

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Diabetes melitus merupakan salah satu masalah kesehatan global yang terus mengalami peningkatan prevalensi dari tahun ke tahun. Pada tahun 2024 jumlah penderita diabetes di seluruh dunia diperkirakan mencapai 589 juta orang berusia 20–79 tahun, dan angka ini diprediksi akan meningkat menjadi 643 juta orang pada tahun 2030 serta mencapai 784 juta orang pada tahun 2045. Data tersebut menunjukkan bahwa sekitar 1 dari 10 orang dewasa di dunia hidup dengan diabetes, dengan sebagian besar kasus terjadi di negara berpenghasilan menengah ke bawah. Di Indonesia, prevalensi diabetes juga menunjukkan peningkatan yang mengkhawatirkan. Pada tahun 2024, tercatat sekitar 20,4 juta penduduk dewasa menderita diabetes, dengan prevalensi sebesar 11,3% dari total populasi dewasa. Jumlah ini diperkirakan akan terus meningkat hingga mencapai 28,6 juta penderita pada tahun 2050. Kondisi ini menempatkan Indonesia sebagai salah satu dari sepuluh negara dengan jumlah penderita diabetes tertinggi di dunia (IDF 2025; Soeatmadji et al., 2023).

Meskipun telah tersedia berbagai pilihan terapi, pengobatan diabetes hingga saat ini masih memiliki sejumlah keterbatasan. Obat-obatan konvensional seperti obat golongan sulfonilurea, efektif menurunkan kadar glukosa darah, tetapi penggunaan jangka panjangnya dapat menimbulkan stres pada sel β , menyebabkan hilangnya identitas sel tersebut. Akibatnya, terjadi peningkatan apoptosis dan penurunan fungsi sel β , termasuk kemampuan sekresi insulin terhadap glukosa (Fernández et al., 2025). Sementara itu, obat generasi baru seperti agonis reseptor GLP-1 dan inhibitor SGLT2 menawarkan manfaat tambahan, namun penggunaannya dibatasi oleh biaya yang tinggi (Weinberg Sibony et al., 2023). Metformin sebagai terapi lini pertama memiliki efek menurunkan kadar glukosa darah melalui peningkatan sensitivitas insulin dan penekanan glukoneogenesis hepatik, tetapi tidak memiliki efek protektif langsung terhadap struktur histologi pankreas dan tidak mampu memperbaiki kerusakan sel β secara spesifik (Yin et al., 2022).

Keterbatasan obat-obatan konvensional dalam mempertahankan integritas jaringan pankreas menimbulkan kebutuhan akan agen terapeutik yang tidak hanya menurunkan kadar glukosa darah, tetapi juga mampu melindungi struktur dan fungsi pankreas secara langsung. Untuk melindungi jaringan pankreas dari kerusakan akibat stres oksidatif, diperlukan senyawa dengan aktivitas antioksidan yang mampu menetralkan radikal bebas penyebab kerusakan sel (Yuliana & Herawati, 2016). Salah satu sumber antioksidan alami yang berpotensi adalah daun paliasa (*Kleinhovia hospita*), tanaman lokal yang telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional, termasuk untuk penyakit metabolik seperti diabetes (Rura et al., 2023). Senyawa bioaktif yang terdapat dalam ekstrak *Kleinhovia hospita* L., antara lain triterpenoid sikloartana, eleutherol, dan kaempferol 3-O- β -D-glukosida, dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan (Hidayat et al., 2023).

Kaempferol berperan sebagai antioksidan melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan elektron untuk menstabilkan radikal bebas, serta menghambat peroksidasi lipid. Aktivitas ini dibuktikan dalam beberapa penelitian yang menunjukkan efek penurunan malondialdehid (MDA) dan aktivitas antiradikal pada ekstrak daun paliasa. Selain flavonoid, paliasa juga mengandung terpenoid, termasuk triterpenoid sikloartana, yang meskipun lebih banyak dilaporkan memiliki aktivitas antiproliferatif dan antiinflamasi, turut berkontribusi secara tidak langsung terhadap efek antioksidan melalui penekanan stres oksidatif dan modulasi respon inflamasi. Senyawa eleutherol yang teridentifikasi dalam paliasa juga termasuk komponen fenolik yang dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan dengan mekanisme penghambatan radikal bebas dan perlindungan sel terhadap kerusakan oksidatif (Hidayat et al., 2023)

Peran antioksidan dalam pengobatan diabetes sangat penting karena hiperglikemia yang berlangsung lama dapat meningkatkan produksi radikal bebas dan memicu stres oksidatif, yang pada gilirannya menyebabkan kerusakan sel β pankreas dan semakin menurunkan produksi insulin. Kondisi ini juga berperan dalam timbulnya komplikasi kronis, seperti kerusakan ginjal, saraf, retina, dan pembuluh darah. Oleh karena itu, antioksidan diperlukan untuk menetralkan radikal bebas, melindungi jaringan dari kerusakan oksidatif, serta memperlambat progresivitas diabetes (Yi et al., 2023)

Dalam penelitian ini, digunakan streptozotocin (STZ) yang merupakan senyawa glukosamin-nitrosourea untuk menginduksi diabetes melitus pada hewan coba karena memiliki spesifisitas tinggi terhadap sel β pankreas. STZ pertama kali diisolasi dari bakteri *Streptomyces achromogenes* dan dikenal sebagai analog glukosa toksik yang bekerja dengan cara masuk ke dalam sel β melalui *glucose transporter 2* (GLUT2) yang diekspresikan secara dominan di pankreas hewan (Furman, 2021; Wu & Yan, 2015). Setelah berada di dalam sel, STZ melepaskan gugus metil nitrosourea yang menyebabkan alkilasi DNA, sehingga terjadi kerusakan genetik dan aktivasi enzim *poly(ADP-ribose) polymerase* (PARP) yang menghabiskan cadangan *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD^+) dan adenosin trifosfat (ATP). Deplesi energi ini mengakibatkan kematian sel β secara nekrosis, disertai dengan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) dan *nitric oxide* (NO) yang memperburuk kerusakan mitokondria dan memicu stres oksidatif serta apoptosis. Efek sitotoksik STZ paling dominan terjadi pada pankreas karena sel β memiliki kapasitas antioksidan yang rendah dibandingkan jaringan lain, sehingga lebih rentan terhadap stres oksidatif dan kerusakan DNA. Akibatnya, sekresi insulin menurun drastis dan terjadi hiperglikemia (Ghasemi & Jeddi, 2023; Wu & Yan, 2015)

Berdasarkan uraian di atas, dengan adanya potensi daun paliasa (*Kleinhovia hospita*) sebagai sumber antioksidan alami yang berperan dalam melindungi sel β pankreas dari kerusakan akibat stres oksidatif, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut guna memberikan bukti ilmiah yang kuat. Dengan demikian, penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar bagi pengembangan terapi alami yang aman, efektif, dan terjangkau dalam mendukung pengelolaan diabetes melitus.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana efek ekstrak etanol daun paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) terhadap histomorfometrik pulau Langerhans pada pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diabetes dengan streptozotocin?

1.3 Tujuan

Mengevaluasi efek ekstrak etanol daun paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) terhadap histomorfometrik pulau Langerhans pada pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diabetes dengan streptozotocin

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi, Laboratorium Balai Besar Veteriner Maros serta Laboratorium Farmasi Klinik Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alumunium foil, batang pengaduk, cawan porselen, gelas beaker, timbangan analitik, toples kaca, pH meter (Ohaus®), pipet tetes, *rotary* evaporator (Heidolph®).

2.2.2 Bahan

Aquadest, asam sitrat monohidrat, asam sitrat 0,1 M, natrium sitrat 0,1 M, buffer sitrat 0,1 M, daun paliasa (*Kleinhovia hospita* L.), dekstrosa 5% (Otsuka®), etanol 70%, formalin, hematoksin dan eosin (H&E), kertas saring Whatmann®, metformin (Hexpharm®), NaCMC 1%, natrium sitrat dihidrat, pakan tikus standar, parafin, *phosphate-buffered saline* (PBS) dingin, streptozotocin (bioWORLD®), dan xilena.

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Penyiapan sampel

Sampel yang telah diambil terlebih dahulu dilakukan sortasi basah, yaitu proses pemisahan dari kotoran maupun bahan asing yang tercampur. Setelah itu, sampel dicuci dengan air mengalir dan dirajang menjadi bagian-bagian kecil. Proses pengeringan kemudian dilakukan dengan cara diangin-anginkan pada udara terbuka, namun tetap dijaga agar tidak terkena paparan langsung sinar matahari. Setelah kering, sampel kembali disortir melalui sortasi kering, lalu dilanjutkan dengan proses penghalusan (Siharis et al., 2021; Wardani et al., 2020).

2.3.2 Pembuatan ekstrak (*Kleinhovia hospita* L.)

Daun paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) yang telah dikeringkan kemudian dibuat serbuk simplisia. Sebanyak 1000 g serbuk kering dimaserasi dengan etanol 70% dengan perbandingan (1:10) pada suhu kamar selama tiga hari dalam wadah tertutup. Hasil maserasi kemudian disaring, dan filtrat yang diperoleh diuapkan menggunakan *rotary* evaporator hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak yang dihasilkan selanjutnya disimpan di dalam desikator pada suhu kamar ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) untuk menghilangkan sisa pelarut dan menjaga kestabilan ekstrak. Sebelum digunakan pada hewan uji, ekstrak dilarutkan dalam suspensi NaCMC 1% untuk memudahkan proses pemberian secara oral (Djabir et al., 2020).

Hasil proses ekstraksi maserasi dapat dihitung persentase rendemennya dengan rumus sebagai berikut (Dewatisari et al., 2018):

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak kental (g)}}{\text{berat awal simplisia kering (g)}} \times 100 \%$$

2.3.3 Penyiapan hewan uji

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) dengan berat badan 150–200 g. Sebanyak 36 ekor tikus dipelihara di kandang berventilasi baik dengan alas serbuk kayu pada suhu ruang dan siklus terang/gelap 12:12 jam. Semua hewan diberi pakan standar berupa pelet dan air minum *ad libitum*. Sebelum perlakuan dimulai, tikus terlebih dahulu diaklimatisasi terhadap lingkungan laboratorium selama tujuh hari untuk menyesuaikan diri dengan kondisi pemeliharaan (Djabir et al., 2020).

Penentuan jumlah sampel dalam penelitian ini menggunakan rumus Federer, yaitu,

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

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

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

$$(n-1) \geq \frac{15}{5}$$

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

$$n \geq 4$$

dengan t merupakan jumlah kelompok dan n adalah jumlah hewan percobaan tiap kelompok. Dengan jumlah kelompok sebanyak enam, sehingga nilai n minimal adalah 4. Jumlah sampel yang diperoleh dari hasil perhitungan statistik merupakan jumlah minimum untuk mencapai kekuatan statistik yang telah ditetapkan. Namun, dalam praktiknya sering terjadi kehilangan subjek, sehingga jumlah hewan uji awal perlu dikoreksi dengan menambahkan faktor cadangan sesuai tingkat *attrition* yang diperkirakan (Akinaw et al., 2024; Zhang & Hartmann, 2023).

2.3.4 Penyiapan buffer sitrat 0,1M pH 4,5

Buffer sitrat 0,1 M dengan pH 4,5 digunakan sebagai pelarut Streptozotocin (STZ) dalam proses induksi diabetes pada hewan uji. Buffer ini disiapkan dengan mencampurkan larutan asam sitrat monohidrat 0,1 M dan larutan natrium sitrat trisodium dihidrat 0,1 M. Larutan asam sitrat 0,1 M dibuat dengan melarutkan 1,05 g asam sitrat monohidrat ke dalam 50 mL aquadest, sedangkan larutan natrium sitrat 0,1 M dibuat dengan melarutkan 1,47 g natrium sitrat trisodium dihidrat ke dalam 50 mL aquadest. Setelah kedua larutan induk tersebut disiapkan, masing-masing sebanyak 44,5 mL larutan asam sitrat dan 55,5 mL larutan natrium sitrat dicampurkan hingga diperoleh volume akhir 100 mL. Campuran diaduk sampai homogen, kemudian pH diukur menggunakan pH meter dan disesuaikan hingga mencapai 4,5 dengan menambahkan sedikit larutan asam sitrat atau natrium sitrat sesuai kebutuhan. Buffer sitrat ini harus disiapkan dalam keadaan segar, disimpan pada suhu dingin, dan digunakan segera untuk melarutkan STZ karena senyawa tersebut

tidak stabil pada suhu ruang (Garud & Vyawahare, 2019).

2.3.5 Penyiapan larutan streptozotocin

Serbuk streptozotocin berwarna kuning pucat yang kuning kering-beku disimpan pada vial gelap di suhu -20°C bila belum digunakan. Penyiapan larutan streptozotocin dimulai dari serbuk streptozotocin dicampur dengan larutan dapar asam sitrat 0,1 M yang dingin dengan kisaran pH 4,0 hingga 4,5. Pencampuran dilakukan dalam tabung reaksi yang dibungkus alumunium foil dan segera simpan campuran tersebut pada suhu dingin (4°C) dan terlindung dari cahaya untuk mencegah terjadinya degradasi. Larutan streptozotocin disuntikkan ke tikus maksimal 30 menit dari waktu penyiapan (Ghasemi & Jeddi, 2023).

2.3.6 Penyiapan larutan NaCMC 1%

Aquadest sebanyak 100 mL terlebih dahulu dipanaskan, kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit serbuk Na CMC sebanyak 1 gram, sambil diaduk hingga homogen atau tersuspensi dengan baik (Wardani et al., 2020).

2.3.7 Penyiapan suspensi ekstrak daun paliasa (*Kleinhovia hospita* L.)

Penyiapan suspensi ekstrak daun paliasa dilakukan dengan menimbang ekstrak sesuai hasil perhitungan untuk dosis 125 mg/kgBB, 250 mg/kgBB, dan 500 mg/kgBB (perhitungan terlampir). Ekstrak yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam lumpang dan ditambahkan larutan koloidal NaCMC 1% b/v kemudian digerus hingga homogen (Wardani et al., 2020).

2.3.8 Penyiapan obat standar metformin

Dosis metformin untuk manusia dikonversi ke dalam dosis untuk tikus (perhitungan terlampir). Untuk mengetahui bobot serbuk metformin yang ditimbang maka digunakan rumus sebagai berikut (Awaluddin et al., 2018).

$$\text{Bobot serbuk ditimbang} = \frac{\text{Bobot yang diinginkan}}{\text{Dosis etiket}} \times \text{bobot rata-rata}$$

Pembuatan larutan metformin dilakukan dengan cara menggerus tablet metformin hingga halus, kemudian ditimbang serbuk sesuai dengan perhitungan dosis dan dilarutkan dalam larutan NaCMC 1% sambil diaduk hingga homogen (Nair & Jacob, 2016; Nangoy et al., 2019).

2.3.9 Perlakuan pada hewan uji

Penelitian ini menggunakan 36 tikus jantan dengan berat yang bervariasi. Selama masa eksperimen, tikus tersebut dirawat sesuai dengan standar. Adapun pembagian kelompoknya (n=6) :

- a. Kelompok 1 (Kontrol Non Diabetes) : Tikus diberi pakan standar ditambah dengan larutan koloidal NaCMC
- b. Kelompok 2 (Kontrol Diabetes) : Tikus diinjeksi secara intraperitoneal dengan streptozotocin 55 mg/kgBB dalam buffer sitrat 0,1 M (Ghasemi & Jeddi, 2023; Kottaisamy et al., 2021).

- c. Kelompok 3 (Diabetes + Ekstrak Daun Paliasa) : Tikus diabetes kemudian diberi ekstrak dosis 125 mg/kgBB secara oral selama 28 (Djabir et al., 2020).
- d. Kelompok 4 (Diabetes + Ekstrak Daun Paliasa) : Tikus diabetes kemudian diberi ekstrak dosis 250 mg/kgBB secara oral selama 28 hari (Djabir et al., 2020).
- e. Kelompok 5 (Diabetes + Ekstrak Daun Paliasa) : Tikus diabetes kemudian diberi ekstrak dosis 500 mg/kgBB secara oral selama 28 hari (Djabir et al., 2020).
- f. Kelompok 6 (Diabetes + Obat Standar) : Tikus diabetes diberi metformin 100 mg/kgBB/hari secara oral selama 28 hari (Raj & Rani, 2024).

Induksi dilakukan dengan menyuntikkan STZ secara intraperitoneal pada dosis 55 mg/kg berat badan. Satu jam setelah penyuntikan, hewan percobaan diberi makan secara bebas (*ad libitum*) dan diberikan larutan dekstrosa 5% selama 24 jam untuk mencegah hipoglikemia awal. Dua hari kemudian (setelah 48 jam), kadar glukosa darah tikus diukur. Tikus yang memiliki kadar glukosa darah lebih dari 250 mg/dL dikategorikan sebagai penderita diabetes (Arijit Chaudhuri & Shalini Sharma, 2016).

2.4 Pengamatan dan Pengukuran

2.4.1 Histologi pankreas

Setelah diangkat, jaringan pankreas dicuci dengan larutan *phosphate-buffered saline* (PBS) dingin, kemudian difiksasi dalam formalin buffer 10% dalam larutan dapar fosfat 0,1 M. Jaringan selanjutnya diproses menggunakan tissue processor, didehidrasi dengan etanol bertingkat, dibersihkan dengan xilena, dan dibenamkan ke dalam parafin. Blok parafin kemudian dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan sekitar 4–5 μm . Potongan jaringan pankreas diwarnai dengan hematoksin dan eosin (H&E) untuk memperjelas struktur sel. Preparat jaringan diperiksa menggunakan mikroskop cahaya, dan foto hasil pengamatan diambil dengan kamera digital yang terhubung untuk keperluan dokumentasi dan analisis histopatologi (Djabir et al., 2017; Zhou et al., 2024).

Parameter morfometrik yang diamati dalam penelitian ini meliputi diameter, dan luas area pulau Langerhans. Diameter pulau pankreas dihitung menggunakan rumus $D = \sqrt{a \times b}$, di mana a merupakan sumbu panjang dan b merupakan sumbu pendek dari pulau Langerhans. Selanjutnya, luas area pulau pankreas dihitung menggunakan rumus $A = \pi \left(\frac{D}{2}\right)^2$, dengan asumsi bahwa bentuk pulau mendekati bentuk sferis. Kemudian dilanjutkan untuk menghitung total luas area tiap kelompok (Djabir et al., 2021).

2.4.2 Analisis statistik

Analisis statistik diawali dengan uji normalitas menggunakan uji Shapiro–Wilk untuk menilai distribusi data. Karena data tidak memenuhi asumsi normalitas ($p < 0,05$), maka analisis perbedaan antar kelompok dilakukan menggunakan uji Kruskal–Wallis sebagai uji nonparametrik untuk membandingkan median lebih dari dua kelompok independen. Apabila uji Kruskal–Wallis menunjukkan hasil yang signifikan, analisis dilanjutkan dengan uji Mann–Whitney sebagai uji *post hoc* untuk mengidentifikasi

pasangan kelompok yang berbeda secara signifikan. Seluruh pengujian dilakukan dengan tingkat signifikansi $p = 0,05$.