

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pepaya merupakan buah yang berasal dari Famili *Caricaceae*. Kawasan produksinya meliputi kawasan negara tropis dan subtropis termasuk Indonesia (Medina, et al. 2013). Persentase komposisi dalam satu buah pepaya yaitu biji (5.4 %), kulit (25.3%) dan daging buah (69.3%) (Medina, et al. 2013). Pepaya memiliki kandungan serat larut air yang cukup tinggi yaitu 1.7 gram per 100 gram buah mentah (*US Departement Agriculture*, 2018).

Pepaya banyak dimanfaatkan dalam pembuatan produk makanan seperti selai, jeli, dsb. (Pathak, et al. 2019). Namun, hasil samping produk tersebut yaitu kulit pepaya banyak tidak terpakai (Pathak, et al. 2019). Nilai gizi yang terkandung dalam kulit buah pepaya yaitu karbohidrat 89.9 gram, kadar abu 10.6 gram, protein 15.8 gram dan lemak 1.46 gram per 100 gram berat kering kulit pepaya (Oliveria, et al., 2021). Pada penelitian lain menyebutkan perbandingan kandungan nilai gizi dalam kulit pepaya matang adalah protein 3.5%, serat 26.2%, lemak 3.05%, kadar abu 15.03%, karbohidrat 52.2% (Akintunde A. et al., 2022).

Nata merupakan zat yang menyerupai gel, tidak larut dalam air dan terbentuk pada permukaan media fermentasi berupa selulosa oleh *Acetabacter Xylinum* (Tallei et al., 2022). Nata banyak mengandung serat tidak larut air (Tallei et al., 2022). Produk nata memiliki potensi yang cukup tinggi karena manfaatnya dan banyak diminati masyarakat, serta memiliki nilai ekonomis yang tinggi pula (Harmoko dan Lokaria, 2022). Oleh karena itu, pembuatan nata dari bahan dasar buah-buahan sebagai media fermentasi dapat bermanfaat bagi kesehatan, salah satunya bagi penderita diabetes mellitus.

Kasus diabetes mellitus masih banyak terjadi di dunia maupun di Indonesia. *International Diabetes Federation* melaporkan prevalensi diabetes global pada usia 20-79 tahun pada tahun 2021 sebanyak 536,6 juta orang (10,5%), meningkat menjadi 783,2 juta (12,2%) pada 2045 (*International Diabetes Federation*, 2021). Di Indonesia sendiri prevalensi penderita diabetes mellitus pada tahun 2021 mencapai 19,5 juta (10,8%) dan diperkirakan meningkat menjadi 28,6 juta (15,8%) pada tahun 2045 (*International Diabetes Federation*, 2021). Penelitian menyarankan asupan serat pangan yang adekuat dapat mencegah dan mengatasi penyakit metabolisme seperti diabetes mellitus (He Yang, et al., 2022). Berdasarkan rekomendasi WHO, jumlah serat yang dibutuhkan dalam sehari yaitu sebanyak 27-40 g/hari dapat memberikan pengaruh kesehatan dalam mencegah obesitas, diabetes, penyakit jantung, dan berbagai kanker (Nishida, et al. 2004). Pada penelitian lain juga menyatakan

rekomendasi asupan serat dalam diet diabetes yaitu 35–40-gram (Mogos, et al. 2017).

Serat tidak larut air diketahui dapat mencegah obesitas dan diabetes (Okouchi et al., 2019). Diketahui bahwa serat larut air dapat menghambat penyerapan glukosa dan lemak dari saluran pencernaan dan kemampuannya dalam menurunkan kadar gula darah dan lemak (Galisteo et al. 2008). Mekanisme serat dalam mencegah hiperglikemia yang memburuk juga ditunjukkan dengan terjadinya fermentasi serat di kolon oleh mikrobiota usus sehingga memproduksi asam lemak rantai pendek yang kemudian akan mempengaruhi metabolisme glukosa dan lipid (Grover et al., 2011). Serat pangan difermentasikan oleh mikrobiota usus untuk memproduksi *SCFA* (*Short Chain Fatty Acid*), kemudian menstimulasi sekresi hormon kenyang (GLP-1 dan PYY), yang kemudian hormon tersebut membantu meningkatkan sekresi insulin dan mengontrol kadar glukosa darah (He Yang, et al., 2022). Salah satu mikrobiota usus yang berperan dalam mengontrol kadar glukosa adalah *Lactobacillus Gasseri* (*L. Gasseri*). *L. Gasseri* merupakan salah satu jenis mikrobiota usus yang memiliki efek antidiabetik (Adeshirlarijaney dan Gewirtz, 2020).

Selain kandungan serat yang tinggi, pada buah pepaya juga mengandung antioksidan yang tinggi. Bagian aktif antioksidan pepaya (*Carica papaya* L.) adalah bagian buah pepaya, kulit buah pepaya dan daun pepaya. Bagian tanaman pepaya (*Carica papaya* L.) yang memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi dari seluruh bagian yaitu kulit pepaya ekstrak etanol memiliki nilai IC₅₀ sebesar 13,769 µg/ml (Santi, et al., 2021).

Orang dengan diabetes mellitus sangat rentan akan pembentukan radikal bebas di dalam tubuhnya (Widowati, 2008). Hiperglikemia akan memperburuk dan memperparah pembentukan ROS melalui berbagai macam mekanisme (Widowati, 2008). Antioksidan bersifat melindungi sel dari radikal bebas oksigen reaktif. Tubuh membutuhkan antioksidan yang mampu memperlambat atau mencegah proses oksidasi (Fachraniah et al., 2012).

Telah banyak penelitian yang membahas mengenai efek konsumsi buah pepaya pengaturan glukosa darah. Penelitian dengan pemberian buah pepaya selama 6 minggu makan terbukti menurunkan glukosa darah (Santoso, 2011). Pemberian 20 gram pepaya dapat terbukti menurunkan GDP dan resistensi insulin serta efektif sebagai kontrol glikemik (Yu K, et al., 2014). Namun Penelitian dengan menggunakan produk nata yang terbuat dari kulit buah pepaya belum ada dilakukan. Oleh karena itu, peneliti ingin menghasilkan produk inovasi berupa nata dari kulit buah pepaya agar meningkatkan nilai kegunaannya. Kemudian akan dievaluasi efek pemberian nata kulit pepaya terhadap kadar glukosa dan jumlah mikrobiota usus *Lactobacillus gasseri* pada hewan coba tikus jantan penderita diabetes mellitus.

1.2 Teori

1.2.1 Hiperglikemia dan Diabetes Mellitus

Hiperglikemia adalah kondisi masalah medis yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah yang jumlahnya diatas batas normal. Kondisi ini merupakan salah satu tanda khusus pada penyakit diabetes mellitus. Hiperglikemia pada diabetes mellitus dapat berdampak pada kerusakan jangka panjang yaitu disfungsi atau kegagalan organ tubuh seperti mata, saraf, ginjal, jantung, dan pembuluh darah. Faktor yang berkaitan dengan tingginya kadar glukosa darah yaitu penurunan sekresi insulin, penurunan penggunaan glukosa, dan peningkatan produksi glukosa (Rosares dan Boy, 2020).

Diabetes mellitus merupakan penyakit yang dapat diderita seumur hidup. Penyakit ini dapat disebabkan oleh gangguan metabolisme pada organ yaitu pancreas yang ditandai dengan peningkatan gula darah atau hiperglikemia karena penurunan produksi insulin dari pancreas (Lestari et al, 2021). Menurut Perkumpulan Endokrinologi Indonesia (2022) bahwa diabetes mellitus merupakan suatu kelompok penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia yang dapat terjadi akibat kelainan sekresi insulin, kerja insulin, maupun keduanya.

Diabetes memiliki dua jenis yaitu diabetes mellitus tipe 1 dan 2. Diabetes mellitus tipe 1 merupakan hasil dari reaksi autoimun terhadap protein sel pulau pankreas. Adapun diabetes mellitus tipe 2 diakibatkan oleh kombinasi faktor genetik yang menyebabkan gangguan sekresi insulin, resistensi insulin, dan faktor lingkungan. Faktor lingkungan tersebut dapat berupa kondisi obesitas, asupan makanan yang berlebih, kurang olahraga, kondisi stress, dan penuaan (Lestari et al, 2021). Menurut Perkumpulan Endokrinologi Indonesia (2022) bahwa klasifikasi DM dan penjabarannya dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 1. Klasifikasi Diabetes

Klasifikasi	Keterangan
Diabetes melitus tipe 1 (DM tipe 1)	a. Destruksi sel beta, umumnya menjurus ke defisiensi insulin absolut b. Autoimun c. Idiopatik
Diabetes melitus tipe 2 (DM tipe 2)	Disebabkan oleh resistensi insulin, namun dalam perjalanan penyakit dapat terjadi gangguan sekresi insulin yang progressif
Diabetes melitus tipe lain	a. Sindroma Diabetes Monogenik, seperti <i>maturity-onset diabetes of young</i> (MODY) b. Gangguan pada kelenjar eksokrin pankreas misalnya fibrosis kistik, pankreatitis, dan lain-lain c. Endokrinopati d. Diabetes karena obat atau zat kimia misalnya glukokortikoid, obat anti-

	retroviral (ARV) untuk pasien AIDS, pasca transplantasi organ e. Infeksi f. Sebab imunologi yang jarang
Diabetes melitus gestasional	Diabetes melitus yang didiagnosis pada saat trimester kedua atau ketiga kehamilan, dan tidak diketahui sebelum hamil

Faktor risiko pada kejadian diabetes mellitus tipe 2 yaitu usia, aktivitas fisik, terpapar polusi udara, indeks masa tubuh yang berlebih, tekanan darah, gaya hidup, stress, adanya riwayat keluarga, kolesterol HDL yang rendah, trigliserida yang tinggi, riwayat DM gestasional, dan riwayat ketidaknormalan glukosa dan kelainan lainnya. Gejala yang sering ditemukan pada penderita DM antara lain poliuri (sering buang air kecil), polifagi (cepat merasa lapar), dan berat badan menurun (Lestari et al, 2021).

Terdapat berbagai macam pemeriksaan diabetes mellitus yaitu pemeriksaan gula darah sewaktu (GDS), gula darah puasa (GDP), gula darah 2 jam post prandial (GD2PP), pemeriksaan HbA1c, dan tes pemeriksaan toleransi glukosa oral (TTGO). Adapun diagnosis dapat ditegakkan dengan hasil pemeriksaan kadar gula darah:

1. Gula darah puasa > 126 mg/dl
2. GD2PP > 200 mg/dl
3. Gula darah sewaktu > 200 mg/dl
4. HbA1c > 6.5%.

Kondisi hiperglikemia adalah salah satu masalah yang sering ditemukan pada pasien dan berisiko memberikan dampak buruk terhadap morbiditas dan mortalitas (Perkumpulan Endokrinologi Indonesia, 2022). Pengobatan dapat dilakukan bagi penderita diabetes mellitus yaitu dengan terapi insulin, mengonsumsi obat diabetes, dan memperbaiki pola hidup ke arah yang sehat dengan memakan makanan bergizi dan olahraga (Lestari et al, 2021).

1.2.2 Terapi Pengobatan Konvensional Pada Diabetes Mellitus Tipe 2

Pada saat ini, terdapat banyak obat-obatan secara oral dan injeksi yang berkembang untuk mengobati pasien dengan DM Tipe 2 (Blahova J. et al. 2021). Obat-obatan tersebut dapat digunakan hanya oral atau injeksi, dan bisa dikombinasikan keduanya (Blahova J. et al. 2021). Obat-obatan tersebut menghambat pada peningkatan kadar glukosa, dan menurunkan berat badan, serta risiko penyakit kardiovaskular. Obat antidiabetes dapat dibagi menjadi beberapa kategori seperti biguanid, sulfonilurea, meglitinida, dan thiazolidinedione (Kalsi, et al. 2014). Adapun cara kerja masing-masing dari golongan obat-obat tersebut adalah sebagai berikut:

- Peningkatan sensitivitas insulin (contohnya biguanid dan thiazolidinediones)
- *Insulin secretagogues* (contoh: sulphonylurea dan meglitinides)

- Penghambat alpha-glukosida dan *incretin-based therapy* (contoh: *glucagon-like peptide-1 receptor agonists* dan *dipeptyl-peptidase-4 inhibitors*)
- Kelompok lain sebagai penghambat kotransporter natrium-glukosa 2 (menurunkan hiperglikemia dengan meningkatkan ekskresi glukosa urin), penghambat lipase, agonis amylin (analog dari β -sel hormone amylin) dan insulin.

(Blahova J. et al. 2021).

Penggunaan obat-obatan sintetik tersebut jika digunakan dalam jangka waktu yang panjang dapat menyebabkan beberapa efek samping dan komplikasi pada organ yang berbeda-beda seperti dapat memicu gangguan jantung, penyakit liver, penyakit ginjal, dan kenaikan berat badan (Kalsi, et al. 2014). Semua obat-obatan sintetik tersebut memiliki efek samping seperti hipoglikemia, asidosis laktosa, kelainan gastrointestinal, penambahan berat badan, gagal ginjal, dan diare, dll. (Blahova J. et al. 2021). Selain itu, sama seperti penggunaan obat-obatan yang lainnya, jika dikonsumsi dalam jangka waktu yang panjang dapat memiliki interaksi buruk dengan obat non anti diabetik (Kalsi, et al. 2014).

1.2.3 Penggunaan Kulit Pepaya Sebagai Pengobatan Herbal

Pepaya merupakan buah yang secara ekonomi penting dan berasal dari Famili Caricaceae. Dalam beberapa bagian dunia terutama Australia dan India Barat biasa disebut papaw atau pawpaw (Medina, et al. 2013). Produksinya meliputi negara tropis dan sub-tropis. Persentase komposisi dalam satu buah pepaya yaitu biji (5.4 %), kulit (25.3%) dan daging buah (69.3%) (Medina, et al. 2013). Menurut Okofani dan Suwandi (2019) taksonomi tumbuhan pepaya adalah sebagai berikut

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Brassicales
Famili	: Caricaceae
Genus	: Carica
Spesies	: Carica papaya L.

Salah satu jenis pepaya yang sering ditemui adalah pepaya California yang memiliki ciri utama yaitu berukuran kecil berbentuk lebih lonjong. Pepaya california memiliki ukuran lebih pendek dari jenis pepaya lainnya (Khasanah et al., 2020). Buah pepaya California merupakan hasil pemuliaan yang dilakukan

oleh Pusat Kajian Buah Tropika (PKBT)-IPB atau disebut IPB 9. Pepaya ini memiliki keunggulan seperti buahnya tidak terlalu besar dengan ukuran 0,8-2 kg/buah, berkulit tebal, halus, dan mengkilat, berbentuk lonjong, buah matangnya berwarna kuning, rasanya manis, dan daging buah kenyal (Usmayani, et al. 2015).

Bagian pepaya (*Carica papaya* L.) yang memiliki aktivitas antioksidan yaitu pada bagian daging buah pepaya, kulit buah pepaya, dan daun pepaya. Bagian tumbuhan pepaya yang memiliki aktivitas antioksidan yang paling tinggi dari seluruh bagian yaitu pada kulit buah pepaya dari percobaan dengan ekstrak etanol didapatkan nilai IC50 yaitu 13,769 µg/mL (Santi et al., 2021). Kulit buah pepaya mengandung vitamin (A, B1, dan C) yang sangat penting untuk menangkal radikal bebas, mineral (kalsium, forfor, kalium, dan zat besi), protein, lemak dan karbohidrat (gula antara lain sukrosa, glukosa, dan fruktosa), flavonoid, alkaloid, dan fenol (Santi et al., 2021). Pemberian ekstrak kulit buah pepaya (*Carica papaya*) dapat menurunkan kadar glukosa darah mencit hiperglikemik (Maulira, et al. 2016). Penurunan kadar glukosa darah mencit setelah pemberian ekstrak kulit buah pepaya diduga karena kandungan antioksidan yang terkandung didalam kulit buah pepaya. Selain itu kulit buah papaya mengandung asam ferulat, asam p-kumarat, dan asam kafeat. Karotenoid dengan kandungan vitamin C, likopen, β-kriptosantin, β-karotene, dan vitamin C, seluruh kandungan ini memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Maulira, et al. 2016).



Gambar 1. Buah Pepaya California

Pepaya memiliki kandungan serat yang tinggi yang mampu mencegah terjadinya gangguan pencernaan. Dalam 100 gram pepaya diketahui memiliki kandungan serat 1.8 gram (Vyas et al., 2016). Penelitian lain menunjukkan bahwa kandungan serat kasar kulit buah pepaya yaitu berkisar 11,81%-26,31% (Pavithra CS et al., 2017).

Mekanisme serat dalam menurunkan glukosa darah yaitu melalui beberapa mekanisme. Salah satunya yaitu dengan struktur jaringan pada serat dapat membentuk penghambat fisik dan penundaan secara difusi pada glukosa. Partikel berserat berperan sebagai penghambat fiisk terhadap molekul glukosa dan mengikat glukosa dalam jaringan pembentuk serat tersebut. Ketika struktur dari serat menjadi longgar dan berpori, maka GAC (*Glucose Absorption Capacity*) akan ditingkatkan (He Yang et al., 2022).

Mekanisme selanjutnya adalah dengan viskositas serat yang dapat menunda pengosongan lambung dan meningkatkan sensitivitas insulin terhadap efek hipoglikemik (He Yang, et al., 2022). Serat makanan diketahui dapat menurunkan kadar gula darah dengan konsumsi serat selama 6 minggu yaitu dengan memperlambat pengosongan lambung sehingga dapat menurunkan respon gula darah postprandial (Ismawati Z. et al., 2019).

Mekanisme selanjutnya adalah serat pangan difermentasikan oleh mikrobiota usus untuk memproduksi SCFA (*Short Chain Fatty Acid*), kemudian menstimulasi sekresi hormon kenyang (GLP-1 dan PYY), yang kemudian hormon tersebut membantu meningkatkan sekresi insulin dan mengontrol kadar glukosa darah (He Yang, et al., 2022). Telah dilaporkan *acetic acid* dan *butyric acid* dapat meningkatkan homeostasis glukosa dengan menginduksi produksi GLP-1 dan PYY di usus, sehingga dapat menstimulasi sekresi insulin (He Yang, et al., 2022). Serat larut air dengan kandungan 20 gram mampu menjaga kadar GD2JPP, kadar GDP, indeks resistensi insulin, dan secara efektif menjaga kontrol glikemik tanpa berefek pada fungsi sekresi sel Langerhans (Ismawati Z. et al., 2019). Serat tidak larut air yang terkandung pada beberapa tanaman dalam mencegah terjadinya obesitas dengan meningkatkan hormone insulin dalam mengatur glukosa darah dalam tubuh (Ismawati Z. et al., 2019). Serat tidak larut air dapat melewati system pencernaan dan bertahan lebih lama sehingga menegontrol rasa kenyang dan dapat meningkatkan sensitivitas insulin (Ismawati Z. et al., 2019).

1.2.4. Nata

Nata merupakan produk makanan berasal dari Filipina. Produk ini dihasilkan melalui proses fermentasi dengan bentuk agar namun berstruktur kenyal. Nata ini produk yang relative baru diperkenalkan di Indonesia namun sudah cukup dikenal luas (Putranto dan Taofik, 2017). Nata memiliki kandungan selulosa yang tinggi, tidak mengandung kolesterol, serta rendah lemak. Hal ini yang membuat nata termasuk dalam *dietary fiber*. Produk nata dibuktikan dapat mengendalikan berat badan dan melindungi tubuh dari penyakit diverticulosis, kanker usus besar, dan rectum (Putri et al., 2021).

Nata dihasilkan dari bakteri penghasil asam asetat yaitu bakteri *Acetobacter xylinum*. Bakteri dapat membentuk polikel tebal di atas permukaan medium air. Ekstrak toge ditambahkan pada media air kelapa bertujuan untuk meningkatkan kandungan vitamin, nitrogen, dan fosfat agar nata yang dihasilkan lebih optimal (Putratnto dan Taofik, 2017). Menurut penelitian Putri et al. (2021) *Acetobacter xylinum* merupakan bakteri yang digunakan dalam produksi nata dimana berperan dalam memproduksi selulosa. Adapaun *Acetobacter sp.* yang berperan sama dalam mengubah gula menjadi selulosa saat proses fermentasi terjadi. Starter digunakan dapat berbeda-beda untuk memaksimalkan hasil produksi nata sehingga menghasilkan ciri-ciri produk nata sesuai yang diinginkan. Bahan baku yang

dapat dimanfaatkan juga dapat berbeda-beda seperti sari buah-buahan dan sayuran selama bahan-bahan itu dapat sesuai dengan media pertumbuhan *Acetobacter xylinum*.

Tabel 2. Hasil Uji Sensoris, Fisikawi, dan Kimiawi Nata de coco Menggunakan Bakteri *Acetobacter xylinum* dan *Acetobacter sp.*

No	Mikroorganisme	Hasil Fermentasi				
		Warna	Kenampakan	pH	Kadar Gula	Kepadatan
1	<i>Acetobacter xylinum</i>	Putih	Licin dan halus	5.79 - 6.41	Berdasarkan SNI, <i>Acetobacter xylinum</i> menghasilkan konsentrasi gula minimal 15%	20 g/100 g nata
2	<i>Acetobacter sp.</i>	Lebih banyak warna putih	Halus dengan kepadatan yang tinggi	4.0-6.0	Pada artikel <i>Acetobacter sp.</i> Tidak melakukan pengujian brix setelah inkubasi, namun penambahan kadar gula awal 5° Brix mampu menghasilkan nata yang terbaik	71.29g/100 g nata

Aktivitas produksi nata dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti sumber karbon, sumber nitrogen, suhu fermentasi, tingkat keasaman medium, lama fermentasi, dan konsentrasi starter *Acetobacter xylinum*. Adapun sumber karbon dapat diperoleh dari bahan baku yang digunakan untuk membuat nata. Pemilihan bahan baku dipilih berdasarkan kemudahan untuk mendapatkan bahan baku, ketersediaan bahan baku, sifat fermentasi, dan harga. Variasi bahan baku dalam pembuatan nata dilakukan agar dapat memanfaatkan bahan yang belum optimal namun dapat memiliki nilai tambah, mengatasi bahan baku musiman, dan menciptakan variasi produk. Selain itu juga dapat menentukan kualitas nata yang paling baik dari segi kimiawi, fisikawi, sensori, dan kandungan zat gizi (Putri et al., 2021). Penggunaan gula pada pembuatan nata juga mempengaruhi hasil produk

nata. Pada penelitian Hardianti et al. (2019) menyebutkan bahwa penggunaan gula aren memiliki ketebalan dan berat yang lebih tinggi dibandingkan gula pasir. Hal ini dikarenakan tingginya kandungan sukrosa pada gula aren dan wadah media substrat cair yang kurang luas. Hal tersebut menyebabkan terhambatnya metabolisme bakteri *Acetobacter xylinum* sehingga lapisan nata sulit terbentuk. Selain itu juga dapat disebabkan oleh perbedaan dan perbandingan bahan-bahan yang digunakan sehingga memerlukan waktu yang berbeda pula untuk membentuk lapisan nata.

1.2.5 Induksi Agen Diabetagonik untuk Penelitian Diabetes

- Model Aloksan

Aloksan merupakan zat kimia yang sering digunakan untuk menginduksi hewan coba menjadi DM. Aloksan adalah turunan asam urat dan dapat merusak sel pankreas secara selektif melalui mekanisme stress oksidatif. Aloksan menyebabkan penurunan glikogen hepatic dalam 24-72 jam. Efek sitotoksitasnya terutama disebabkan oleh konversi anion radikal yang menyebabkan kerusakan pankreas yang akhirnya menurunkan kadar insulin (Husna, et al. 2019). Aloksan menghambat sekresi insulin yang diinduksi oleh glukokinase. Glukokinase merupakan sensor glukosa dari sel beta dan hal ini menyebabkan diabetes yang bergantung pada insulin melalui kemampuannya untuk menginduksi pembentukan ROS, sehingga menyebabkan nekrosis sel beta (Lenzen, 2008). Saat ini penggunaan aloksan lebih jarang karena tingkat keberhasilan kurang memuaskan dan adanya efek nefrotoksik dan hepatoksik pada hewan coba (Husna, et al. 2019).

- Model Diet Tinggi Lemak

Model ini didasarkan pada teori bahwa salah satu faktor terjadinya diabetes mellitus tipe 2 adalah obesitas. Tikus dapat diinduksi menjadi obesitas dengan meningkatkan asupan lemak yaitu 40-60% dari total kalori. Peningkatan proporsi lemak (>85% total kalori), karbohidrat, garam, dan kolesterol dapat menginduksi model hewan untuk penelitian obesitas, resistensi insulin, hipertensi, aterosklerosis, dan dislipidemia (Husna, et al. 2019). Model ini menghasilkan hewan coba dengan karakteristik obesitas, toleransi glukosa terganggu dan resistensi insulin (Husna, et al. 2019). Setelah tikus diberikan diet tinggi lemak selama 8 minggu, tikus menjadi obesitas, dislipidemia, hiperglikemia, dan resistensi insulin sama seperti perkembangan DM tipe 2 (Guo, et al. 2018).

Beberapa penelitian menemukan tanda resistensi insulin namun tidak terjadi kerusakan pada sel pankreas. Namun durasi diet yang lebih lama menyebabkan hiperinsulinemia dan hiperlipidemia (Husna, et al. 2019). Derajat hiperglikemia bergantung pada jumlah lemak, tipe lemak, dan durasi

diet. Kekurangan pada metode ini adalah perlunya waktu yang relatif panjang (Husna, et al. 2019).

- Model Diet Fruktosa

Metabolisme fruktosa menyebabkan fruktosa lebih hiperlipidemic dibanding glukosa (Husna, et al. 2019). Tikus diinduksi diet dengan kandungan fruktosa tinggi 35-72% atau 10-15% larutan fruktosa di dalam air minum selama 2-12 minggu. Selain itu, pemberian larutan fruktosa 5-10% dapat menimbulkan gejala polidipsi dan kelebihan berat badan dalam 14 minggu pada tikus (Husna, et al. 2019). Adapun modifikasi berupa pemberian diet tinggi fruktosa dan tinggi lemak (50-60% diet) menyebabkan gangguan metabolik dan komplikasi seperti hipertensi dan vaskular. Ditemukan juga setelah pemberian 3 bulan berupa ketidaknormalan metabolisme glukosa dan lemak, kemudian terlihat intoleransi glukosa yang signifikan setelah 18 bulan pemberian (Zhao, et al. 2022). Kekurangan pada model ini yaitu waktu induksi yang lama (Husna, et al. 2019).

- Model Pankreatektomi

Model ini dilakukan dengan mengurangi massa sel pankreas dengan pembuangan 85-90%. Karakteristik gejala hiperglikemia ringan-sedang didapatkan setelah 4 hari operasi dan dapat bertahan hingga 6 minggu. Adapun modifikasi dilakukan dengan penambahan nikotinamid 350 mg/kg BB dan streptozotisin 200 mg/kgBB pada mencit. Setelah dilakukan apendektomi 50% makan didapatkan gejala DM tipe 1 yang dominan (Husna, et al. 2019). Pada penelitian lain pankreatektomi terlihat efeknya secara signifikan setelah 3 tahun dengan gangguan fungsi sekresi insulin (Lee, et al. 2023). Adapun tikus yang telah dilakukan pankreatektomi sebanyak 90% mengalami hiperglikemia, hipoinsulinemia, dan peningkatan HbA1c (Louise, et al. 2020). Kelebihan dari metode ini adalah tidak menyebabkan efek samping pada organ lain dan model mirip dengan defisiensi insulin. Namun kekurangannya adalah regenerasi dari sisa pankreas dan teknik operasi serta gangguan pencernaan pada tikus (Husna, et al. 2019).

- Model Intra Uterine Growth Retardation (IUGR)

IUGR merupakan berat badan bayi rendah dengan terbatasnya sumber nutrisi fetus selama kehamilan. IUGR berkaitan dengan perkembangan penyakit seperti obesitas, DM tipe 2, dan hipertensi saat usia tua. Hal ini disebabkan karena defisiensi nutrisi saat fetus yang menyebabkan modifikasi ekspresi gen dan fungsi sel pankreas, hati dan otot (Husna, et al. 2019). Ketika kondisi intrauterine tidak normal maka akan menyebabkan perubahan secara permanen terhadap homeostatis glukosa setelah melahirkan dan akan menjadikan DM tipe 2 saat usia dewasa nanti (Rebecca, et al. 2001).

Pada tikus dengan model ini akan dilakukan ligase uteri uterine bilateral pada usia kehamilan 19 hari sehingga asupan pada fetus tidak terpenuhi secara optimal. Ketika dilahirkan, bayi tikus memiliki berat badan sangat kurang dan disertai penurunan insulin. Pada usia 26 minggu tikus terlihat obesitas, peningkatan massa lemak sentral, dan peningkatan gula darah.

Keuntungan pada model ini adalah adanya karakteristik resistensi insulin, hiperglikemia, obesitas, dan penurunan massa sel β pankreas. Kekurangannya adalah teknik ligasi arteri uterina harus dilakukan tenaga profesional, waktu induksi lama yaitu 3 bulan, serta belum terbukti efek obat anti diabetes konvensional pada model ini (Husna, et al. 2019).

- Model induksi streptozotocin (STZ)

Streptozotocin atau 2-deoksi-2-(3-metil-nitrosourea)-1-D-glukopiranosida merupakan senyawa alami yang terdapat pada bakteri *Streptomyces achromogenes* dan memiliki efek antibakteri pada spektrum yang luas. Berat molekulnya yaitu 265 g/mol dan memiliki struktur berupa gugus nitrosourea dengan gugus metil terikat pada ujung yang satu dan molekul glukosa terikat pada ujung lainnya (Husna et al., 2019). STZ memiliki waktu paruh yang cukup lama dan tidak mudah teroksidasi. Zat ini bekerja dengan cara membentuk radikal bebas yang sangat reaktif dan dapat menyebabkan kerusakan pada membran sel, protein, dan DNA. Hal ini menyebabkan gangguan produksi insulin oleh sel beta langerhans pankreas (Saputra et al., 2018). Saputra et al (2018) menyatakan bahwa STZ memasuki sel beta Langerhans pankreas melalui glucose transporter 2 (GLUT 2) dan menyebabkan alkilasi. Mula-mula hal tersebut terjadi dengan adanya pembatasan pembentukan adenosin trifosfat pada mitokondria akibat pembentukan radikal bebas, peningkatan enzim *xanthine oxidase* dan penghambatan siklus Krebs.

Adapun dua tipe diabetes mellitus yang diakibatkan oleh induksi STZ ini yaitu diabetes mellitus tipe 1 dan diabetes mellitus tipe 2 (Saputra et al., 2018). Peningkatan kadar glukosa darah pada tikus yang diinduksi STZ disebabkan oleh terganggunya sel β pada kelenjar pankreas. Mekanisme aksi yang ditimbulkan yaitu dengan cara STZ berikatan dengan GLUT-2 yang memfasilitasi masuknya STZ ke dalam sitoplasma sel β pankreas, kemudian meningkatkan depolarisasi pada mitokondria sebagai akibat masuknya ion Ca^{2+} yang diikuti oleh penggunaan energi yang berlebih sehingga terjadi kekurangan energi di dalam sel. Mekanisme ini menyebabkan terjadinya produksi insulin terganggu sehingga terjadi defisiensi insulin yang menyebabkan semua glukosa yang dikonsumsi tidak dapat diproses secara sempurna dan mengakibatkan kadar glukosa dalam tubuh meningkat (Saputra et al., 2018).

STZ dapat menginduksi diabetes mellitus pada hewan tikus, mencit, monyet, hamster, kelinci dan guinea pig. Zat ini bersifat sitotoksik terhadap sel β pancreas. Efeknya dapat terlihat dalam 72 jam setelah pemberian STZ dan tergantung pada dosis pemberiannya. Efek toksik diawali dengan ambilan STZ ke dalam melalui GLUT-2 dengan afinitas yang rendah pada membran plasma sel β , sel hepatosit, dan sel tubulus ginjal (Husna et al., 2019). Efek toksiknya bersifat lebih selektif terhadap sel β pancreas karena

struktur kimia STZ memiliki gugus glukosa sehingga mempermudah STZ masuk ke sel β . Hal ini dikarenakan sel β pancreas lebih aktif mengambil glukosa dibanding sel lainnya. Sel lain yang juga rentan terhadap induksi dengan STZ yaitu hepatosit dan sel tubulus ginjal. Hal ini yang menyebabkan STZ juga memiliki efek nefrotoksik dan hepatotoksik. Selain itu STZ juga menyebabkan kerusakan jantung dan jaringan lemak dan meningkatkan stress oksidatif, inflamasi dan disfungsi endotel (Husna et al., 2019). Pemberian STZ dapat menyebabkan peningkatan malondialdehid secara signifikan menurunkan aktivitas enzim antioksidan seperti katalase, glutathion peroksidase dan superoksida dismutase (Husna et al., 2019).

Kelebihan dari model ini yaitu STZ lebih efektif dan *reproducible*. Model hewan STZ memiliki kemiripan yang lebih banyak dengan beberapa komplikasi penyandang Diabetes Mellitus (DM). Hal ini menunjukkan kesamaan pada beberapa abnormalitas struktural, fungsional dan biokimia penyakit DM sehingga lebih cocok sebagai model untuk memeriksa mekanisme DM (Husna et al, 2019). Menurut Husna et al (2019) terdapat beberapa tingkatan dosis streptozosin yaitu sebagai berikut:

1. Injeksi STZ dosis tinggi (>60 mg/kgBB) menyebabkan kerusakan sel pankreas secara massif sehingga lebih mengarah kepada hewan DM tipe 1
2. Injeksi STZ dosis menengah (antara 40-55 mg/kgBB) menyebabkan gangguan sekresi insulin parsial seperti DM tipe 2
3. Injeksi STZ dosis tunggal (<35 mg/kgBB) pada tikus diet normal tidak menunjukkan gambaran hiperglikemia.

Model hewan dengan metode injeksi STZ ini adalah peningkatan kadar glukosa darah puasa atau sewaktu dan penurunan kadar insulin (Husna et al., 2019).

1.2.6 Model Hewan Coba Pada Penelitian Diabetes

Hewan coba tikus paling banyak digunakan dalam penelitian biomedik. Model tikus (*Rattus norvegicus domesticus*) dikatakan mudah berkembang biak, mudah dalam penangannya, perawatannya lebih sedikit, dan mudah diperlakukan (Mukherjee et al., 2022). Galur tikus yang sering digunakan dalam penelitian diabetes adalah tikus Wistar baik itu diabetes tipe 1 maupun tipe 2. Pada diabetes mellitus tipe 1, tikus Wistar yang diinduksi agen diabetik akan memiliki fenotip diabetes cukup parah dan memerlukan terapi insulin untuk kelangsungan hidupnya. Selain itu, tikus ini juga digunakan dalam studi intervensi dan studi neuropati diabetik (King, 2012). Kemudian pada diabetes mellitus tipe 2, tikus Wistar pada penelitian akan mengarah pada model diabetes mellitus tipe 2 dengan intoleransi glukosa dan kerusakan glukosa yang diinduksi sekresi insulin. Metabolisme glukosa yang rusak didapatkan oleh karena adanya massa sel beta yang menyimpang dan/atau fungsinya. Galur tikus Wistar telah digunakan dalam penelitian

mulai dari penelitian disfungsi sel beta pada diabetes mellitus tipe 2 hingga terhadap komplikasi diabetes (King, 2012).

Pemilihan jenis kelamin hewan coba juga menjadi pertimbangan. Di mana pada penelitian sebelumnya terbukti bahwa gula darah puasa pada tikus jantan yang diinduksi STZ menunjukkan hasil yang lebih stabil daripada tikus betina. Hal ini berkaitan dengan sistem psikologis dalam keseimbangan metabolisme yang menunjukkan perbedaan pada kedua jenis kelamin dan berhubungan dengan hormon seks. Para peneliti lebih sering menggunakan tikus jantan dikarenakan menunjukkan penyakit metabolisme yang lebih baik daripada betina. Kestabilan dari gula darah pada tikus jantan yang diinduksi STZ lebih baik daripada tikus betina. Selain itu, tikus jantan lebih sensitif terhadap STZ yang mana berhubungan dengan hormone seks. STZ dapat menginduksi terjadinya diabetes dengan menyebabkan kerusakan pada sel β pancreas, sedangkan hormon steroid yang dimiliki tikus betina bisa mencegah hal tersebut dapat terjadi (Zhang, et al., 2020).



Gambar 2. Tikus Jantan Galur Wistar

1.3 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh serat dan antioksidan dalam nata kulit pepaya terhadap, HbA1C, kadar glukosa darah puasa (GDP) dan mikrobiota usus pada tikus jantan diabetes yang diinduksi streptozotocin?

1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan Umum

Untuk mengevaluasi efek pemberian nata kulit pepaya terhadap kadar, HbA1c, GDP dan jumlah mikrobiota usus *Lactobacillus gasseri* pada tikus jantan diabetes yang diinduksi streptozotocin

1.4.2 Tujuan Khusus

1. Mengevaluasi kandungan serat pangan dan antioksidan pada nata kulit pepaya

2. Mengevaluasi efek pemberian nata kulit pepaya terhadap kadar HbA1C tikus jantan diabetes yang diinduksi streptozotocin
3. Mengevaluasi efek pemberian nata kulit pepaya terhadap kadar gula darah puasa (GDP) tikus jantan diabetes yang diinduksi streptozotocin
4. Mengevaluasi efek pemberian nata kulit pepaya terhadap jumlah mikrobiota usus *Lactobacillus gasseri* melalui feses tikus jantan diabetes yang diinduksi streptozotocin

1.5 Manfaat Penelitian

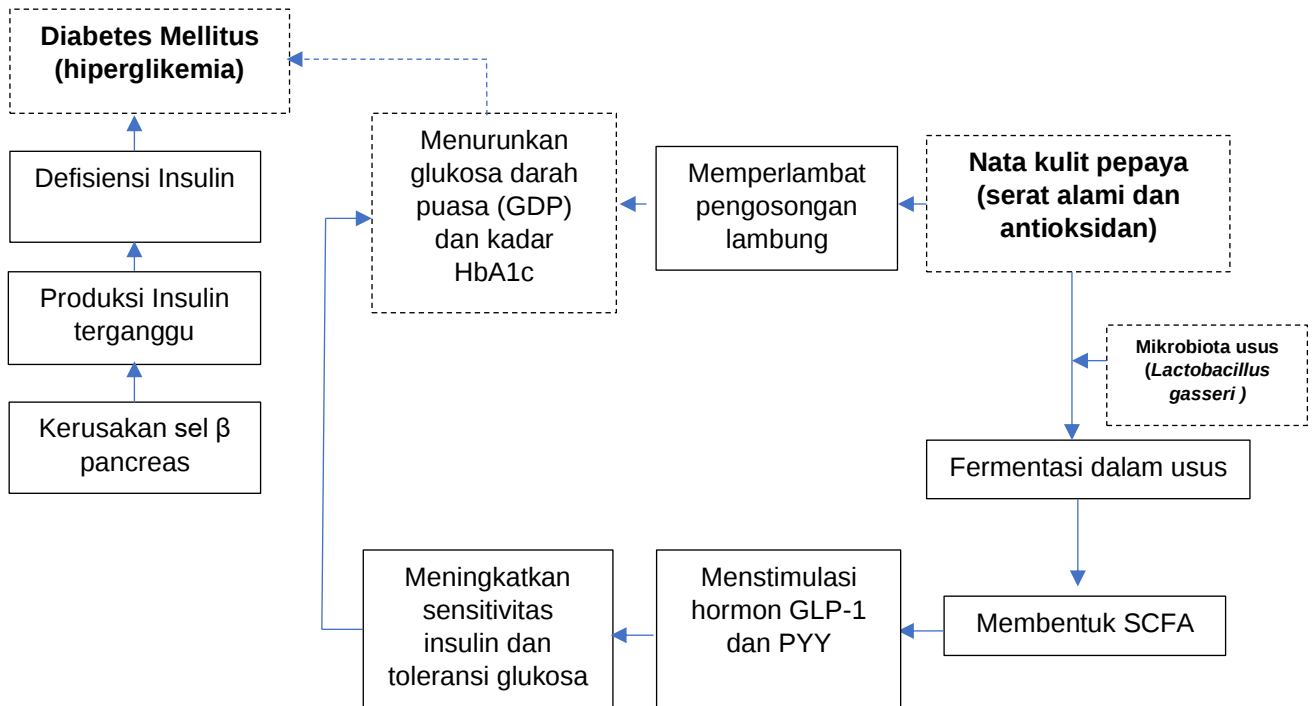
1.5.1 Manfaat teoretis

Memberi ilmu mengenai efektivitas serat pangan pada nata dari kulit buah pepaya sebagai pangan sumber serat bagi penderita diabetes mellitus.

1.5.2 Manfaat Praktis

1. Memberi alternatif pangan fungsional kepada masyarakat dalam mencegah terjadinya hiperglikemia pada penderita Diabetes Mellitus.
2. Ikut serta dalam pemanfaatan limbah organik berupa kulit pepaya sebagai pangan fungsional

1.6 Kerangka Teori

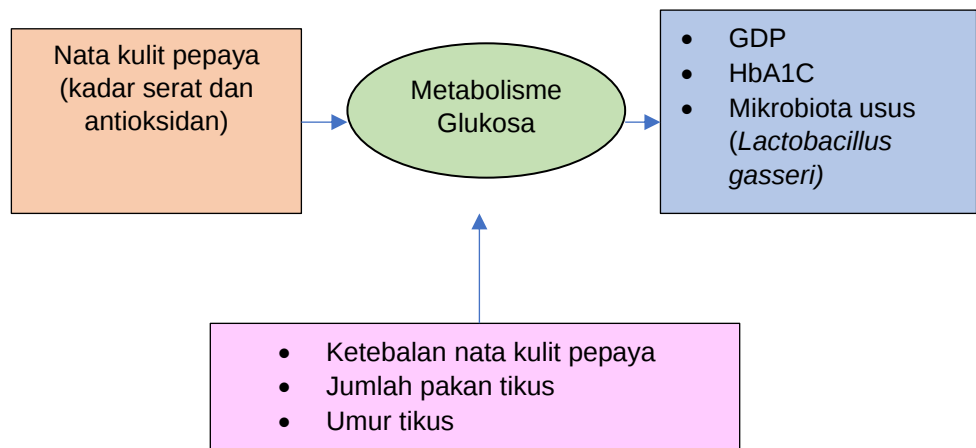


Keterangan:

- = Diteliti
- = Tidak Diteliti
- - - - - ➔ = Menghambat
- ➔ = Memicu

Gambar 3. Kerangka Teori

1.7 Kerangka Konseptual



Keterangan:

- | | |
|---|------------------------|
|  | : Variabel independent |
|  | : Variabel dependent |
|  | : Variabel kendali |
|  | : Variabel antara |

Gambar 4. Kerangka Konsep

1.8 Hipotesis

1. Nata kulit pepaya mengandung serat dan antioksidan lebih baik dibandingkan buah pepaya
2. HbA1c tikus yang diberikan nata kulit pepaya hampir sama dengan yang diberikan selulosa namun lebih rendah
3. Nata kulit pepaya berefek menurunkan kadar GDP tikus jantan diabetes yang diinduksi streptozotocin
4. Jumlah mikrobiota usus *Lactobacillus gasseri* pada tikus yang diberikan nata kulit pepaya lebih banyak daripada yang diberikan aquades dan selulosa

1.9 Definisi Operasional

Adapun definisi operasional dari penelitian ini yang perlu dijabarkan untuk menghindari perbedaan persepsi dalam menginterpretasikan masing-masing variabel penelitian yang disajikan dalam tabel.

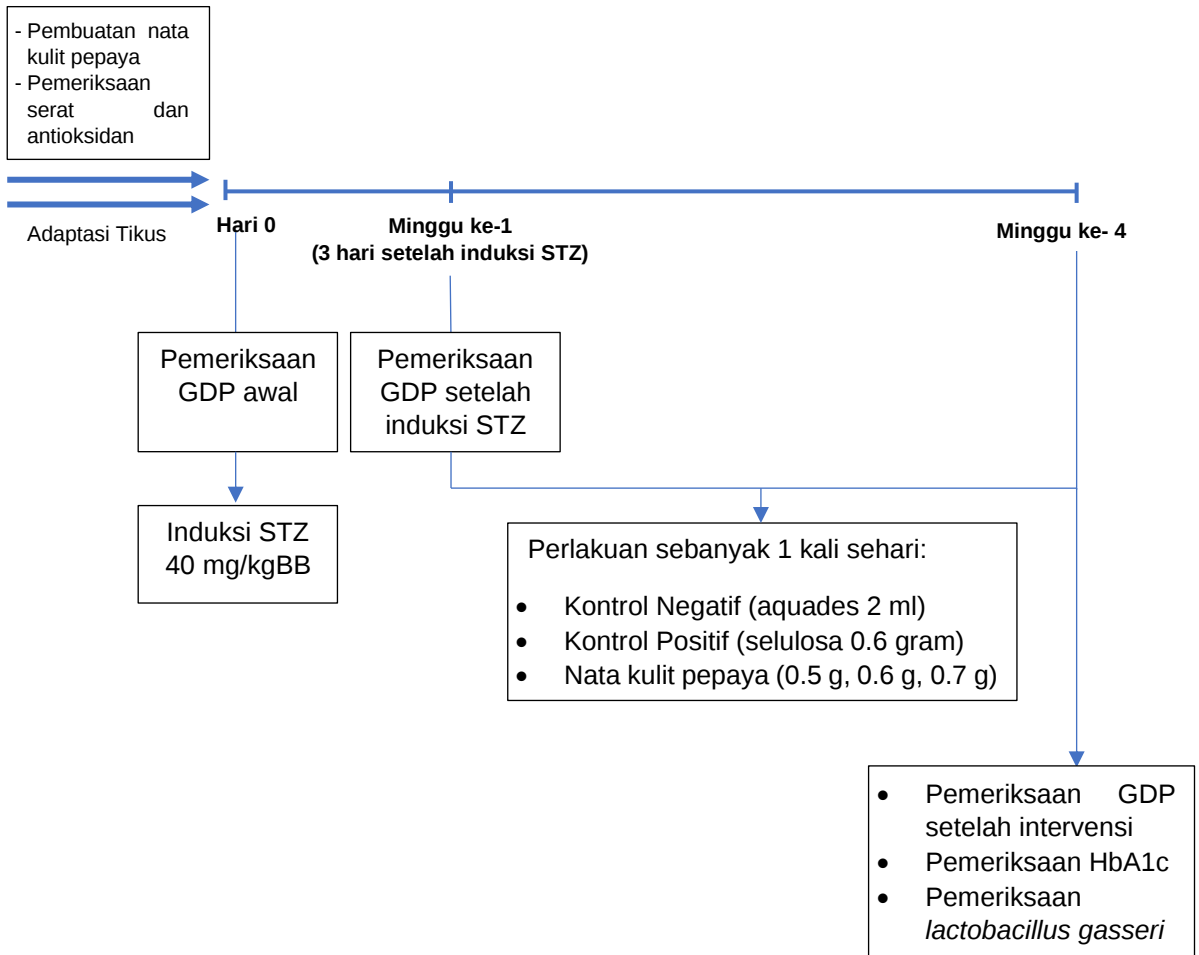
Tabel 3. Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Parameter	Definisi Operasional	Skala Ukur
Variabel Bebas	Nata kulit pepaya	Nata kulit pepaya dibuat dari bahan baku kulit buah pepaya jenis California dengan penambahan starter <i>Acetobacter xylinum</i> yang difermentasi selama 8 hari. Kemudian dihaluskan dan dibuat dosis untuk perlakuan sebesar 0.5 g/hari, 0.6 g/hari, 0.7 g/hari	Skala nominal
	Steptozotocin	Agen diabetagonik yang diinduksi pada hari ke delapan. Tikus diinduksi STZ sebanyak 40 mg/kg BB melalui intraperitoneal	Skala nominal
	Kontrol positif	Selulosa yang diberikan pada tikus dengan dosis 0.6 gram/hari	Skala nominal
	Kontrol negatif	Aquades yang diberikan pada tikus sebanyak 2 ml	
Variabel Terikat	GDP	Glukosa darah puasa yang diambil sebelum induksi STZ, 3 hari setelah induksi STZ,	Skala rasio

		dan setelah perlakuan terakhir (minggu ke 4). Tikus dipuasakan 16 jam sebelum pengambilan sampel darah. Pengukuran glukosa darah puasa (GDP) tikus dilakukan dari pembuluh darah ekor (vena lateralis) menggunakan glukometer glucoDR Biosensor. Tikus dinyatakan diabetes apabila glukosa darah puasa ≥ 155 mg/dL	
	HbA1C	Kadar HbA1c yang diukur pada minggu ke-4. Sampel darah diambil melalui retro-orbital pleksus menggunakan tabung pipa kapiler kemudian disentrifugasi. Pengukuran HbA1C diukur menggunakan metode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent AAssay)	Skala rasio
	Populasi <i>Lactobacillus gasseri</i>	Jumlah <i>Lactobacillus gasseri</i> yang diukur pada minggu ke-4 setelah intervensi dengan menggunakan sampel feses tikus. Sampel dianalisis menggunakan Real-Time PCR untuk mengidentifikasi bakteri <i>Lactobacillus gasseri</i> di dalam usus tikus.	Skala rasio

1.10 Alur Penelitian

Adapun alur penelitian sebagai berikut.



Gambar 5. Alur Penelitian

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

2.1.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli 2024 hingga bulan Oktober 2024.

2.1.2 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di:

1. Laboratorium BM Patch LPPM Universitas Hasanuddin Makassar untuk persiapan pembuatan nata kulit pepaya.
2. Balai Besar Laboratorium Kesehatan Masyarakat (BB Labkesmas) Makassar untuk pemeriksaan kadar serat kasar dan kapasitas total antioksidan nata kulit pepaya.
3. Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin untuk pemeliharaan dan pemberian perlakuan pada hewan coba, serta pemeriksaan GDP
4. Laboratorium HUMRC Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin untuk pemeriksaan kadar HbA1c dan mikrobiota usus *L. gasseri*.

2.2 Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah true eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Dari rancangan tersebut terdapat 5 kali perlakuan. Setiap perlakuan dilakukan 5 kali ulangan yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh Nata kulit pepaya terhadap kadar glukosa darah dan mikrobiota usus pada tikus jantan Diabetes Mellitus Tipe 2.

Adapun rancangan penelitian sebagai berikut

- | | |
|------|---|
| KP | : Kelompok kontrol positif yaitu pemberian selulosa 0.6 gram |
| KN | : Kelompok kontrol negatif yaitu pemberian aquades 2 ml |
| NKP1 | : Kelompok perlakuan yaitu pemberian nata kulit pepaya 0.5 gram |
| NKP2 | : Kelompok perlakuan yaitu pemberian nata kulit pepaya 0.6 gram |
| NKP3 | : Kelompok perlakuan yaitu pemberian nata kulit pepaya 0.7 gram |

2.3 Populasi dan Sampel Penelitian

2.3.2 Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi yang ditetapkan sebagai berikut:

2.3.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus sehat (mata jernih, bulu mengkilat, gerakan aktif lincah, feses baik/tidak lembek, berat badan tidak turun dari 10% selama masa aklimatisasi)
- b. Berat badan 150-200 gram
- c. Usia 6-8 minggu
- d. Jenis kelamin jantan
- e. Selama perlakuan tikus dalam keadaan hidup

2.3.2.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus sakit selama penelitian berlangsung
- b. Tikus yang mati selama penelitian berlangsung

2.3.3 Sampel Penelitian

Penentuan sampel dilakukan dengan membagi ke dalam lima kelompok perlakuan. Penentuan besar sampel dengan menggunakan rumus frederer:

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

Dimana:

t = banyaknya kelompok perlakuan

n = jumlah sampel per kelompok perlakuan

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

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

$$(n-1) \geq 3.75$$

$$n \geq 4.75$$

n dibulatkan menjadi 5

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka dengan adanya 5 kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan kurang lebih 5 kali dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan 25 ekor tikus hewan coba. Masing-masing kelompok perlakuan diberikan 1 ekor tikus sebagai cadangan apabila tikus mati di tengah perjalanan. Sehingga total tikus yang dibutuhkan pada penelitian ini yaitu 30 ekor.

2.4 Alat dan Bahan

2.4.1 Alat dan Bahan Pembuatan Nata Kulit Pepaya

Alat yang digunakan untuk membuat nata kulit pepaya adalah autoklaf, blender, kompor, panci, neraca analitik, pisau, baskom, gelas ukur, botol media, saringan, karet gelang, spuit, kertas pH, kertas HVS, dan tissue.

Bahan yang digunakan dalam pembuatan nata kulit pepaya adalah kulit buah pepaya, air, starter nata, gula, asam asetat, dan ZA food grade.

2.4.2 Alat dan Bahan Pengujian Nata Kulit Pepaya

2.4.2.1 Pengujian HbA1C

- Alat: tabung penampungan darah yang berisi EDTA, incubator $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, microplate reader dengan filter panjang gelombang 450 ± 10 nm, pipa kapiler, swab alcohol 70%
- Bahan: sampel darah, antikoagulan EDTA, Kit ELISA Hemoglobin A1C Rat, absorbent paper, pipet presisi dan tip pipet, clean tube, aquades.

2.4.2.2 Pengujian GDP

- Alat: spuit, tabung reaksi, kapas kering, swab alcohol 70%, tissue, dan glukometer
- Bahan: sampel darah, strip glucometer

2.4.2.3 Pengujian Mikrobiota Usus

- Alat: BSC kelas II A 2, laminar air flow atau PCR hood, RT PCR, micropipet, autoclave, refrigerator untuk reagen, coolbox, refrigerated centrifuge, spindown, vortex.
- Bahan: feses tikus, kit reagen untuk pemeriksaan.

2.5 Prosedur Penelitian

2.5.1 Tahap Pre Intervensi

2.5.1.1 Sterilisasi Alat

Alat yang akan digunakan adalah botol media dan kertas HVS sebagai penutup botol media saat digunakan. Alat akan disterilkan terlebih dahulu menggunakan alat medical sterilizer. Tahapan sterilisasi adalah sebagai berikut:

- Alat yang akan disterilkan dipastikan dalam keadaan kering
- Alat dimasukkan disusun pada rak beringkat dalam cabinet medical sterilizer. Alat diberi jarak satu sama lain agar mencapai hasil steril yang optimal. Lalu pintu kabinet ditutup.
- Medical sterilizer dinyalakan dan buzzer akan bersuara
- Tombol "UPPER" ditekan sehingga indikator pintu kabinet atas akan menyala, kabinet atas akan bekerja selama 30 menit.
- Tombol "LOWER" ditekan sehingga indikator pintu kabinet bawah akan menyala. Kabinet bawah akan mulai bekerja dengan suhu 120°C .
- Tombol "Automatic" ditekan maka cabinet atas dan bawah akan bekerja dan berhenti secara otomatis dengan durasi 15 menit dan 30 menit.

2.5.1.2 Pembuatan Nata Kulit Pepaya

Buah pepaya dipilih dengan jenis *Carica papaya L.* yang telah diidentifikasi oleh Laboratorium Farmakognosi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar dengan nomor surat 036/SKIT/Farmakognosi/XI/2024. Kondisi buah dengan kulit yang bersih

dan tanpa jamur atau tidak terserang hama. Buah pepaya diperoleh dari pasar Tidung, Kecamatan Rappocini, Kota Makassar. Buah pepaya kemudian dikupas dan kulitnya diambil. Irisan kulit pepaya diambil sebanyak 350 gram kemudian dilakukan proses *blanching*. Proses *blanching* yaitu dengan merebus kulit pepaya sekitar 15 menit hingga mendidih, kemudian kulit pepaya diangkat dan disiram dengan air dingin. Tujuan *blanching* adalah untuk mensterilkan kulit buah pepaya dari kontaminan. Setelah itu, kulit pepaya diblender dengan air sebanyak 1 liter. Kemudian disaring sehingga diperoleh sari kulit pepaya. Sari kulit pepaya ditambahkan gula sebanyak 30 gram dan ZA food grade sebanyak 7 gram, lalu dimasak hingga mendidih. Setelah mendidih, ditambahkan asam asetat glasial sebanyak 1 ml. Penambahan asam asetat glasial adalah untuk mendapatkan kondisi asam (pH 4). pH campuran sari kulit pepaya dipastikan dengan melakukan pemeriksaan menggunakan kertas pH. Ketika didapatkan pH 4 maka selanjutnya campuran tersebut dimasukkan ke dalam botol media steril masing-masing 200 ml. Botol media ditutup dengan kertas HVS yang sudah disterilkan dan diikat dengan karet untuk mencegah masuknya udara. Setelah dingin, maka starter nata ditambahkan ke dalam campuran sari kulit pepaya tersebut sebanyak 20 ml pada setiap botol media. Selanjutnya botol ditutup Kembali dan pastikan tidak tergoyang. Selanjutnya difermentasi pada suhu ruang selama 8 hari.

Pepaya secara oral dengan sonde. Kapasitas lambung tikus yaitu 3.4 ml dengan waktu pengosongan lambung sekitar 10 menit (Hatton, et al. 2015). Nata Kulit Pepaya diberikan dengan jeda 10 menit sebelum/sesudah tikus mengonsumsi pakan.



Gambar 6. Alur Pembuatan Nata Kulit Pepaya

2.5.1.3 Pemeriksaan Kadar Serat Kasar Nata Kulit Pepaya

Pengujian kandungan serat merujuk pada Rohmah, et al. (2022) dengan metode mengekstraksi sampel menggunakan asam dan basa untuk memisahkan serat kasar dari bahan lain. Adapun prosedur kerja pengujian adalah sebagai berikut:

- menimbang sampel yang akan diuji sebanyak 4 g

- ekstraksi sampel dengan cara diaduk lalu diendapkan untuk memisahkan lemak yang terkandung dalam sampel
- sampel dituangkan ke dalam pelarut organik sebanyak tiga kali lalu dikeringkan untuk kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL
- menambahkan 50 mL larutan H₂SO₄ 1,25% lalu dididihkan selama 30 menit menggunakan pendingin tegak
- sampel ditambahkan 50 mL larutan NaOH 3,25% dan dididihkan kembali selama 30 menit
- Saring sampel ketika dalam keadaan panas menggunakan corong *Bucher* yang berisi kertas saring tak berabu *Whatman* 54, 41 atau 541 yang telah dikeringkan dan diketahui bobotnya.
- Endapan yang terdapat pada kertas saring kemudian dicuci berturut-turut menggunakan H₂SO₄ 1,25% panas, air panas dan etanol 96%
- Kertas saring beserta isinya kemudian diangkat dan dimasukkan ke dalam kotak timbang yang sudah diketahui bobotnya
- Lalu dikeringkan pada suhu 105°C setelah itu didinginkan dan ditimbang sampai bobot tetap
- Jika nilai kadar serat kasar yang diuji lebih besar dari 1%, maka kertas saring dan isinya diabukan kemudian ditimbang sampai bobot tetap.

Berikut merupakan perhitungan kadar serat kasar:

a. Jika serat kasar < 1%

$$\% \text{ serat kasar} = \frac{w}{w_2} \times 100\%$$

Ket.: w: Berat sampel (g); w₁: Berat abu (g); w₂: Berat endapan pada kertas saring (g).

b. Jika serat kasar > 1%

$$\% \text{ serat kasar} = \frac{w - w_1}{w_2} \times 100\%$$

2.5.1.4 Pemeriksaan Kapasitas Total Antioksidan Nata Kulit Pepaya

Kapasitas antioksidan nata kulit pepaya ditentukan menggunakan metode peredaman radikal DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) dengan vitamin C sebagai standar. Larutan DPPH (3,8 mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 0,2 mL air suling, kemudian larutan tersebut divorteks dan tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil. Tabung reaksi kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dalam ruangan gelap. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS Genesys 10s (Thermo Scientific) pada panjang gelombang 515 nm. Dalam tabung reaksi lain, 0,2 g nata kulit pepaya dimasukkan, kemudian ditambahkan 3,8 mL metanol 70% dan dihomogenisasi menggunakan vortex mixer. Sebagian larutan yang telah dihomogenisasi (0,2 mL) dipindahkan ke tabung reaksi lain, lalu ditambahkan 3,8 mL larutan DPPH dan dihomogenisasi kembali. Setelah proses homogenisasi, tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dalam ruangan gelap.

Absorbansi kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 515 nm.

2.5.1.5 Pemeliharaan Hewan Coba

Sebelum memulai percobaan, tikus jantan Wistar ditempatkan dalam kandang dan diaklimatisasi dengan kondisi laboratorium selama 7 hari. Tikus dipelihara pada suhu ruangan (28–32°C). Tikus diberi pakan standar (5–10 gram per hari) dan diberikan akses air minum secara *ad libitum*. Kandang dijaga tetap kering dan dibersihkan tiga kali sehari.

2.5.2 Tahap Intervensi

2.5.2.1 Induksi Tikus Diabetes dengan Streptozotocin

Tikus dipuasakan sebelum dilakukan induksi. Kemudian diberikan satu dosis streptozotocin (STZ) secara intraperitoneal sebesar 40 mg/kg BB. STZ disiapkan dalam sediaan yang baru. Kemudian dilarutkan dalam buffer sitrat 0,1 M dengan pH 4,5 tepat sebelum injeksi. Larutan sukrosa 10% diberikan secara oral *ad libitum* selama 24 jam segera setelah induksi diabetes untuk mencegah kematian akibat syok hipoglikemia yang dapat terjadi akibat pemberian STZ (Fajarwati et al., 2023).

2.5.2.2 Penentuan Dosis

1. Penentuan dosis selulosa

Konversi dosis manusia ke tikus = 0.018 (Laurence dan Bacharach, 1964)

Dosis selulosa yang akan digunakan pada tikus yaitu:

Dosis manusia 35 g x 0.018 = 0.63, dibulatkan menjadi 0.6 gram/hari

Dosis pemberian selulosa merujuk pada rekomendasi asupan serat berdasarkan WHO yaitu 27-40 g/hari dapat memberikan pengaruh kesehatan dalam mencegah obesitas, diabetes, penyakit jantung, dan berbagai kanker (Nishida et al., 2004). Pada penelitian lain juga menyatakan rekomendasi asupan serat dalam diet diabetes yaitu 35–40-gram (Mogos et al., 2017). Untuk mencegah terjadinya intoleransi yaitu gangguan dyspepsia seperti nyeri perut, kembung, dll maka dianjurkan dimulai dari batas bawah rekomendasi dan kemudian dinaikkan secara bertahap (Mogos et al., 2017).

2. Dosis Nata Kulit Pepaya

Dosis yang diberikan berdasarkan dosis anjuran serat pada manusia yaitu 27 gram, 35 gram, dan 40 gram (Nishida et al. 2004, Mogos, et al. 2017). Kemudian dikonversikan ke dosis tikus sehingga dosis yang digunakan yaitu 0.5 gram, 0.6 gram, dan 0.7 gram per hari.

3. Digunakan aquades sebagai placebo sebanyak 2 ml. Pemberian aquades tidak melebihi dari batas maksimum kapasitas lambung tikus yaitu maksimal 3.4 ml dengan waktu pengosongan lambung sekitar 10 menit (Hatton, et al. 2015).

Masing-masing perlakuan diberikan pada pagi hari selama 4 minggu.

2.5.2.3 Pengukuran kadar HbA1C

Pada akhir perlakuan di minggu ke-4. Perubahan pada kadar HbA1c dapat dilihat setelah 4 minggu perlakuan merujuk pada penelitian Yongcheng, et al. (2023). Sampel darah diambil melalui retro-orbital pleksus menggunakan tabung pipa kapiler. Kemudian plasma darah dikumpulkan menggunakan EDTA sebagai antikoagulan. Lalu disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 2000-3000 RPM. Supernatan dikumpulkan tanpa sedimen. Sampel disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu -80°C sebelum digunakan.

Pengukuran HbA1C diukur menggunakan metode Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) dengan kit Rat Hemoglobin A1C dari Bioassay Technology Laboratory (BT LAB). Adapun tahapan prosedurnya sebagai berikut:

1. Persiapan Reagen
Semua reagen harus dibiarkan mencapai suhu ruang sebelum digunakan.
2. Pembuatan Larutan Standar
 - Larutkan 120 µl standar (480 ng/ml) dengan 120 µl pelarut standar untuk menghasilkan larutan stok standar 240 ng/ml. Biarkan standar selama 15 menit dengan pengadukan lembut sebelum melakukan pengenceran.
 - Siapkan titik-titik standar duplikat dengan mengencerkan larutan stok standar (240 ng/ml) secara seri 1:2 dengan pelarut standar untuk menghasilkan larutan 120 ng/ml, 60 ng/ml, 30 ng/ml, dan 15 ng/ml. Pelarut standar berfungsi sebagai standar nol (0 ng/ml).
 - Larutan yang tersisa harus dibekukan pada suhu -20°C dan digunakan dalam waktu satu bulan.
 - Pengenceran larutan standar yang disarankan adalah sebagai berikut:

Tabel 4. Larutan Standar Pemeriksaan HbA1c

Konsentrasi	No. Standar	Prosedur
240 ng/ml	No. 5	120 µl Standar Asli + 120 µl Pelarut Standar
120 ng/ml	No. 4	120 µl Standar No.5 + 120 µl Pelarut Standar
60 ng/ml	No. 3	120 µl Standar No.4 + 120 µl Pelarut Standar
30 ng/ml	No. 2	120 µl Standar No.3 + 120 µl Pelarut Standar
15 ng/ml	No. 1	120 µl Standar No.2 + 120 µl Pelarut Standar

3. Pembuatan *Wash Buffer*

Encerkan 20 ml konsentrat *wash buffer* (25x) ke dalam air deionisasi atau air suling untuk menghasilkan 500 ml *wash buffer* 1x. Jika terdapat kristal pada konsentrat, campur perlahan hingga kristal larut sepenuhnya.

4. Prosedur Pengujian

- 1) Siapkan semua reagen, larutan standar, dan sampel sesuai petunjuk. Biarkan reagen mencapai suhu ruang sebelum digunakan. Pengujian dilakukan pada suhu ruang.
- 2) Tentukan jumlah strip yang diperlukan untuk uji. Pasang strip dalam bingkai yang digunakan. Simpan strip yang tidak digunakan pada suhu 2-8°C.
- 3) Tambahkan 50 µl standar ke sumur standar. **Catatan:** Jangan tambahkan antibodi terbiotinilasi ke sumur standar karena larutan standar mengandung antibodi terbiotinilasi.
- 4) Tambahkan 40 µl sampel ke sumur sampel, lalu tambahkan 10 µl antibodi anti-Hba1c ke sumur sampel. Tambahkan 50 µl streptavidin-HRP ke sumur sampel dan sumur standar (tidak ke sumur kontrol kosong). Campur dengan baik. Tutup pelat dengan penutup dan inkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C.
- 5) Lepaskan penutup dan cuci pelat 5 kali dengan *wash buffer*. Rendam sumur dengan 300 µl *wash buffer* selama 30 detik hingga 1 menit untuk setiap pencucian. Untuk pencucian otomatis, aspirasi atau buang cairan setiap sumur dan cuci 5 kali dengan *wash buffer*. Keringkan pelat dengan handuk kertas atau bahan penyerap lainnya.
- 6) Tambahkan 50 µl larutan substrat A ke setiap sumur, lalu tambahkan 50 µl larutan substrat B. Inkubasi pelat yang ditutup dengan penutup baru selama 10 menit pada suhu 37°C dalam kondisi gelap.
- 7) Tambahkan 50 µl larutan penghenti ke setiap sumur. Warna biru akan langsung berubah menjadi kuning.
- 8) Tentukan densitas optik (nilai OD) setiap sumur segera menggunakan pembaca mikrotiter yang disetel pada 450 nm dalam waktu 10 menit setelah menambahkan larutan penghenti (*stop solution*).

2.5.2.4 Pengukuran gula darah tikus

Tikus diaklimatisasi selama satu minggu. Sebelum induksi STZ, tikus diukur kadar GDP. Pada hari ke-8 tikus diinduksi STZ melalui intraperitoneal (IIP) dengan dosis sebanyak 40 mg/kg BB. Pemeriksaan glukosa dilakukan kembali 3 hari sesudah induksi STZ yang merupakan gula darah puasa hari ke-0. Gula darah puasa akan diukur kembali saat perlakuan terakhir (minggu ke-4). Tikus dipuasakan 16 jam sebelum

pengambilan sampel darah. Pengukuran gula darah puasa (GDP) tikus dilakukan dari pembuluh darah ekor (vena lateralis) menggunakan glukometer glucoDR Biosensor (Firdaus et.al, 2016). Tikus dinyatakan diabetes apabila glukosa darah puasa ≥ 155 mg/dL (Fajarwati et.al, 2023).

2.5.2.5 Analisis Mikrobiota Usus (*Lactobacillus Gasseri*)

Pengujian mikrobiota usus melalui sampel feses yang diambil pada akhir perlakuan yaitu pada minggu ke-4 (Yongcheng, et al. 2023). Feses diambil pada setiap kelompok tikus untuk mengidentifikasi jenis bakteri *Lactobacillus Gasseri* yang terdapat pada feses. Prosedur kerja analisis mikrobiota usus adalah sebagai berikut:

1. Pengumpulan sampel

Sampel diambil dengan melakukan pengumpulan sampel feses tikus dengan dikelompokkan berdasarkan perlakuan dan langsung dimasukkan ke dalam tabung medium transport. Seluruh tabung sampel ditaruh dalam sebuah wadah kotak besar dan dijaga pada suhu 2-8°C dengan menggunakan tambahan es kering di dalam kotaknya selama maksimal 2 jam. Setelah itu, sampel disimpan pada suhu -80 °C sampai diproses lebih lanjut (Singer et al., 2021).

2. Ekstraksi DNA

Proses selanjutnya adalah ekstraksi DNA dari sampel feses yang telah dikumpulkan dengan menggunakan Kit Presto™ Stool DNA Extraction. Adapun tahapan-tahapannya adalah sebagai berikut:

a) Persiapan Awal

- 1) Jika terdapat endapan pada Buffer ST1, panaskan dalam penangas air 37°C sambil digoyangkan perlahan hingga larut.
- 2) Tambahkan etanol absolut (lihat label botol untuk volumenya) ke dalam Wash Buffer, lalu kocok selama beberapa detik. Pastikan botol tertutup rapat setelah digunakan untuk menghindari penguapan.

b) Lisis Sampel

- 1) Pindahkan 180–220 mg tinja ke dalam tabung Beadbeating. Untuk sampel tinja hewan yang sangat kering atau kaya serat, kurangi jumlah menjadi 60–80 mg.
- 2) Hindari memasukkan partikel makanan yang tidak tercerna, seperti kulit buah.
- 3) Tambahkan 800 µl Buffer ST1, vortex sebentar, lalu inkubasi pada 70°C selama 5 menit.
- 4) Pasang tabung Beadbeating secara horizontal pada vortex menggunakan perekat atau adaptor. Vortex pada kecepatan maksimum selama 10 menit pada suhu ruang.
- 5) Centrifuge pada 8.000 x g selama 2 menit untuk menghilangkan busa. Pindahkan 500 µl supernatan ke tabung mikro 1,5 ml baru.
- 6) Panaskan Buffer Elusi (100 µl per sampel) pada 60°C.

c) Penghapusan Inhibitor PCR

- 1) Tambahkan 150 µl Buffer ST2, vortex selama 5 detik, dan inkubasi pada 0-4°C selama 5 menit.

- 2) Centrifuge pada 16.000 x g selama 3 menit. Pindahkan supernatan jernih ke kolom penghilang inhibitor (cincin ungu) dan centrifuge lagi.
 - 3) Simpan hasil aliran untuk tahap pengikatan DNA.
 - d) Pengikatan DNA
 - 1) Tambahkan 800 µl Buffer ST3 ke aliran, lalu kocok segera selama 5 detik.
 - 2) Transfer campuran ke kolom GD (cincin hijau) secara bertahap, centrifuge setiap kali, dan buang hasil aliran.
 - e) Pencucian
 - 1) Tambahkan 400 µl Buffer ST3 ke kolom GD, centrifuge selama 30 detik.
 - 2) Tambahkan 600 µl Wash Buffer (yang telah ditambahkan etanol), centrifuge selama 30 detik. Ulangi langkah ini sekali lagi.
 - 3) Centrifuge selama 3 menit untuk mengeringkan matriks kolom.
 - f) Elusi DNA
 - 1) Pindahkan kolom GD ke tabung mikro 1,5 ml baru. Tambahkan 30-100 µl Buffer Elusi ke tengah matriks kolom.
 - 2) Diamkan selama minimal 2 menit agar buffer terserap, lalu centrifuge pada 16.000 x g selama 2 menit.
1. Deteksi Mikrobiota Usus *L. Gasseri* dengan RT-PCR
- Pada proses deteksi mikrobiota *L. Gasseri* digunakan dua pasang primer planF (5'-TGG AAA CAG TGC TMT ACC G-3') dan pREV (5'-CAG TTA CTA CCT CTA TCT TTC TTC ACT AC-3').
- Tahap analisis mikrobiota *L. Gasseri* menggunakan metode real time PCR meliputi pembuatan master mix PCR, pembacaan, pembuatan kurva standar, dan penghitungan jumlah bakteri hasil. Adapun tahapan pembuatan master mix PCR adalah sebagai berikut:
- Campuran NTC terdiri dari Sensifast Sybr No-Rox Mix 5 µL, primer *L. Gasseri* F 1 µL, primer *L. Gasseri* R 1 µL.
 - Campuran sampel terdiri dari Sensifast Sybr No-Rox Mix 5 µL, primer *L. Gasseri* F 1 µL, primer *L. Gasseri* R 1 µL, dan sampel dari hasil ekstraksi DNA feses 3 µL.
 - Campuran kontrol negatif yaitu Sensifast Sybr No-Rox Mix 5 µL, primer *L. Gasseri* F 1 µL, primer *L. Gasseri* R 1 µL dan Nuclease Free Water 1 µL.
 - Campuran kontrol positif terdiri dari Sensifast Sybr No-Rox Mix 5 µL, primer *L. Gasseri* F 1 µL, primer *L. Gasseri* R 1 µL pooling yang terdiri dari sampel mix masing-masing 5 µL.

Campuran tersebut dicampur sampai homogen dan dibagi ke dalam tabung PCR dalam jumlah yang ditentukan tersebut.

Tabung PCR yang berisi PCR mix dan cetakan kemudian dimasukkan ke dalam mesin RT-PCR Bio-Rad CFX-96 dengan siklus sebagai berikut:

- *Initial PCR activation* selama 10 menit pada suhu 95°C; denaturasi pada suhu 95°C selama 15 detik
- *Annealing* atau penempelan primer pada suhu 60°C selama 1 menit
- *Extension* atau pemanjangan selama 15 detik pada suhu 95°C dengan jumlah siklus 40 siklus.

Perhitungan jumlah sel dilakukan dengan menggunakan kurva standar dengan range 0 – 14122170.06 CFU/mL dan didapatkan persamaan garis $y = 31.847 + 0.2266x + 101223766.9x^2$ dengan $R^2 = 0.997$.

2.5.3 Tahapan Pre-Post Intervensi

2.5.3.1 Pengukuran Berat Badan, Panjang Badan, dan Indeks Lee Tikus

Tikus ditimbang setiap minggu dengan menggunakan timbangan digital. Kemudian diukur pula panjang badan naso-anal. Setelah itu dihitung status obesitasnya menggunakan Indeks Lee dengan rumus sebagai berikut:

Indeks Lee = akar tiga dari berat badan (g) / Panjang naso anal (cm)

(Novelli, et al. 2006).

2.5.3.2 Monitoring Kesehatan Tikus

Setiap minggu selama penelitian tikus dimonitoring kesehatannya melalui beberapa indikator (Burkholder et al., 2012) yaitu:

1. Pemantauan berat badan dalam satuan gram
2. Terdapat lesi kulit seperti dermatitis dan luka
3. Terdapat benjolan seperti benjolan pada kelenjar mammae, abses, tumor
4. Kesehatan mata dan sekitarnya seperti struktur pada mata depan terdapat kornea putih, berkerang, dan kering, kemudian terjadi konjungtivitis, serta produksi air mata yang berlebih
5. Kejadian diare yaitu dengan menilai konsistensi feses
6. Penilaian pergerakan yaitu penurunan pergerakan atau terlihat melemah
7. Pernapasan yaitu dengan melihat pernapasan menjadi cepat dangkal (perut terlihat berusaha bernapas), keluar cairan pada hidung, dan terdapat kerak pada hidung
8. Pembesaran pada perut dengan penilaian *pitting edema* untuk memastikan adanya penumpukan cairan atau terjadi kembung
9. Prolaps rektal yaitu penonjola usus besar distal keluar dari rektum
10. Anoreksia yaitu tikus tampak terlalu kurus atau dehidrasi

2.6 Analisis Data

Analisis data hasil pemeriksaan GDP, HbA1c, mikrobiota usus yang terkumpul diolah melalui analisis statistic menggunakan program SPSS untuk membandingkan data sebelum perlakuan dan/atau setelah perlakuan. Setiap data diuji normalitas dan homogenitas. Analisis data yang digunakan adalah jenis bivariat dan uji statistik dilakukan dengan uji one way ANOVA atau uji Kruskal-Wallis, serta uji Paired-T test.

2.7 Izin Penelitian dan Kelayakan Etik

Penelitian ini dilakukan setelah mendapat persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Rumah Sakit Perguruan Tinggi Negeri Universitas Hasanuddin (RSPTN UH) – RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo, Makassar, dengan Nomor Surat 563/UN4.6.5.31/PP36/2024 dan nomor protocol UH24060453.