

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Masalah kesehatan masyarakat dan pemerintah Indonesia terus berlanjut hingga saat ini. Salah satu penyakit yang paling umum di Indonesia adalah penyakit kencing manis, juga dikenal sebagai diabetes melitus (I Wayan Merta, 2016). Berdasarkan Data World Health Organization (WHO) mengungkapkan bahwa untuk saat ini terdapat 171 juta orang di seluruh dunia yang menderita diabetes mellitus (DM), dan jumlah ini akan meningkat dua kali lipat menjadi 365 juta pada tahun 2030. Indonesia adalah negara keempat dengan pasien diabetes terbanyak, menyusul China, India dan Amerika Serikat, dengan prevalensi sebesar 10,7 juta jiwa (Cita Primada Hari Anugrahini, 2021).

Diabetes adalah penyakit endokrin dan metabolik yang heterogen yang ditandai dengan hiperglikemia akibat defisiensi atau kurangnya atau berkurangnya efektivitas kerja insulin, sekresi insulin atau keduanya. Hiperglikemia menyebabkan kerusakan kesehatan jangka panjang dan kegagalan berbagai organ tubuh terutama saraf, pembuluh darah, ginjal, mata, dan jantung (Sneha & Gangil, 2019).

Diabetes mellitus merupakan suatu penyakit degeneratif yang tidak bisa disembuhkan (Ekasari, 2019). Pengobatan diabetes harus diberikan seumur hidup penderita agar terhindar dari komplikasi lainnya. Namun, berdasarkan penelitian yang dilakukan Mierza et.al., pada tahun 2023, obat-obat diabetes seperti Metformin dan Glibenklamid memiliki efek samping seperti hipoglikemia dan gangguan gastrointestinal seperti mual dan muntah. Hal tersebut merupakan masalah yang serius sehingga perlu penanggulangan yang lebih baik (Mierza et al., 2023). Untuk menghindari terjadinya efek tersebut, usaha pencarian metode pengobatan yang lebih aman terus dilakukan dan obat herbal yang berasal dari tanaman menjadi salah satu sumber bahan aktif untuk penemuan obat baru yang lebih aman dan efektif.

Masyarakat Indonesia telah mengenal tanaman herbal dalam pengobatan berbagai macam penyakit. Salah satu tanaman yang dapat digunakan untuk menurunkan kadar gula darah adalah daun pangi (*Pangium edule* Reinw). Pangi merupakan tumbuhan liar yang tersebar luas hampir diseluruh daerah di Indonesia dan bijinya banyak digunakan sebagai bumbu dasar pembuatan olahan pangan seperti rawon, dan pindang (Yunus et al., 2024).

Pangi (*Pangium edule* Reinw.) mengandung asam lemak linoleat dan oleat yang cukup tinggi, senyawa golongan flavonoid, saponin, triterpenoid dan kumarin (Samudry et al., 2018). Berdasarkan studi literatur Yunus et. al. (2023) menunjukkan bahwa didalam ekstrak pangi bagian daun, buah, dan biji terkandung senyawa aktif yang menjadi sumber kandungan antioksidan. Senyawa-senyawa tersebut diantaranya yaitu fenol, flavonoid, tanin, alkaloid, dan saponin dengan mekanisme menstabilkan atau menghambat radikal bebas sehingga dapat mengurangi stress oksidatif (Yunus et al., 2024). Senyawa Flavonoid yang banyak terkandung didalam daun pangi merupakan senyawa larut air yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan, antimikroba, antibakteri antijamur, antivirus, hepatoprotektif, antiinflamasi dan antidiabetes. Gugus hidroksi (OH) pada flavonoid dapat mengikat glukosa membentuk kompleks flavonoid dengan glukosa. Gugus OH flavonoid yang paling aktif berikatan dengan glukosa terletak pada R₃ di cincin C, terikatnya glukosa dengan flavonoid akan menyebabkan kadar glukosa berkurang (Ramadhani et al., 2021).

Salah satu kelenjar endokrin yang memiliki peran penting dalam mengatur kadar glukosa darah ialah Pankreas. Fluktuasi kadar glukosa dalam plasma memicu penyesuaian sekresi insulin untuk menjaga kadar glukosa darah tetap berada dalam rentang normal. Insulin sebagai hormon anabolik untuk meningkatkan cadangan energi (Wirjatmadja et al., 2021).

(STZ) merupakan agen sitotoksik sel- β pankreas yang sangat selektif dan sering dias untuk menyebabkan nekrosis sel- β dan menginduksi Diabetes Melitus pada *norvegicus*) dalam waktu 48 jam. Mekanisme kerja STZ sebagai agen diabetogenik dan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dapat merusak sel- β pankreas, sehingga dapat terganggu (Furman, 2015).

Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek antidiabetes dari pangi (*Pangium edule* Reinw.) terhadap kadar glukosa, toleransi insulin, parameter



antioksidan dan histopatologi organ pankreas pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi streptozotocin.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak daun pangi (*Pangium edule* Reinw.) berpotensi sebagai antidiabetes?
2. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak daun pangi (*Pangium edule* Reinw.) terhadap kadar gula darah dan parameter aktivitas antioksidan SOD pada tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diabetes mellitus menggunakan streptozotocin?
3. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak daun pangi (*Pangium edule* Reinw.) terhadap histopatologi pankreas tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diabetes mellitus menggunakan streptozotocin?

1.3 Tujuan Penelitian

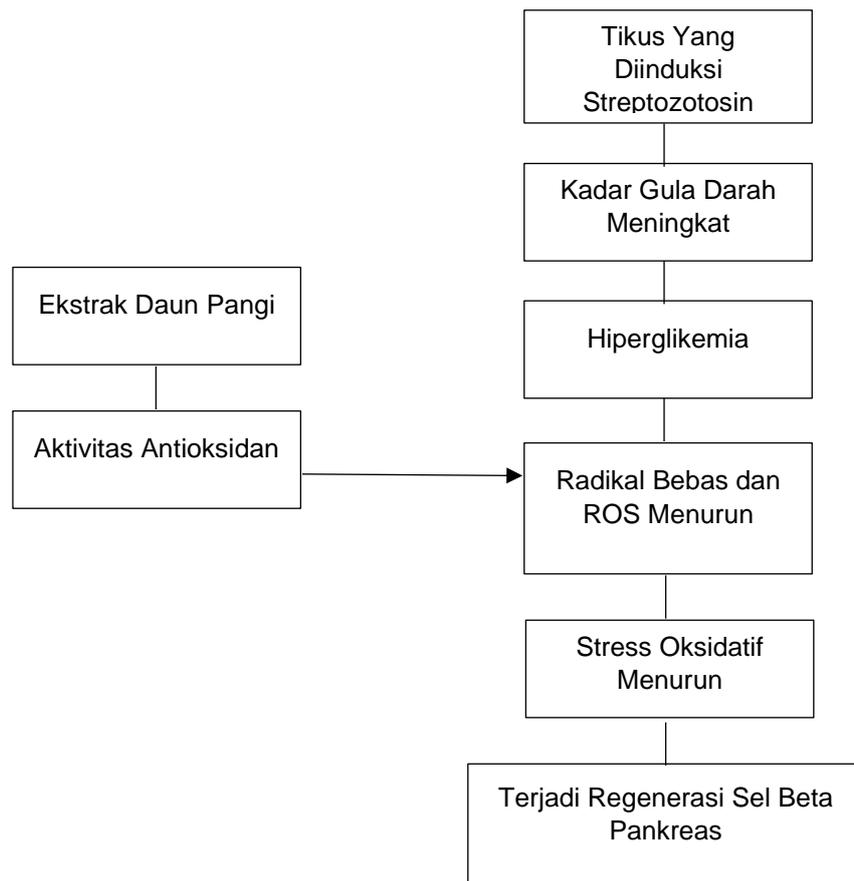
1. Untuk mengetahui metabolit sekunder yang terkandung dari ekstrak daun pangi (*Pangium edule* Reinw.) yang berpotensi sebagai antidiabetes.
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun pangi (*Pangium edule* Reinw.) terhadap kadar gula darah dan parameter aktivitas antioksidan SOD tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diabetes mellitus menggunakan streptozotocin.
3. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun pangi (*Pangium edule* Reinw.) terhadap histopatologi pankreas tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diabetes mellitus menggunakan streptozotocin

1.4 Manfaat Penelitian

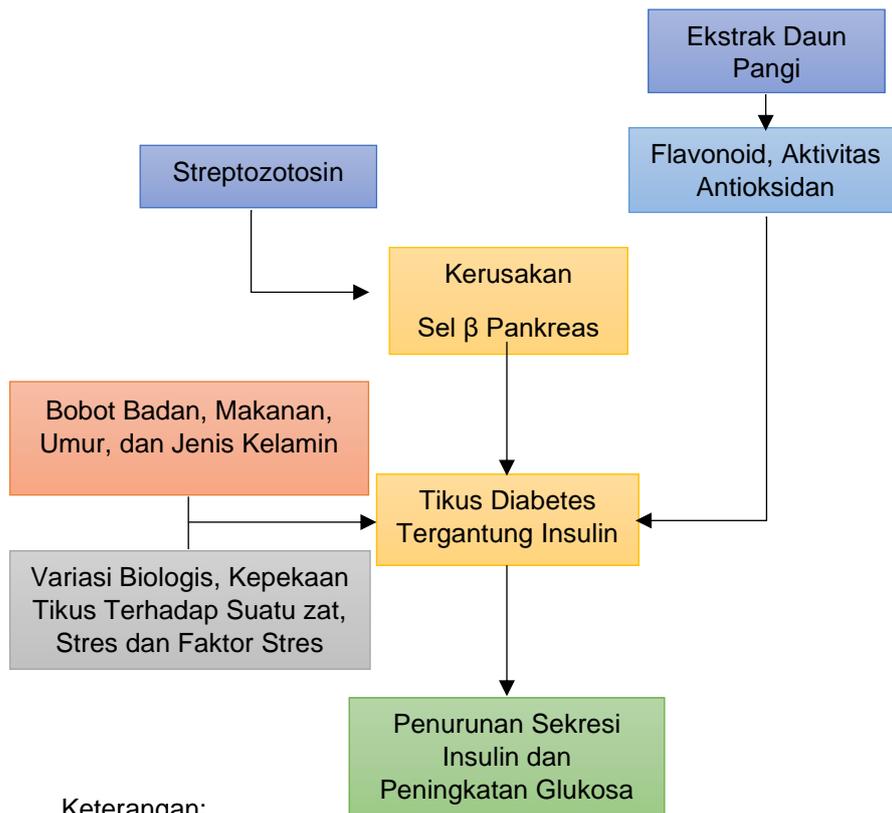
Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan pengembangan ilmu pengetahuan dibidang ilmu farmasi tentang potensi ekstrak daun pangi (*Pangium edule* Reinw) dalam menurunkan glukosa darah dan kemampuannya dalam memperbaiki kerusakan sel beta pankreas tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) diabetes mellitus yang diinduksi Streptozotosin



1.5 Kerangka Teori



1.6 Kerangka Konsep



Keterangan:

Variabel Bebas	Variabel Kendali
Variabel Antara	Variabel Terikat
Variabel Perancu	Variabel Tergantung



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Lokasi dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober sampai dengan bulan Desember 2024. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Universitas Hasanuddin.

2.2 Populasi dan Sampel

Populasi adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan wistar berumur 8 minggu dengan berat badan berkisaran antara 180-200 gram yang sehat secara fisik.

2.3 Alat dan Bahan

2.3.1 Alat Penelitian

Rotary evaporator (Buchi rotavapor R-220®), Toples Kaca, Kertas Saring, Spoit 3 mL, Spoit 1 mL, Alat-Alat Gelas, Cawan Porselen, Tabung Eppendorf, Mikropipet, Easy Touch Glucotest®, Easy Touch Blood Glucotest Strip®, Mortir, Stamper, Pot Organ, Mikroskop Cahaya, Alat-Alat Bedah, Kaca Objek, Rotary Microtom, Media Paraffin, Alat Sentrifugasi, Timbangan Analitik, Botol Timbangan, Embedding Cassete, Floating Bath, Deck Glass, Embedding Center, Sonikator (Bandalin Sonoplus®).

2.3.2 Bahan Penelitian

Daun Pangi, Akuades, Etanol 96%, Streptozotocin (STZ), Metformin, glukosa, Na. CMC 1%, NaCl 0,9%, Xylol, Mayer's Haematoxylin, Toluene, Buffer Formalin 10%, Parafin, Gelatin, Xilen, BNF 10%, PBS.

2.4 Prosedur Kerja

2.4.1 Pengumpulan dan Penyiapan sampel

Sampel daun pangi yang digunakan diperoleh dari Kelurahan Jennae, Kecamatan Liriaja, Kabupaten Soppeng, Sulawesi Selatan. Telah dilakukan determinasi tanaman dengan nomor 109/UN4.11.9/BIO-BOT/PL-03/2024. Daun pangi yang digunakan adalah daun pangi muda, dipetik langsung dari pohonnya pada jam 9-10 pagi. Daun pangi yang diperoleh kemudian dicuci bersih dengan air mengalir. Dilakukan sortasi basah untuk menghilangkan pengotor. Daun pangi dirajang dengan ukuran 1 cm, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan.

2.4.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Pangi

Sebanyak 970 gram daun pangi kering yang telah dipotong kecil-kecil ditimbang dan diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan (1:10). Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi dilakukan selama tiga hari dengan pengadukan. Setelah tiga hari hasil maserasi disaring dengan kertas saring, filtrat yang diperoleh dipekatkan. Dilakukan re-maserasi menggunakan etanol 96% selama 2 hari. Filtrat dipekatkan menggunakan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak kental.



2.4.3 Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Kering

2.4.3.1 Identifikasi Flavonoid dengan pereaksi kimia

Uji flavonoid dilakukan dengan 2 metode, yakni metode pereaksi basa dengan melarutkan ekstrak etanol daun kering pangi ke dalam pelarut akuades, lalu tambahkan beberapa tetes NaOH 20% hingga terbentuk warna kuning. Ekstrak positif mengandung senyawa flavonoid apabila warna kuning memudar saat ditambahkan dengan HCl (Tandi, 2017). Metode selanjutnya yakni metode wilsatter dengan mencampurkan 4ml larutan ekstrak etanol daun pangi ke dalam 1,5 ml metanol 50%, larutan dipanaskan dan ditambahkan logam Mg. Penambahan 5-6 tetes HCl encer akan mengubah warna larutan menjadi warna merah atau jingga yang menandakan ekstrak positif mengandung senyawa flavonoid (Jayashree et al., 2016).

2.4.4 Penetapan Kadar Flavonoid Total

2.4.4.1 Preparasi Larutan Baku Kuersetin

Ditimbang sebanyak 25 mg baku standar kuarsetin dan dilarutkan dalam 25 mL etanol. Larutan stok dipipet sebanyak 1 mL dan dicukupkan volumenya sampai 10 mL dengan etanol sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. larutan standar kuersetin 100 ppm, kemudian dibuat beberapa konsentrasi yaitu 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm dan 14 ppm. Masing-masing konsentrasi larutan standar kuersetin dipipet 1 mL. Kemudian ditambahkan 1 mL $AlCl_3$ 2% dan 1 mL kalium asetat 120 mL. Sampel diinkubasi selama satu jam pada suhu kamar. Absorbansi ditentukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis (Bachtiar, 2023).

2.4.4.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan kuersetin pada range panjang gelombang 400 - 450 nm. Hasil pengukuran menunjukkan panjang gelombang maksimum standar baku kuarsetin berada pada panjang gelombang 435 nm. Panjang gelombang maksimum tersebut yang digunakan untuk mengukur serapan dari sampel ekstrak *Pangium edule einw* (Bachtiar, 2023).

2.4.4.3 Penetapan Kadar Flavonoid

Ditimbang 15 mg ekstrak, dilarutkan dalam 10 mL etanol. Dari larutan tersebut dipipet 1 mL kemudian ditambahkan 1 mL larutan $AlCl_3$ 2% dan 1 mL kalium asetat 120 mM. Sampel diinkubasi selama satu jam pada suhu kamar. Absorbansi ditentukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 435 nm. Sampel dibuat dalam tiga replikasi untuk setiap analisis dan diperoleh nilai rata-rata absorbansi (Bachtiar, 2023).

2.4.3.2 Identifikasi Senyawa Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis

Pengujian KLT dilakukan untuk mengetahui adanya senyawa flavonoid dalam ekstrak. Ekstrak daun pangi dilarutkan menggunakan etanol 96%, kemudian ditotolkan pada lempeng KLT silica gel GF254 ukuran 3x6 cm dan dielusi menggunakan fase gerak etil asetat : n-heksan (3:2) setelah proses elusi selesai, lempen KLT diamati pada lampu UV 254 dan 366 nm. Noda atau bercak yang terlihat ditandai lalu dilanjutkan dengan penyomprotan menggunakan reagen H_2SO_4 , kemudian dihitung nilai Rf-nya dan hasil positif ditandai dengan nilai Rf yang sama dengan baku pembanding Kuarsetin.

2.4.5 Analisis Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

2.4.5.1 Preparasi Sampel

Sampel sebanyak 1 gram dilarutkan dalam campuran pelarut metanol:kloroform (1:1) sebanyak 100 mL. Dilakukan ekstraksi menggunakan Ultrasonic selama 30 menit pada suhu 55°C. Sampel disentrifuse hingga terbentuk 2 fase dan supernatant dimasukkan kedalam vial sebanyak 3 mL dan dilakukan analisis GC MS.

2.4.5.2 Kondisi Kromatografi

Kondisi instrumen GC-MS: Suhu injektor 250°C dengan mode Splitless, tekanan 76,9 kPa dan laju rasio 1:10. Suhu sumber ion dan interface 200°C dan 280°C, waktu solvent cut 30 s. Jenis kolom SH-Rxi-5Sil MS panjang kolom 30 m dengan diameter dalam 0,25 mm dan suhu dinaikkan hingga 200°C dengan waktu tahan 2 menit dan suhu dinaikkan hingga 200°C dengan laju 50°C/min sehingga total waktu analisis 9 menit. Data kromatogram yang diperoleh dibaca dengan menggunakan library NIST (Nasional, 2022).



Analisis dan Analisis Data GC-MS

Analisis data dari hasil analisis *Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)* berupa data kromatogram dianalisis dan dibandingkan dengan library NIST dan Wiley 9. NIST (*Nasional*

Institute of Standard and Technology) merupakan produk aplikasi perangkat lunak yang mengembangkan *library* spectral massa, aplikasi ini berfungsi untuk membantu mengidentifikasi senyawa dengan menyediakan referensi spektra massa untuk instrument GC-MS melalui ionisasi electron dan LC/MS melalui spektrometri massa tandem serta menyediakan indeks retensi fase gas untuk *gass chromatography* (GC). Sedangkan Wiley merupakan database GC-MS spectral yang digunakan untuk membantu mengidentifikasi jenis metabolit ataupun senyawa selama proses identifikasi (Sami, 2022).

Data hasil kromatogram yang telah dibandingkan dengan NIST dan Wiley 9, kemudian dikelompokkan ke dalam *Microsoft excel* berdasarkan jenis metabolit sekunder yang telah didapatkan, kemudian dilakukan pembahasan berdasarkan data yang diperoleh.

2.4.6 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Pangi

Ekstrak daun pangi diuji menggunakan teknik 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Sebanyak 23 mL DPPH dilarutkan dalam 100 mL metanol untuk membuat larutan stok dan untuk ekstrak daun pangi dibuat larutan stok dengan konsentrasi 1000 ppm dalam metanol dan dibuat seri pengenceran dari larutan stok yakni 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, dan 400 ppm. Filtrasi larutan stok DPPH menggunakan metanol menghasilkan campuran yang dapat digunakan dengan absorbansi sekitar 0,973 pada panjang gelombang 517 nm. Dalam tabung reaksi, larutan DPPH 3 mL yang dapat diterapkan dikombinasikan dengan 100 µL larutan stok ekstrak daun pangi. Sebanyak 3 mL larutan yang mengandung DPPH dalam 100 µL metanol dijadikan sebagai standar. Selain itu, tabung disimpan ditempat gelap selama 30 menit. Kemudian, absorbansi ditentukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm (Baliyan et al., 2022; Broto Anung et al., 2023). Berikut rumus yang digunakan untuk menghitung persentase inhibisi:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(A \text{ kontrol} - A \text{ sampel})}{A \text{ kontrol}} \times 100\%$$

Ket: A = Absorbansi

2.4.7 Perlakuan Terhadap Hewan Uji

Delapan belas ekor tikus yang telah berumur sekitar 8 minggu, dengan berat 180-200 g dipelihara pada suhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$ dengan akses bebas terhadap air dan makanan, dalam siklus terang gelap 12/12 jam. Seluruh prosedur dalam penelitian ini dilakukan sesuai pedoman komisi Etik penelitian Fakultas farmasi Universitas Hasanuddin.

Tikus di aklimatisasi selama 14 hari sebelum dilakukan perlakuan dan kemudian dibagi secara acak menjadi 6 kelompok yaitu kelompok I (Kontrol Sehat), Kelompok II (STZ 40 mg/KgBB) Kelompok III (Metformin 200 mg/KgBB) ,Kelompok IV (Ekstrak daun pangi 100 mg/KgBB), Kelompok V (Ekstrak daun pangi 200 mg/KgBB),Kelompok VI (Ekstrak daun pangi 400 mg/KgBB), yang masing-masing terdiri dari 3 ekor tikus. Pada hari pertama penelitian, semua kelompok diambil darah untuk diukur kadar gula darahnya yang selanjutnya diikuti dengan injeksi streptozotosin secara intraperitoneal yang sebelumnya telah dilarutkan kedalam Buffer Citrat pH 4,5, kecuali kelompok I sebagai Kontrol sehat tidak diberikan Streptozotosin. Kadar gula darah tikus selanjutnya diukur pada hari ke 7 sebagai kadar gula darah induksi dengan mengambil darah dari vena ekor dan diukur menggunakan glukometer. Tikus didiagnosa dengan DM tipe 2 jika kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dL (Ghasemi & Jeddi, 2023). Setelah kadar glukosa tikus >200 mg/dL (dicatat sebagai gula darah diabetik), Kelompok IV, V, dan VI diberi suspensi ekstrak daun pangi dengan konsentrasi masing-masing sebesar 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB selama 21 hari. Diakhir perlakuan (hari ke 21), kadar gula darah semua kelompok perlakuan kembali diukur menggunakan glukometer.

2.4.8 Pengujian Pengukuran Toleransi Glukosa

Tes toleransi glukosa secara oral dilakukan pada hari 22 pada semua kelompok perlakuan.



kan dengan beberapa modifikasi mengikuti metode yang dijelaskan oleh Abdollahi a hewan coba dipuaskan selama 8 jam sebelum pengujian. Larutan glukosa (2 ara oral dan pengukuran glukosa darah dari ekor dilakukan pada menit ke- 0, 30, 60 et al., 2011).

Pengukuran Toleransi Insulin

Semua kelompok perlakuan disuntikkan insulin secara intraperitoneal (0,3 IU/kg). a darah dari ekor dilakukan pada menit ke-0, 30, 60, dan 120 (Nurdiana et al., 2017).

Setelah pengujian toleransi insulin, organ pankreas dan plasma dari semua kelompok perlakuan di ambil untuk pengujian selanjutnya.

2.4.10 Pembuatan Preparasi Histologi Pankreas

Organ pankreas di fiksasi menggunakan formalin 10% kemudian dicuci. Spesimen yang telah dibuat kemudian disimpan dalam *Embedding cassette* dan diproses dalam *tissue processor*. Spesimen disusun dalam blok paraffin kemudian diiris menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-5 μm . Irisan dibentangkan di *floating out* pada suhu 40°C. Spesimen diletakkan di slide kaca kemudian dikeringkan menggunakan *hot plate* listrik selama 2 jam kemudian diwarnai dengan hematoxylin dan eosin (H&E) dan ditutup dengan penutup slide kaca. Pengamatan histopatologi dilakukan dibawah mikroskop cahaya (Olympus®) dengan pembesaran 10 dan 40x (Hermawati et al., 2020).

2.4.11 Uji Aktivitas Antioksidan

2.4.11.1 Pengukuran Aktivitas SOD

Adapun tahapan pengukuran aktivitas SOD mengikuti protocol yang tercantum pada SOD kit (Sigma Aldrich). Dimasukkan 20 μL plasma ke dalam sumuran sampel dan blanko 2 dan 20 μL purified water ke dalam sumuran blanko 1 dan blanko 3. Setiap sumuran ditambahkan 200 μL WST Working Solution. Setelah itu, dimasukkan 20 μL larutan buffer ke dalam sumuran blanko 2 dan blanko 3. Kemudian, untuk sumuran sampel dan blanko 1 ditambahkan 20 μL Enzyme Working Solution. Larutan dicampur hingga homogen, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Selanjutnya, plate dimasukkan ke dalam microplate reader untuk dibaca absorbansinya pada panjang gelombang baca 450 nm.

2.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengukuran dianalisis menggunakan software *Graphpad Prism 9* dengan metode *One Way Anova*, lalu dilanjutkan dengan uji *Tukey's Multiple Comparisons Test*.

