171	-,6296	3,2806
	DOSIS 50	-5,18050*	,93058	,000	-7,1356	-3,2254
	DOSIS 100	-1,68675	,93058	,087	-3,6418	,2683

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

Lampiran 4. 13 Hasil Analisis Data Kadar MDA Jaringan Hati

4.10.1 Uji Normalitas

Tests of Normality

KELOMPOK	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
HASIL POSITIF	,278	4	.	,887	4	,368
NEGATIF	,256	4	.	,957	4	,763
NORMAL	,221	4	.	,938	4	,642
DOSIS 50	,215	4	.	,980	4	,904
DOSIS 100	,386	4	.	,767	4	,055
DOSIS 400	,323	4	.	,818	4	,138

a. Lilliefors Significance Correction

Makna : nilai Sig. > 0,05 pada semua kelompok, maka dapat disimpulkan bahwa data sampel terdistribusi normal.

4.10.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

HASIL

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,516	5	18	,234

Makna : nilai Sig. > 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa data memiliki varian yang sama atau tidak terdapat perbedaan yang signifikan (homogen).

4.10.3 Uji One-Way Anova

ANOVA

HASIL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	189,164	5	37,833	8,971	,000
Within Groups	75,912	18	4,217		
Total	265,076	23			

Makna : nilai Sig. < 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan kadar MDA plasma yang signifikan antar kelompok perlakuan.

4.10.4 Uji *Least Significant Different* (LSD)**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: HASIL

LSD

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
POSITIF	NEGATIF	-7,68100*	1,45213	,000	-10,7318	-4,6302
	NORMAL	,54200	1,45213	,713	-2,5088	3,5928
	DOSIS 50	-4,84975*	1,45213	,004	-7,9006	-1,7989
	DOSIS 100	-2,74100	1,45213	,075	-5,7918	,3098
	DOSIS 400	-2,28925	1,45213	,132	-5,3401	,7616
NEGATIF	POSITIF	7,68100*	1,45213	,000	4,6302	10,7318
	NORMAL	8,22300*	1,45213	,000	5,1722	11,2738
	DOSIS 50	2,83125	1,45213	,067	-,2196	5,8821
	DOSIS 100	4,94000*	1,45213	,003	1,8892	7,9908
	DOSIS 400	5,39175*	1,45213	,002	2,3409	8,4426
NORMAL	POSITIF	-,54200	1,45213	,713	-3,5928	2,5088
	NEGATIF	-8,22300*	1,45213	,000	-11,2738	-5,1722
	DOSIS 50	-5,39175*	1,45213	,002	-8,4426	-2,3409
	DOSIS 100	-3,28300*	1,45213	,036	-6,3338	-,2322
	DOSIS 400	-2,83125	1,45213	,067	-5,8821	,2196
DOSIS 50	POSITIF	4,84975*	1,45213	,004	1,7989	7,9006
	NEGATIF	-2,83125	1,45213	,067	-5,8821	,2196
	NORMAL	5,39175*	1,45213	,002	2,3409	8,4426
	DOSIS 100	2,10875	1,45213	,164	-,9421	5,1596
	DOSIS 400	2,56050	1,45213	,095	-,4903	5,6113
DOSIS 100	POSITIF	2,74100	1,45213	,075	-,3098	5,7918
	NEGATIF	-4,94000*	1,45213	,003	-7,9908	-1,8892
	NORMAL	3,28300*	1,45213	,036	,2322	6,3338
	DOSIS 50	-2,10875	1,45213	,164	-5,1596	,9421
	DOSIS 400	,45175	1,45213	,759	-2,5991	3,5026
DOSIS 400	POSITIF	2,28925	1,45213	,132	-,7616	5,3401
	NEGATIF	-5,39175*	1,45213	,002	-8,4426	-2,3409
	NORMAL	2,83125	1,45213	,067	-,2196	5,8821
	DOSIS 50	-2,56050	1,45213	,095	-5,6113	,4903
	DOSIS 100	-,45175	1,45213	,759	-3,5026	2,5991

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

Lampiran 4. 14 Dokumentasi



Pengambilan kayu secang



Proses rotav



Ekstrak kental kayu secang



Pembedahan tikus



10 seri konsentrasi kurva baku



Pengukuran MDA plasma dan jaringan hati