

Uji Aktivitas Antidiabetes dan Antioksidan Kombinasi Ekstrak Etanol Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) dan Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*) pada Tikus Diabetes Melitus yang Diinduksi Alloxan
Antidiabetic and Antioxidant Test of Combination Extract Ethanol Herbs Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) and Sambung Nyawa Leaf (*Gynura procumbens*) in Diabetic Rats Induced by Alloxan

Ratih Andriyani¹⁾, Yuniar Ning Tyas²⁾, Farah Ayu Dinah³⁾
 Stikes Nasional Surakarta^{1,2,3}

ratihandriyani3@gmail.com; yuniarningtyas29061998@gmail.com; farahayud@gmail.com

Abstract: Diabetes melitus (DM) is a disease indicated by hyperglycaemia because of abnormalities in carbohydrate, fat, and protein metabolism caused by the decrease of insulin sensitivity. This research was conducted to find the more effective combination of *Gynura procumbens* and *Andrographis paniculata* ethanol extract to decrease blood glucose, LPO, and GSH on the mouse which was induced with alloxan compared to separate treatment. This research used pre and post randomized controlled group design research. The 40 lab animals which were categorized to 8 groups as follow: normal, negative (CMC-Na), positive (1.26 mg/kgBW dose of glibenclamide), 20.5 mg/kgBW of *Andrographis paniculata* (SA 100), 140 mg/kgBW dose of *Gynura procumbens* (SN 100), SASN 75:25, SASN 50:50 and SASN 25:75. The lab animal groups, except the normal one was induced with 160 mg/kgBW of alloxan at day 0, continued with lab animal treatment from day 1 to day 14. Blood sampling was conducted at day 0, day 7, and day 14. Then, at day 14 a surgery to take the mouses' livers was conducted to do antioxidant analysis. The obtained data in the form of blood glucose level at day 1, day 7, and day 14 was measured using GOD-PAP method. All data then analyzed with ANOVA test with ($\alpha=0.05$) for optimal dose of *Gynura procumbens* and *Andrographis paniculata* ethanol extract combination namely SASN 50:50 could decrease the blood glucose level up to 42.86159%, decrease the LPO level up to 0,01666 $\mu\text{M/g}$, increase GSH level up to 2.5066 Mm free SH. The combination of *Gynura procumbens* and *Andrographis paniculata* ethanol extract was more effective to decrease blood glucose level compared to separate treatment.

Key word : Antidiabetic, Antioxidant, Herbs Sambiloto, Leaf Sambung Nyawa

Abstrak: Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit yang ditandai dengan hiperglikemia disebabkan karena abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein yang disebabkan oleh penurunan sekresi insulin atau penurunan sensitivitas insulin. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kombinasi ekstrak etanol herba sambiloto dan daun sambung nyawa yang lebih efektif menurunkan kadar glukosa darah, kadar LPO dan kadar GSH pada tikus yang di induksi aloksan dibandingkan dengan pemberian secara tunggal. Penelitian ini menggunakan penelitian pre dan post randomized controlled group design. Hewan uji sebanyak 40 ekor yang dibagi menjadi 8 kelompok yaitu: normal, negatif (CMC-Na), positif (glibenklamid dosis 1,26 mg/kgBB), sambiloto dosis 20,5 mg/kgBB (SA 100), sambung nyawa dosis 140 mg/kgBB (SN 100), SASN 75:25, SASN 50:50 dan SASN 25:75. Kelompok hewan uji, kecuali kelompok normal diinduksi aloksan dosis 160 mg/kgBB pada hari ke-0, dilanjutkan perlakuan hewan uji dari hari ke-1 sampai hari ke-14. Dilakukan sampling darah pada hari ke-0, hari ke-7, dan hari ke-14. Selanjutnya pada hari ke-14 dilakukan pembedahan untuk mengambil hati tikus dilakukan analisa antioksidan. Data yang diperoleh berupa kadar gula darah pada hari ke-0, hari ke-7, dan hari ke-14 diukur menggunakan metode GOD-PAP. Data yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA dengan ($\alpha=0,05$) untuk dosis optimal kombinasi ekstrak etanol herba sambiloto dan daun sambung nyawa yaitu SASN 50:50 dapat menurunkan kadar glukosa darah sebesar 42,86159%, menurunkan kadar LPO sebesar 0,01666 $\mu\text{M/g}$, meningkatkan kadar GSH 2,5066 Mm free SH. Kombinasi ekstrak etanol herba sambiloto dan daun sambung nyawa lebih efektif menurunkan kadar glukosa darah dibandingkan dengan pemberian secara tunggal.

Kata kunci : Antidiabetes, Antioksidan, Herba Sambiloto, Daun Sambung Nyawa

I. PENDAHULUAN

Diabetes melitus merupakan gangguan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia yang berhubungan dengan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein yang disebabkan oleh penurunan sekresi insulin atau penurunan sensitivitas insulin (DiPiro *et al*, 2005). Diperkirakan prevalensi akan meningkat

dua kali lipat dari 8,4 juta pada tahun 2000 menjadi 21,3 juta pada tahun 2030 (Soegondo, 2007).

Hiperglikemik meningkatkan senyawa *reaktive oxygen species* (ROS) baik melalui proses enzimatik atau non enzimatik (Suastuti *et al.*, 2015). Stess oksidatif merupakan ketidakseimbangan antar radikal bebas (pro

oksidan) dan antioksidan yang dipicu karena kekurangan atau kelebihan produksi radikal bebas. Radikal bebas dapat menjadi faktor penyebab berbagai macam penyakit misalnya, kanker, jantung koroner, arterosklerosis, dan penuaan dini. Tingginya kadar glukosa di dalam tubuh juga menjadi faktor meningkatnya radikal bebas didalam tubuh. Oleh sebab itu tubuh kita memerlukan suatu substansi penting, yakni antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas dan meredam dampak negatifnya (Winarsih, 2003).

Antioksidan merupakan senyawa yang mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya dengan cuma-cuma kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu sama sekali fungsinya dan dapat memutus reaksi bebas radikal bebas (Kumalaningsih, 2007). Antioksidan alami yang terkandung di dalam tumbuhan umumnya merupakan senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, tununan asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan asam-asam polifungsional (Markham, 1998)

Obat yang sering dikonsumsi masyarakat untuk terapi Diabetes yaitu glibenklamid golongan sulfonilurea. Mekanisme kerja glibenklamid yaitu dengan merangsang sekresi hormone insulin dari granula sel β pankreas. Glibenklamid akan mencapai kadar optimal pada plasma apabila diminum 30 menit sebelum makan (Suherman, 2007).

Tanaman sambiloto merupakan tanaman yang dapat digunakan sebagai antidiabetes. Kandungan sambiloto meliputi deoksiandrografolid, andrografolid, neoandrografolid, 12 didehidroandrografolid, dan homoandrografolid (Hariana, 2006). Kandungan andrografolid, zat utama yang bertanggung jawab terhadap aktivitas farmakologi (Widyawati, 2007; Niranjan *et al.*, 2010) dan berkhasiat sebagai antidiabetes. Menurut Koul dan Kapril (1994) kandungan senyawa terpenen yaitu andrographolide, andrographiside dan neoandrographolide dapat menurunkan peroksidasi lipid.

Penelitian terhadap penurunan kadar gula darah secara dosis tunggal pernah dilakukan oleh Rosnaeni *et al.*, (2010). Hasil penelitian menunjukkan ekstrak etanol daun sambiloto dosis 20,5 mg/kgBB tikus berefek menurunkan kadar gula darah.

Daun sambung nyawa merupakan tanaman yang dapat digunakan sebagai antidiabetes. Kandungan kimia daun sambung nyawa meliputi flavonoid, saponin, tannin, dan terpenoid (Akowuah *et al.*, 2002). Menurut (Wahyuningsih, 2004) senyawa yang terkandung dalam sambung nyawa mempunyai aktivitas dalam menangkap radikal bebas, yang dapat digunakan sebagai antioksidan.

Pada penelitian ekstrak daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*) terhadap penurunan kadar gula darah secara dosis tunggal pernah dilakukan oleh Sofia *et al.*, (2011). Hasil penelitian menunjukkan ekstrak etanol daun sambung nyawa dosis 140 mg/kgBB tikus berefek menurunkan kadar gula darah.

II. METODE PENELITIAN

Alat dan bahan yang digunakan yaitu neraca analitik (Precisa), penangas air (Memmert), vacuum rotary evaporator (Heidolph) dan alat-alat gelas lainnya (Pyrex), spuit injeksi, spuit oral, incubator, oven, fotometer, spektrofotometer UV, ependorf steril, mikropipet, sentifuge, peralatan gelas, bluetip, yellowtip. Herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) dan daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*), etanol 70%, CMC-Na, GOD-PAP, Aloksan, aqua pro injeksi, Tris HCl, HCl, NaOH, TBA, SDS, asam asetat glacial, TCA, aquadest, disodium hydrogen fosfat 0,3 M, ellman's, sodium sitrat, tikus galur wistar 100-200 gram, pakan tikus.

Herba Sambiloto dan daun sambung nyawa didapatkan dari Kabupaten Boyolali. Masing – masing sampel dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C selama 3 hari. Setelah kering, kemudian dihaluskan dengan cara diblender sampai berbentuk serbuk halus dan ditimbang sebanyak 200 gram. Sebanyak 200 gram masing-masing serbuk kering herba sambiloto dan daun sambung nyawa diekstraksi menggunakan etanol 70% dengan metode maserasi. Setelah didapatkan ekstrak etanol kemudian dipekatkan diatas rotary evaporator dan dilanjutkan menggunakan waterbath. Selanjutnya dihitung masing-masing rendemen yang diperoleh.

Metode menggunakan uji efek antidiabetes tipe II yang diinduksi aloksan pada tikus putih jantan galur wistar (100-200 gram) sebanyak 40 ekor dibagi dalam delapan kelompok. Kelompok I (normal) diberi aquades, kelompok II (kontrol negatif) diberi CMC-Na, kelompok III (kontrol positif) diberi glibenklamid, kelompok IV (SA 100) diberi dosis ekstrak etanol herba sambiloto 100%, kelompok V (SN 100) diberi dosis ekstrak etanol daun sambung nyawa 100%, kelompok VI (SASN 75:25) diberi dosis kombinasi ekstrak etanol herba sambiloto dan daun sambung nyawa dengan perbandingan 75%:25%, kelompok VII (SASN 50:50) diberi dosis kombinasi herba sambiloto dan daun sambung nyawa dengan perbandingan 50%:50% dan kelompok VIII (SASN 25:75) diberi dosis kombinasi herba sambiloto dan daun sambung nyawa dengan perbandingan 25%:75%

Semua kelompok hewan uji diinduksi dengan aloksan 160 mg/kgBB (Firmansyah *et al.*, 2015) kecuali kelompok 1 (kontrol normal) secara

intraperitoneal pada hari ke-0, dilanjutkan dengan perlakuan hewan uji dari hari ke-1 sampai hari ke-14 (Yasmiwar dkk, 2016). Pengambilan sampel darah untuk mengukur kadar glukosa darah dilakukan pada hari ke-0 (sebelum induksi aloksan), ke-7 dan ke-14. Pengambilan darah dilakukan dengan menggunakan pipa kapiler pada vena mata tikus. Sampel darah diukur menggunakan metode GOD-PAP untuk dianalisa kadar glukosa darah.

Untuk analisis aktivitas antioksidan digunakan organ liver. Organ liver di cuci dengan *ice cold normal saline*. Organ liver selanjutnya dikeringkan dan ditimbang, sebesar 10% dari jaringan ini selanjutnya dihomogenkan dan dilakukan preparasi dengan larutan 0,15M tris HCL (pH 7,4). Liver yang telah dihomogenkan ini digunakan untuk analisis LPO dan GSH.

Analisis kadar LPO berdasarkan metode yang dikembangkan oleh Ohkawa *et al.*, (1979). Jaringan liver dihomogenkan dalam 0,1 M buffer (Ph 7,4). Kadar lipid peroksidase dalam campuran ini ditentukan berdasarkan jumlah terbentuknya malondialdehyde (MDA). Sejumlah 0,2 ml liver yang telah dihomogenkan ditambah dengan 0,2 ml Sodium dodecyl sulfate (SDS) 8,1 %, 1,5 ml asam asetat 20% dan 1,5ml TBA 0,8%. Campuran dibuat sejumlah 4ml dengan menambahkan aquadest, dan dihangatkan pada suhu 95° C selama 60 menit. Setelah diinkubasi, selanjutnya diadukan dalam suhu kamar. Dengan volume yang sama tambahkan TCA 10% selanjutnya dilakukan sentrifugasi selama 10 menit pada 3000 rpm. Lapisan atas yang terbentuk selanjutnya diambil dan diukur nilai OD pada panjang gelombang 532 nm terhadap blanko yang tidak diberikan sampel. Jumlah lipid peroksidation (LPO) dinyatakan dengan sejumlah mol thiobarbituric acid reaktive substance (TBARS)/mg protein dengan menggunakan koefisien ekstingsi $1,56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Pengukuran kadar GSH dalam sampel mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Ellman *et al.*, (1959). Untuk mengukur jumlah glutathione (GSH) jaringan hati dihomogenkan dalam 0,1 M phosphate buffer (pH 7,4). Campuran yang telah dihomogenkan ini selanjutnya ditambahkan dengan TCA 10 % kemudian disentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit. Ambil 500 µl supernatant dan tambahkan dengan 2 ml disodium hydrogen phospat 0,3 M, terakhir tambahkan sejumlah 200 µl reagen Ellman's (5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) (0,4 mg/mL dalam sodium citrate 1 %). Larutan selanjutnya diukur pada 412 nm yang dibandingkan dengan blanko (Bose *et al.*, 2007).

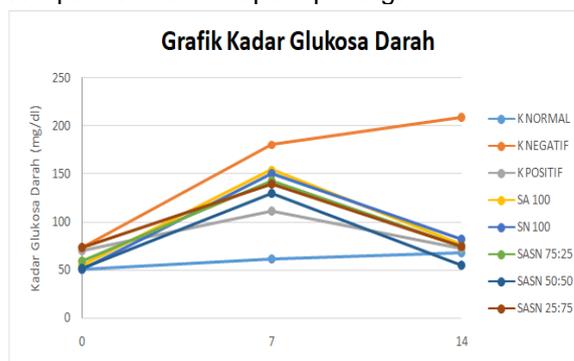
III. HASIL

Hasil determinasi terkait sampel yang digunakan diketahui bahwa herba sambiloto

tersebut benar adalah herba sambiloto dengan nama ilmiah *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees dan daun sambung nyawa tersebut benar adalah daun sambung nyawa dengan nama ilmiah *Gynura procumbens* (Lour.) Merr.

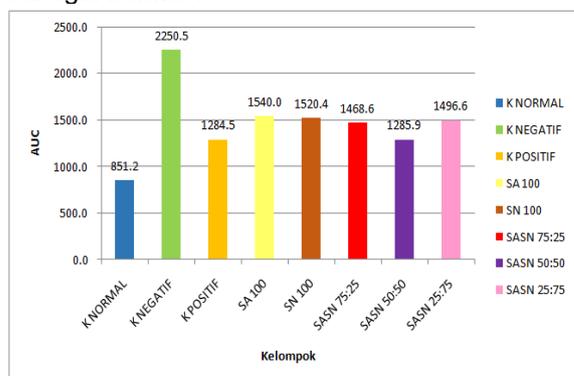
Ekstraksi herba sambiloto dan daun sambung nyawa dilakukan dengan teknik maserasi yaitu dengan cara perendaman sampel dalam larutan etanol 70% sebanyak 7,5 kali dari bobot sampel. Maserasi dilakukan selama 5 hari dengan pengadukan setiap hari.

Perlakuan pada hewan uji dilakukan selama 14 hari untuk semua kelompok. Hasil dari pengujian kadar glukosa darah dari hari ke nol sampai hari ke 14 seperti pada gambar 1



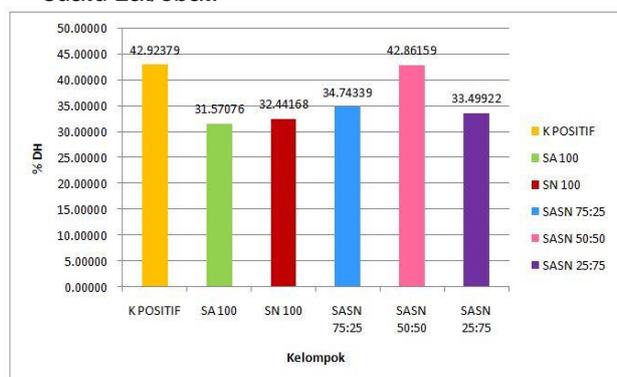
Gambar 1. Grafik kadar glukosa darah (mg/dl) hewan uji masing-masing kelompok perlakuan.

Dapat dilihat pada grafik bahwa semua kelompok mempunyai kadar gula darah yang normal pada hari ke-0 sebelum induksi aloksan. Semua kelompok mengalami kenaikan kadar glukosa darah pada hari ke-7 terutama kelompok negatif yang mengalami kenaikan terbanyak karena kelompok ini tidak diberikan perlakuan obat tetapi hanya diberikan CMC-Na yang tidak memiliki efek pengobatan. Untuk hari ke-7 sampai hari ke-14 kadar glukosa darah pada setiap kelompok mengalami penurunan kecuali untuk kelompok negatif tetapi mengalami kenaikan yang berarti pemberian aloksan dapat meningkatkan kadar gula darah. Selanjutnya data yang didapat dihitung nilai AUC, hasilnya sebagai berikut :



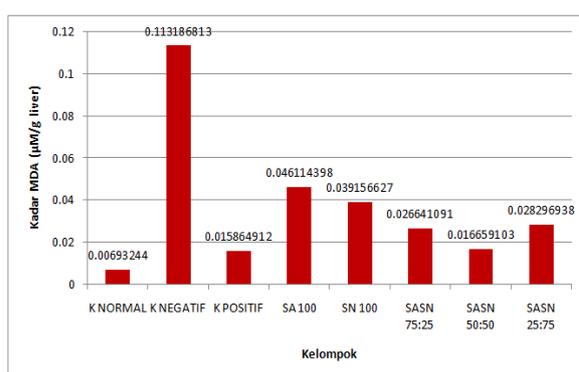
Gambar 2. Data AUC masing-masing kelompok uji setelah dilakukan perlakuan.

Dari data diatas kontrol negatif memiliki nilai AUC terbesar sedangkan kontrol positif memiliki nilai AUC terkecil. Nilai AUC menunjukkan kandungan kadar glukosa dalam darah, jika nilai AUC tinggi maka kandungan glukosa dalam darah juga besar. Nilai AUC berbanding terbalik dengan persen daya hipoglikemik (%DH) dari suatu zat/obat.



Gambar 3. Data rata-rata daya hipoglikemik (% masing-masing kelompok perlakuan.

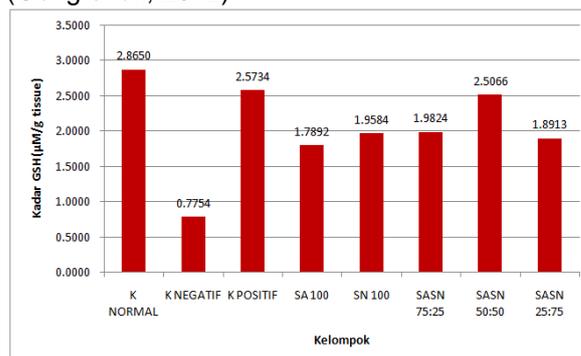
Persentase daya hipoglikemik menunjukkan adanya kemampuan untuk menurunkan kadar glukosa darah dalam suatu penelitian. Semakin besar persentase daya hipoglikemik maka semakin besar pula kemampuan untuk menurunkan glukosa darah. Dari data tersebut dapat dilihat untuk %DH yang paling tinggi baik dosis tunggal maupun kombinasi adalah kelompok SASN 50:50 sebesar 42.86%. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian kombinasi lebih efektif menurunkan kadar glukosa darah pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi aloksan dibandingkan dengan pemberian secara tunggalnya.



Gambar 4. Grafik Data Kadar Nilai LPO

Dapat dilihat bahwa pada kontrol negatif atau pada tikus yang hanya diinduksikan aloksan mempunyai grafik kadar MDA yang paling tinggi. Pada penelitian ini kontrol positif mempunyai kadar MDA yang mendekati kontrol normal yang menunjukkan bahwa pada kontrol positif ini dapat mempengaruhi penurunan kadar MDA pada tikus Diabetes melitus yang diinduksi aloksan.

Kadar Glutation (GSH) tikus diabetes yang diinduksi aloksan sebesar 0.7754 µM/g tissue ternyata lebih rendah dibandingkan tikus normal (2.8650 µM/g tissue) (Winarsi *et al.*, 2012). Moussa (2008) bahwa dalam tubuh penderita diabetes aktivitas GSH menurun. Pemberian aloksan menyebabkan nekrosis sel-sel β pankreas akibat meningkatnya stres oksidatif (Euteuk, 2010), sehingga sekresi insulin akan menurun dan mengakibatkan hiperglikemia (Gong *et al.*, 2012).



Gambar 5. Grafik Data Kadar GSH

Nilai kadar GSH adalah berbanding terbalik dengan nilai kadar LPO, yang dapat dilihat pada kontrol negatif memiliki kadar GSH yang paling rendah dibandingkan dengan semua kelompok artinya pemberian aloksan mampu menyebabkan kadar GSH pada penderita diabetes rendah.

IV. PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan sampel herba sambiloto dan daun sambung nyawa. Sambiloto dan daun sambung nyawa yang diperoleh selanjutnya dicuci dan dikeringkan. Pengeringan bertujuan untuk menurunkan kadar air dalam sampel, mencegah tumbuhnya mikroorganisme (jamur), dan menghentikan proses enzimatik yang dapat memicu pembusukan sampel sehingga simplisia dapat di simpan dalam jangka waktu yang lama. Kadar air yang baik adalah kurang dari 10% (Winarno, 1997).

Proses sortasi kering dilakukan untuk memisahkan benda asing atau zat pengotor yang masih terdapat pada simplisia kering. Kemudian dilakukan proses penyerbukan dengan menggunakan blender untuk memperbesar luas permukaan kontak antara sampel dengan pelarut atau solvent pada proses ekstraksi sehingga hasil yang didapat lebih maksimal. Semakin luas bidang kontak antara bahan dengan pelarutnya, maka dapat meningkatkan efektivitas ekstraksi. Selanjutnya ditimbang masing-masing sebanyak 200 g serbuk kering sampel untuk dilakukan proses ekstraksi.

Ekstraksi bertujuan untuk menarik senyawa metabolit sekunder dari sampel, serta menghilangkan zat-zat pengotor yang tidak dikehendaki dalam sampel. Metode ekstraksi

yang dipilih adalah maserasi karena prosesnya yang cukup sederhana, banyak digunakan serta tidak memerlukan pemanasan yang dapat merusak kandungan metabolit terutama andrografolida dan flavonoid dalam sampel. Maserasi dilakukan dengan cara peredaman sampel dalam etanol 70% sebanyak 7.5 kali selama 5 hari dengan pengadukan sekali sehari untuk menjaga agar pelarut yang digunakan tidak mengalami kejenuhan, sehingga hasil yang tersari lebih maksimal. Etanol 70% dipilih karena lebih bersifat universal untuk menarik senyawa target yang ingin diambil dari sampel yaitu andrografolid dan flavonoid. Maserat yang diperoleh pada hari ke-5 selanjutnya disaring dengan menggunakan kain flannel dan dikentalkan dengan menggunakan rotary evaporator kemudian dilanjutkan dengan waterbath hingga diperoleh ekstrak kental etanol herba sambiloto dan daun sambung nyawa.

Penelitian ini menggunakan pengujian efek diabetes melitus tipe II. Hewan uji yang digunakan tikus galur wistar 100-200 gram yang diinduksi aloksan dengan dosis 160mg/kgBB hingga kadar glukosa darah mencapai kadar glukosa darah diabetes. Sebelum perlakuan semua tikus diadaptasikan pada tempat uji selama 7 hari. Pengambilan sampel darah untuk mengukur kadar glukosa darah dilakukan pada hari ke-0 (sebelum induksi aloksan), ke-7 dan ke-14. Pengukuran kadar glukosa darah menggunakan metode GOD-PAP. Prinsip pemeriksaan dalam metode ini adalah glucose oxidase mengkatalisis reaksi oksidasi glukosa menjadi asam glukonat dan hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida yang terbentuk bereaksi dengan phenol dan 4-amino phenazone dengan bantuan enzim peroksidase menghasilkan quinoneimine yang berwarna merah muda dan dapat diukur dengan panjang gelombang 546 nm. Intensitas warna yang terbentuk setara dengan kadar glukosa darah yang terdapat dalam sampel (Baroroh *et al*, 2011).

Dapat dilihat kelompok positif yang diberi glibenklamid pada gambar 1 dimana hari ke-0 memiliki kadar gula darah normal yang meningkat pada hari ke-7 kemudian menurun pada hari ke-14. Artinya pemberian glibenklamid dapat menurunkan kadar gula darah dengan mekanisme kerja glibenklamid yaitu merangsang sekresi hormon insulin dari ganul sel-sel β Langerhans pankreas. Interaksinya dengan *ATP-sensitive K channel* pada membran sel – sel β menimbulkan depolarisasi membran dan keadaan ini akan membuka kanal Ca. Dengan terbentuknya kanal Ca, maka ion Ca^{2+} akan masuk ke dalam sel β kemudian merangsang granula yang berisi insulin dan akan terjadi sekresi insulin.

Dari Gambar 2 menunjukkan besarnya AUC yang berbeda-beda selama 14 hari karena pengaruh perlakuan yang berbeda pada setiap kelompok. Dari data diatas kontrol negatif memiliki nilai AUC terbesar sedangkan kontrol positif menunjukkan nilai AUC terkecil. Nilai AUC menunjukkan kandungan kadar glukosa dalam darah, jika nilai AUC tinggi maka kandungan glukosa dalam darah juga besar. Nilai AUC berbanding terbalik dengan persen daya hipoglikemik dari suatu zat/obat. Semakin kecil nilai AUC, maka semakin besar persen daya hipoglikemia suatu obat.

Persentase daya hipoglikemik menunjukkan adanya kemampuan untuk menurunkan kadar glukosa darah dalam suatu penelitian. Semakin besar persentase daya hipoglikemik maka semakin besar pula kemampuan untuk menurunkan glukosa darah. Dapat dilihat kelompok positif pada gambar 3 menunjukkan nilai %DH yang paling tinggi yaitu sebesar 42.92 %. Dari kelima kelompok baik tunggal maupun kombinasi pada kombinasi 50:50 memiliki %DH paling tinggi yaitu sebesar 42.86% mendekati dengan %DH kontrol positif, disusul dengan kelompok SASN 75:25 sebesar 34.74%, kemudian kelompok SASN 25:75 sebesar 33.50%, kelompok SN 100 sebesar 32.44%, dan yang terakhir kelompok SA 100 sebesar 42.92%.

Persentase daya hipoglikemik yang didapat kemudian dianalisis secara statistika dengan menggunakan ANNOVA dimana jika $p < 0,05$ artinya terdapat perbedaan antar kelompok uji dan hasil didapatkan adalah $p < 0,05$. Untuk mengetahui kelompok mana saja yang memiliki perbedaan maka dianalisis menggunakan Post Hoc Test. Dikatakan berbeda signifikan jika nilai p pada post hoc test adalah $< 0,05$. Pada tabel statistic dapat dilihat bahwa nilai signifikan kelompok positif dibandingkan dengan dosis tunggal memiliki nilai $p < 0,05$ artinya antara kontrol positif dengan dosis tunggal memiliki perbedaan yang signifikan. Sedangkan kontrol positif dibandingkan dengan kombinasi diperoleh nilai signifikan $p > 0,05$ artinya antara kontrol positif dengan kelompok kombinasi memiliki perbedaan yang tidak signifikan, namun kelompok pada kombinasi 50:50 memiliki nilai p yang paling tinggi sebesar 0.989 yang artinya perbedaan aktivitas antidiabetes yang tidak signifikan diantara kedua kelompok ini. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa pemberian kombinasi ekstrak daun stevia dan daun sambiloto lebih efektif menurunkan kadar glukosa darah dibandingkan dengan pemberian secara tunggal dengan dosis optimal kombinasi SASN 50:50.

Sambiloto mengandung zat aktif andrografolid yang dapat menurunkan kadar glukosa darah. Dari uraian ini dinyatakan ada mekanisme kerja

sebagai anti diabetes. Ada beberapa dugaan mekanisme kerja sambiloto menghambat glukoneogenesis (Zhang X.F *et al*, 2000) menghambat alfa glukosidase di usus (Borhanuddin M, 1994; Husen dkk, 2004).

Ekstrak etanol daun sambung nyawa juga mengandung senyawa *flavonoid* yang bersifat sebagai antioksidan yang dapat menekan aktivitas radikal bebas. Flavonoid bekerja dengan cara menghambat enzim *alfa amylase* dan *alfa glukosidase* yang berfungsi menguraikan karbohidrat menjadi monosakarida yang dapat diserap oleh usus. Penghambatan pada kedua enzim ini mengakibatkan terganggunya proses pemecahan karbohidrat menjadi monosakarida sehingga tidak dapat diserap oleh usus. Dengan demikian, kadar gula darah tidak meningkat setelah mengonsumsi makanan atau minuman yang mengandung gula atau senyawa yang dapat dipecah menjadi gula (Sofia *et al*, 2011).

Lipid peroksidase merupakan suatu proses terjadinya oksidasi lipid oleh radikal bebas yang menyebabkan kerusakan membran yang mengandung lipid. Pembentukan lipid peroksida pada PUFA akan mendorong pembentukan Malondialdehid (MDA) sebagai produk dari reaksi peroksidase tersebut. Terbentuknya MDA merupakan indikator utama yang dapat digunakan untuk analisis terjadinya lipid peroksidase. Kadar lipid peroksidase dapat diukur dengan metode asam tiobarbiturat (TBA) yang mengukur adanya MDA. Prinsip pengukuran metode ini adalah TBA akan bereaksi dengan gugus karbonil dari MDA yaitu satu molekul MDA akan berikatan dengan dua molekul TBA sehingga membentuk senyawa kompleks berwarna merah yang kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532nm. Naiknya *thiobarbituroic acid reactive substance* (TBARS) atau nilai MDA mengindikasikan terjadinya kerusakan terutama pada bagian membran sel yang diakibatkan oleh adanya radikal bebas.

Dapat dilihat baik pada tabel maupun grafik kadar MDA menunjukkan bahwa pada kelompok negatif memiliki kadar yang paling tinggi dibandingkan dengan semua kelompok yang artinya pemberian aloksan mampu menyebabkan kerusakan liver yang ditandai dengan tingginya kadar lipidperoksidase. Glibenklamid sebagai kontrol positif mampu mencegah kerusakan liver yang ditandai dengan rendahnya kadar lipidperoksidase. Dari data diatas juga dapat dikatakan bahwa pemberian dosis baik tunggal maupun kombinasi mampu menurunkan kadar lipid peroksidase

Untuk mengetahui apakah antara kontrol positif dan perlakuan mempunyai efektifitas yang sama dalam memperbaiki kerusakan hati yang dikarenakan stress oksidatif yang disebabkan

karena terbentuknya radikal bebas pada kondisi hiperglikemia maka dilakukan perbandingan hasil analisis antara kontrol positif dengan semua perlakuan menggunakan statistic. Dapat dilihat pada tabel III menunjukkan perbandingan antara kontrol positif dan perlakuan dosis tunggal didapatkan hasil $p < 0,05$ yang artinya hasil kadar pada kontrol positif dengan dosis tunggal memiliki perbedaan yang signifikan. Sedangkan untuk dosis kombinasi didapatkan nilai $p > 0,05$ yang artinya hasil kadar antara kontrol positif dengan kombinasi memiliki perbedaan yang tidak signifikan. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa pemberian kombinasi lebih efektif dalam menurunkan kadar lipid peroksidase dibandingkan dengan pemberian secara tunggal.

Pemberian aloksan menyebabkan nekrosis sel-sel β pankreas yang mengakibatkan meningkatnya stres oksidatif, sehingga sekresi insulin akan menurun dan mengakibatkan hiperglikemia. Keadaan stress oksidatif ini dapat ditandai dengan rendahnya kadar GSH (Glutation) dan tingginya kadar LPO. Dibuktikan dengan hasil kadar GSH pada tabel dan grafik kontrol negative memiliki kadar terendah artinya pemberian aloksan mampu menyebabkan kondisi stress oksidatif. Pada kontrol positif memiliki kadar GSH yang paling tinggi yang artinya Glibenklamid mampu memperbaiki keadaan stress oksidatif akibat hiperglikemi. Untuk dosis tunggal dan kombinasi juga dapat dilihat pada data kadar bahwa baik tunggal maupun kombinasi mampu memperbaiki keadaan stress oksidatif

Dari data tersebut diolah menggunakan statistic metode ANNOVA dengan hasil pada tabel V bahwa pada kontrol positif dibandingkan dengan semua kelompok memiliki nilai $p > 0,05$ artinya antara kontrol positif dengan kelompok lain memiliki kadar GSH yang berbeda tidak signifikan. Namun nilai p yang diperoleh pada kelompok kombinasi memiliki nilai p yang lebih besar dari kelompok normal, dimana nilai p yang paling besar ada pada kombinasi SASN 50:50. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian kombinasi lebih efektif dalam memperbaiki kadar GSH dibandingkan dengan dosis tunggal serta dosis optimal kombinasi yang disarankan adalah kombinasi 50:50.

V. SIMPULAN

Pemberian kombinasi ekstrak etanol herba sambiloto dan daun sambung nyawa lebih efektif dapat menurunkan kadar glukosa darah pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi aloksan daripada pemberian secara tunggal. Dosis optimal dari kombinasi ekstrak etanol herba sambiloto dan daun sambung nyawa yang dapat menurunkan kadar glukosa darah tikus diabetes melitus yang diinduksi aloksan yaitu 50% : 50% setara dengan dosis 10,25 mg/KgBB ekstrak

herba sambiloto dan 70 mg/kgBB ekstrak daun sambung nyawa.

DAFTAR PUSTAKA

- Akowuah, G.A., Zhari, I., Norhayati, I., Sadikun, A., dan Khamsah, S.M., 2004. Sinsensetin, euphatorin, 3'-hydroxi-5,6,7,4'-tetramethoxyflavone and rosmarintic acid contents and antioxidative effect of orthosiphon stamineus from Malaysia. *J. Food Chem.*, 87:559-566.
- Borhanuddin, M., Shamsuzzoha, M. dan Hussain, A. H. .1994. *Hypoglycaemic effects of Andrographis paniculata Nees on non-diabetic rabbits*. Bangladesh Med Res Counc Bull, 20, 24-6.
- Firmansyah, D., Saiful Bachri, M., Nurkhasanah, 2015, Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Dan Kloroform Daun Sirsak Terhadap Kolesterol Total Dan Trigliserida Pada Tikus Yang Diinduksi Aloksan. *Jurnal Penelitian*. Yogyakarta : UAD
- Gong F, Fenglin L, Wanming Z, Jing L, Zhong Z. 2012. Effects of crude flavonoids from Tatar buckwheat on Alloxan induced oxidative stress in mice. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 7:124–130.
- Kumalaningsih, S, 2007, Konsentrasi Gula dan Tapioka Terhadap Penerimaan Gel Cincau Hitam Manis Dalam Kemasan, *Skripsi*, THP-FTP, Malang: Universitas Brawijaya.
- Markham, K. R., 1988, Cara Mengidentifikasi Flavonoid. Terjemahan K. Padmawinata. Penerbit ITB : Bandung. Eutuk EU. 2010. Animals models for studying Diabetes melitus. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 1(2):130– 134.
- Moussa SA. 2008. Oxidative stress in Diabetes melitus. *Romanian Journal Biophysic*. 18(3):225–236.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K, 1979, Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 95: 351-358.
- Rosnaeni, Hana R, dan Sarah K. 2010. Efek Ekstrak Etanol Daun Sambiloto (*Andrographis folium*) Terhadap Kadar Glukosa Darah Mencit Jantan Galur Swiss Webster yang Diinduksi Aloksan dan Perbandingannya Terhadap Jamu D. *Jurnal Medika Plant*. Bandung : Universitas Kristen Maranatha
- Sofia, dkk. 2011. *Uji in Vivo Ekstrak Etanol Daun Sambung Nyawa (Gynura procumbens) Terhadap Penurunan Kadar Gula Darah Mencit (Mus musculus) Jantan Strain Swiss Webster Diabetes melitus*. Aceh : UNSIYAH
- Soegondo, S, 2007, *Diabetes, The silent Killer*. www.medicastore.com. Tanggal Akses 9 Februari 2010.
- Suastuti, 2014. *Pengaruh Ekstrak Etanol Buah Ketumbar (Cor sativum L.) Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Tikus Putih yang Diinduksi Aloksan*. Manado : FMIPA UNSTRAT.
- Suherman, K.S, 2007, *Adrenokortikotropin, Adrenokortikosteroid, Analog Sintetik dan Antagonisnya, Dalam Farmakologi dan Terapi Edisi kelima*, Jakarta: Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Widyawati, T. 2007 "Aspek Farmakologi Sambiloto (*Andrographis paniculata Nees*) ." *Majalah Kedokteran Nusantara* Volume 40 Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.
- Winarsi H, 2007, *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius : Yogyakarta.
- Yasmiwar S, Ahmad Muhtadi, Moelyono Moektiwardoyo, Putri Churnia Arifin 2016. Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Etanol Daun Iler (*Plectranthus scutellarioide* (L)) Pada Tikus Putih Galur Wistar Dengan Metode Induksi Aloksan. *Jurnal Farmaka* Vol 14. 2 Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran. Sumedang
- Zhang, X. F. & Tan, B. K. 2000. Anti-diabetic property of ethanolic extract of *Andrographis paniculata* in streptozotocin-diabetic rats. *Acta Pharmacol Sin*, 21, 1157-64.