

HASIL PENELITIAN

5.1. Hasil uji pendahuluan

Uji pendahuluan pada penelitian ini ada 2 macam, meliputi penentuan waktu yang diperlukan untuk hewan uji mencapai DM setelah diinduksi STZ ip dosis 40 mg/kgBB, dan penentuan dosis EEDS untuk menurunkan kadar gula darah sewaktu (GDS) .

5.1.1. Penentuan waktu hewan coba mencapai DM setelah induksi STZ

Kriteria hewan coba mencapai DM adalah apabila kadar GDS \geq 200 mg/dl. Pada uji pendahuluan digunakan 4 ekor tikus *Sprague dawley* jantan usia 2 bulan sebagai hewan coba dan dibagi menjadi 2 kelompok yaitu 2 ekor hewan coba dipuasakan 10-12 jam dan 2 ekor hewan coba tidak dipuasakan sebelum diinduksi dengan STZ 40 mg/kgBB. Selanjutnya hewan coba diukur kadar GDS pada hari ke-2 (48 jam), ke-4 (96 jam) dan ke-6 (144 jam) setelah diinduksi STZ.

Tabel 3 Kadar gula darah sewaktu (GDS) pada uji pendahuluan

NO	KETERANGAN	GDS PRE STZ (mg/dl)	GDS POST STZ		
			GDS 48 JAM (mg/dl)	GDS 96 JAM (mg/dl)	GDS 144 JAM (mg/dl)
1	Tikus Puasa 1	-	258	494	359
2	Tikus Puasa 2	-	422	355	520
3	Tikus Non Puasa 1	133	445	349	405
4	Tikus Non Puasa 2	147	378	575	409

Tabel 3 menunjukkan kadar GDS setelah hewan coba diinduksi dengan STZ 40 mg/kgBB secara ip. Pada 48 jam setelah induksi sudah terlihat adanya peningkatan GDS dan mencapai lebih dari 200 mg/dl baik untuk hewan uji yang dipuaskan maupun yang tidak dipuaskan. GDS stabil mencapai lebih dari 200 mg/dl pada 96 jam dan 144 jam setelah induksi STZ. Berdasarkan data ini, selanjutnya pada penelitian ini ditentukan waktu 4 hari (96 jam) setelah induksi STZ hewan coba sudah mencapai DM.

5.1.2. Penentuan dosis EEDS

Pada uji pendahuluan untuk menentukan dosis EEDS hewan coba diinduksi dengan STZ 40 mg/kgBB yang setelah mencapai DM (4 hari setelah induksi STZ) diukur kadar GDS dan dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol yang tidak diberi EEDS dan 3 kelompok perlakuan yang diberi EEDS per oral. Dosis EEDS yang digunakan mengacu pada dosis EEDS pada mencit yang berhasil menurunkan kadar glukosa darah. Berdasarkan perhitungan dengan faktor konversi dosis dari mencit ke tikus, maka pada uji pendahuluan ini dipakai 3 macam dosis untuk 3 kelompok perlakuan yaitu dosis 18,1 mg/200 grBB (kelompok P1), 36,2 mg/ 200 grBB (kelompok P2) dan 72,4 mg/200 grBB (kelompok P3). EEDS yang digunakan berasal dari maserasi serbuk daun salam 455,10 gram dalam 6500 ml etanol 70%. EEDS diberikan secara per oral pada kelompok perlakuan selama 15 hari, dan pada hari ke 16 diukur kadar GDS pada semua hewan coba.

Tabel 4 Kadar GDS pada penentuan dosis EEDS

Kelompok	GDS Pre EEDS (gr/dl)	GDS Post EEDS (gr/dl)
Kontrol	493,0 ± 116,21	508,0 ± 117,37
P1	481,8 ± 72,22	540,4 ± 149,63
P2	518,2 ± 58,32	524,5 ± 105,05
P3	540,8 ± 44,20	553,2 ± 106,0

Data kadar GDS sebelum pemberian EEDS dan setelah pemberian EEDS pada tabel 4 menunjukkan bahwa pada dosis tersebut EEDS belum dapat menurunkan kadar GDS pada semua kelompok perlakuan, sehingga untuk penelitian ini jumlah EEDS yang diberikan harus ditingkatkan dengan cara dibuat EEDS dengan konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 700 gram serbuk daun salam kering dalam 4500 ml etanol 70% dan dosis ditingkatkan menjadi 2 kali dari dosis uji pendahuluan. Berdasarkan hasil uji pendahuluan yang disajikan pada tabel 4 maka pada penelitian ini dosis EEDS yang dipakai adalah 150 mg/ 200 grBB, 300 mg/ 200 grBB dan 450 mg/ 200 grBB.

5.2. Hasil penelitian

5.2.1. Identifikasi zat bioaktif yang terkandung dalam EEDS

Dilakukan identifikasi zat bioaktif dan uji aktifitas antioksidan terhadap EEDS yang akan diberikan pada hewan coba. Hasil analisis kualitatif senyawa kimia dari EEDS ditunjukkan pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil identifikasi zat bioaktif dalam EEDS

Parameter pengujian	Hasil Pengujian
Alkaloid	Positif
Saponin	Positif
Quinon	Positif
Fenolik	Positif
Triterpenoid	Positif
Steroid	Positif
Flavonoid	Positif

Hasil uji aktifitas antioksidan dengan metode difenilpikril hidrasil (DPPH) pada ekstrak etanol daun salam yaitu $IC_{50} = 89.627$, konsentrasi senyawa antioksidan yang terkandung dalam daun salam menyebabkan lebih dari 50% DPPH mengalami penurunan karakter radikal bebas lebih besar dari vitamin C yaitu $IC_{50} = 7.587$.

5.2.2. Karakteristik kadar GDS, berat badan, HbA1c dan Hb dari sampel penelitian

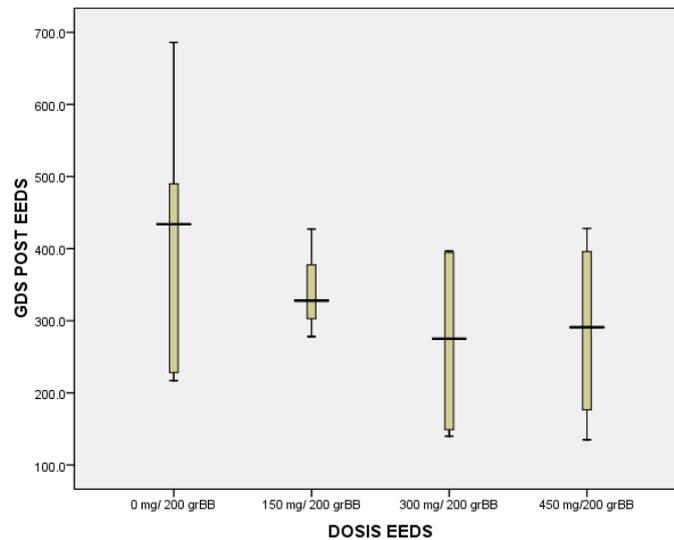
Penelitian ini menggunakan hewan coba 20 ekor tikus Sprague dawley jantan usia 1,5 sd 3 bulan berat badan 50 sampai dengan 200 gram yang diinduksi STZ 40 mg/kgBB ip dan pada hari ke 4 setelah induksi diukur kadar GDS (GDS pre EEDS). Hewan coba dibagi menjadi 4 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol tanpa pemberian EEDS dan 3 kelompok perlakuan dengan pemberian EEDS

dengan dosis 150 mg/ 200grBB, 300 mg/ 200grBB dan 450 mg/200 grBB. Tiap kelompok terdiri dari 5 ekor hewan coba. Pemberian EEDS dilakukan per oral selama 15 hari. Pada hari ke 16 diukur kadar GDS, HbA1c dan Hb. Selama penelitian berjalan beberapa hewan coba *drop out* karena mati, yaitu pada kelompok P1 sebanyak 2 ekor, kelompok P2 sebanyak 1 ekor dan kelompok P3 sebanyak 1 ekor. Sehingga pada akhir penelitian data yang terkumpul diperoleh dari 16 ekor hewan coba yang terdiri 5 ekor hewan coba pada kelompok kontrol, 3 ekor pada kelompok P1, 4 ekor pada kelompok P2 dan 4 ekor pada kelompok P3.

Tabel 6. Kadar GDS dan berat badan tikus DM sebelum dan sesudah pemberian EEDS

Kelompok	Pre EEDS		Post EEDS	
	GDS (gr/dl)	BB (gr)	GDS (gr/dl)	BB (gr)
Kontrol	344,4 ± 112,05	119,8 ± 40,3	411,0 ± 195,90	133,0 ± 29,7
P1	360,0 ± 171,02	98,7 ± 40,0	344,3 ± 75,83	125,3 ± 14,3
P2	356,5 ± 155,97	120,6 ± 71,4	271,8 ± 141,94	119,6 ± 26,3
P3	369,0 ± 112,90	98,5 ± 49,8	286,2 ± 133,75	129,4 ± 31,7

Tabel 6 menunjukkan bahwa GDS meningkat pada kelompok kontrol dan setelah pemberian EEDS selama 15 hari kadar GDS mengalami penurunan pada semua kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3). Penurunan GDS kelompok perlakuan ini menunjukkan efek hipoglikemik dari EEDS. Kelompok P2 dengan pemberian EEDS dosis 300 mg/ 200 grBB mengalami penurunan GDS paling besar dibanding kelompok P1 (dosis EEDS 150mg/ 200 grBB) dan kelompok P3 (dosis EEDS 450 mg/200 grBB). Hal ini dapat dilihat dari nilai median GDS yang tampak pada grafik *boxplot* pada gambar 9 .



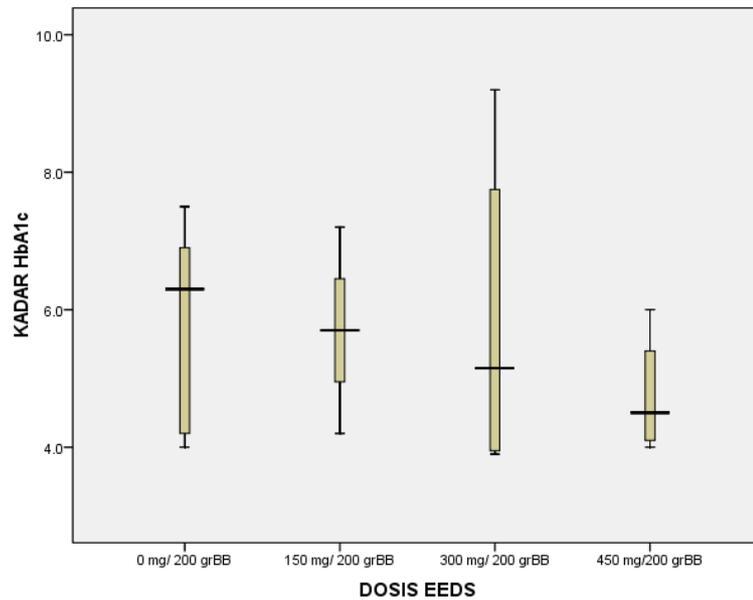
Gambar 9. Grafik *boxplot* kadar GDS setelah pemberian EEDS

Gambar 9 menunjukkan bahwa nilai median kadar GDS setelah pemberian EEDS pada kelompok P2 (dosis EEDS 300 mg/200 grBB) lebih rendah dibanding kelompok P1 dan P2. Nilai median kadar GDS kelompok kontrol lebih tinggi dibanding semua kelompok perlakuan.

Tabel 7 menunjukkan data rerata kadar HbA1c dan Hb pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan 15 hari setelah pemberian EEDS. Grafik *boxplot* untuk kadar HbA1c pada tiap kelompok ditampilkan pada gambar 10.

Tabel 7. Kadar HbA1c dan Hb

Kelompok	HbA1c (%)	Hb (gr/dl)
Kontrol	5,8 ± 1,6	12,9 ± 2,4
P1	5,7 ± 1,5	12,4 ± 3,7
P2	5,9 ± 2,5	13,1 ± 2,7
P3	4,8 ± 0,9	11,6 ± 2,6

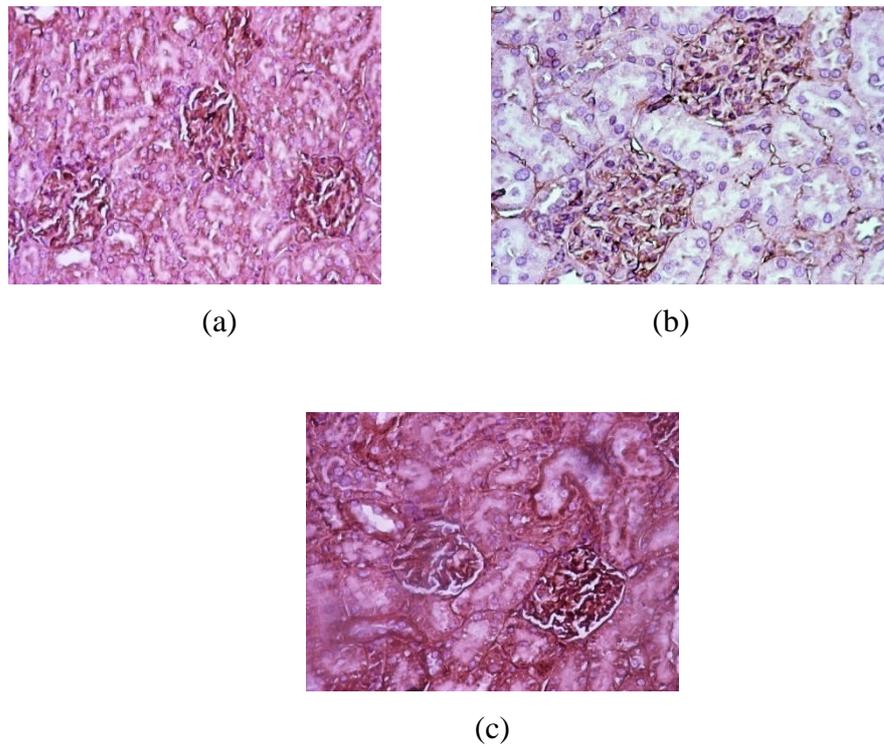


Gambar 10. Grafik *boxplot* kadar HbA1c setelah pemberian EEDS

Pada gambar 10 terlihat bahwa nilai median kadar HbA1c kelompok kontrol paling tinggi dan pada kelompok perlakuan nilai median kadar HbA1c semakin turun pada kelompok dengan dosis EEDS yang semakin besar.

5.2.3. Ekspresi kolagen mesangial glomerulus

Ekspresi kolagen mesangial dinyatakan dalam *Allred score* yang merupakan penjumlahan dari *proportion score* dan *intensity score*. Gambar 10 menunjukkan foto ekspresi kolagen mesangial pada tikus DM kelompok kontrol.



Gambar 11. Foto ekspresi kolagen mesangial tikus DM.kelompok kontrol
 (a) *Allred score* =7 (*PS*=4, *IS*=3); (b) *Allred score* = 3 (*PS*=2, *IS*=1),;
 (c) *Allred score*=6 (*PS*=3, *IS*=3)

Tabel 8. Data *proportion score*, *intensity score* dan *Allred score* ekspresi kolagen mesangial

Kelompok	<i>Proportion Score</i>	<i>Intensity score</i>	<i>Allred Score</i>
Kontrol	3,4 ± 0,55	2,40 ± 0,55	6,2 ± 0,84
P1	3,33 ± 0,58	1,67 ± 0,58	4,7 ± 0,56
P2	2,50 ± 0,56	1,50 ± 0,58	4,0 ± 1,16
P3	2,75 ± 0,50	2,25 ± 0,50	5,3 ± 0,50

Tabel 8 menunjukkan data rerata *proportion score*, *intensity score* dan *Allred score* dari ekspresi kolagen mesangial glomerulus kelompok control dan kelompok perlakuan. Data *allred score* diperoleh dari hasil pembacaan proporsi

dan intensitas tiap presparat oleh 2 pembaca yang telah dilakukan uji reliabilitas dengan *Cronbachs* $\alpha = 0,88$ ($>0,497/ R$ tabel) yang berarti ada kesesuaian yang sangat baik antara 2 pembaca.

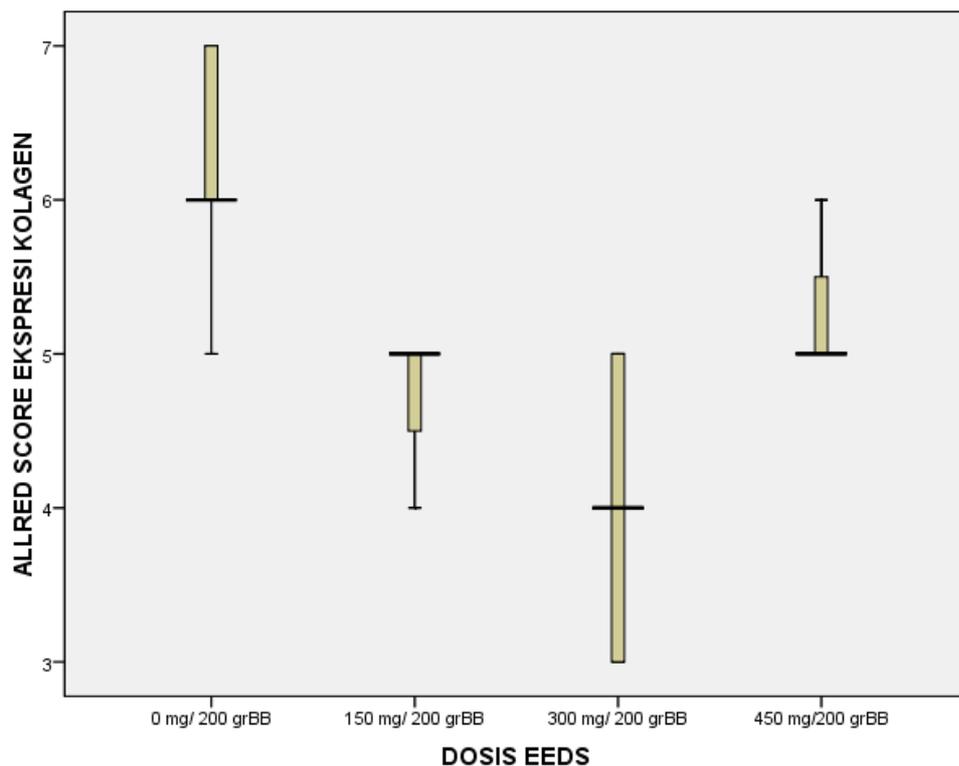
Tabel 9. Hasil uji beda *proportion score* ekspresi kolagen mesangial

<i>p value</i>				
	K	P1	P2	P3
K	-	0,04*	0,02*	0,02*
P1	0,04*	-	0,18	1,00
P2	0,02*	0,18	-	0,13
P3	0,02*	1,00	0,13	-

Hasil uji nonparametrik *Kruskall wallis* terhadap *proportion score* menghasilkan $p=0,015$ ($p<0,05$) yang berarti ada perbedaan PS yang bermakna pada 4 kelompok penelitian. Hasil uji *Mann Whitney* terhadap kelompok Kontrol dan perlakuan seperti ditunjukkan pada tabel 9 menghasilkan $p<0,05$ yang menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, di mana *proportion score* kelompok perlakuan lebih rendah dibanding kelompok kontrol. Pemberian EEDS dosis 150, 300 dan 450 mg/ 200 grBB dapat menurunkan *proportion score* ekspresi kolagen mesangial.

Hasil uji nonparametrik *Kruskall wallis* terhadap *intensity score* ekspresi kolagen mesangial menghasilkan $p=0,11$ ($p>0,05$) yang berarti tidak ada perbedaan *intensity score* yang bermakna pada 4 kelompok penelitian.

Variasi nilai median dari *Allred score* ekspresi kolagen terlihat pada grafik *boxplot* pada gambar 10. Pada kelompok K diperoleh nilai median yang yang paling tinggi dan pada kelompok P2 diperoleh nilai median paling rendah..



Gambar 12. Grafik *boxplot* *Allred score* ekspresi kolagen mesangial

Dilakukan uji non parametrik *Kruskal-Wallis* untuk menguji perbedaan skor ekspresi kolagen mesangial pada 4 kelompok penelitian. Uji beda ini menghasilkan $p = 0,027$ ($p < 0,05$) yang menunjukkan terdapat perbedaan skor ekspresi kolagen yang bermakna antar kelompok sehingga dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

Tabel 10 menunjukkan hasil uji beda yang bermakna dari skor ekspresi kolagen kelompok K dan P2 dengan nilai $p < 0,05$ ($p = 0,032$). Pemberian EEDS

dosis 300 mg/ 200 grBB menghasilkan skor ekspresi kolagen yang lebih rendah dibanding kelompok kontrol yang tidak diberi EEDS.

Tabel 9. Hasil uji beda *Allred score* ekspresi kolagen mesangial

<i>p value</i>				
	K	P1	P2	P3
K	-	0,07	0,03*	0,11
P1	0,07	-	0,63	0,40
P2	0,03*	0,63	-	0,20
P3	0,11	0,40	0,20	-

Berdasarkan hasil uji statistik terhadap *proportion score* dan *intensity score* dan *Allred Score* terlihat bahwa peningkatan ekspresi kolagen pada tikus DM lebih ditentukan oleh peningkatan proporsi dibanding intensitasnya. Pemberian EEDS dosis 300 mg/200 grBB mampu menurunkan ekspresi kolagen mesangial tikus DM.