

**POTENSI EKSTRAK BEKATUL (*Rice bran*) TERHADAP AKTIVITAS
SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) MENCIT (*Mus musculus*) DIABETES**

SKRIPSI

Oleh:

**MAR'ATUS SHOLEHA
NIM. 14630021**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019**

**POTENSI EKSTRAK BEKATUL (*Rice bran*) TERHADAP AKTIVITAS
SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) MENCIT (*Mus musculus*) DIABETES**

SKRIPSI

Oleh:
MAR'ATUS SHOLEHA
NIM. 14630021

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019


**POTENSI EKSTRAK BEKATUL (*Rice bran*) TERHADAP AKTIVITAS
SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) MENCIT (*Mus musculus*) DIABETES**

SKRIPSI

Oleh:
MAR'ATUS SHOLEHA
NIM. 14630021

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 08 Januari 2019

Pembimbing I


Diana Candra Dewi, M. Si
NIP. 19770720 200312 2 001

Pembimbing II


Nur Aini, M. Si
NIDT. 19840608 20160801 2 070

Mengetahui,
Ketua Jurusan



Elok Kamillah Hayati, M. Si
NIP. 19790620 200604 2 002

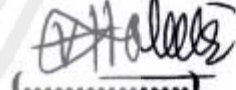
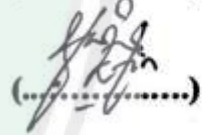
**POTENSI EKSTRAK BEKATUL (*Rice bran*) TERHADAP AKTIVITAS
SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) MENCIT (*Mus musculus*) DIABETES**

SKRIPSI

Oleh:
MAR'ATUS SHOLEHA
NIM. 14630021

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal : 08 Januari 2019

1. **Penguji Utama** : Akyunul Jannah, S.Si,M.P
NIP. 19790620 200604 2 002
2. **Ketua Penguji** : Anik Maunatin, S.T.,M.P
NIPT. 20140201 2 412
3. **Sekr. Penguji** : Diana Candra Dewi, M.Si
NIP. 19770720 200312 2 001
4. **Anggota Penguji** : Nur Aini, M.Si
NIDT. 19840608 20160801 2 070



Mengetahui,
Ketua Jurusan



Elok Kamillah Hayati, M. Si
NIP. 19790620 200604 2 002

PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Mar'atus Sholeha
NIM : 14630021
Jurusan : Kimia
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Potensi Ekstrak Bekatul (*Rice bran*) Terhadap Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) Mencit (*Mus musculus*) Diabetes.

menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil penelitian saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 08 Januari 2019
Yang Membuat Pernyataan,



Mar'atus Sholeha
NIM. 14630021

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Puji syukur penulis ucapkan kehadiran Allah SWT, karena atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul **“Potensi Ekstrak Bekatul (*Rice bran*) Terhadap Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) Mencit (*Mus musculus*) Diabetes”**.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada semua pihak yang telah memberikan kontribusi baik dukungan moral maupun spiritual demi suksesnya penyusunan skripsi ini. Seiring terselesaikannya skripsi ini, dengan penuh kesungguhan dan kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu dan Bapak tercinta yang telah banyak memberikan perhatian, nasehat, do'a dan dukungan baik moral maupun materi yang tak mungkin terbalaskan.
2. Bapak Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag, selaku rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si, Selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Diana Candra Dewi, M.Si, selaku dosen pembimbing penelitian yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat kepada penyusun dalam menyelesaikan penelitian ini.
5. Anik Maunatin, S.T.,M.P, selaku dosen konsultan yang telah memberikan pengarahan, bimbingan, dan nasehat kepada penyusun dalam menyelesaikan penelitian ini.
6. Akyunul Jannah, S.Si.,M.P, selaku dosen penguji yang telah memberikan pengarahan, masukan, dan nasehat kepada penyusun dalam menyelesaikan penelitian ini.
7. Seluruh dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu, pengetahuan, pengalaman, wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penyusun.

8. Teman-teman kelompok DM (Ulyah dan Nafis) dan semua mahasiswa kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan motivasi dan informasi kepada penulis.

Penulis menyadari banyak kekurangan dalam penulisan proposal ini. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan kritikan dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak demi penyempurnaan skripsi ini.

Wassalamu'alaikum Wr.Wb

Malang, 08 Januari 2019

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR PERSAMAAN.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
المخلص	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan	6
1.4 Batasan Masalah.....	6
1.5 Manfaat	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Bekatul	8
2.2 Ekstraksi dengan Metode Maserasi.....	11
2.3 Uji Senyawa Fitokimia.....	13
2.3.1 Alkaloid.....	13
2.3.2 Flavonoid	14
2.3.3 Steroid dan Triterpenoid	15
2.3.4 Saponin	16
2.3.5 Tanin	17
2.4 Diabetes Mellitus	17
2.4.1 Klasifikasi Diabetes Mellitus	19
2.4.2 Hubungan Diabetes Mellitus dengan Ginjal	19
2.5 Mencit (<i>Mus musculus L</i>).....	20
2.6 Alokasan	22
2.7 Radikal Bebas.....	24
2.8 Antioksidan	26
2.9 Superoksida Dismutase (SOD)	28
2.10 Spektrofotometer UV-Vis	32
BAB III METODE PENELITIAN	34
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian	34
3.2 Alat dan Bahan.....	34
3.2.1 Alat.....	34
3.2.2 Bahan	35
3.3 Rancangan Percobaan	35

3.4 Tahapan Penelitian	36
3.5 Prosedur Penelitian.....	37
3.5.1 Preparasi Sampel.....	37
3.5.2 Penentuan Kadar Air	37
3.5.3 Ekstraksi Bekatul	38
3.5.4 Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Bekatul	39
3.5.4.1 Uji Alkaloid.....	39
3.5.4.2 Uji Flavonoid.....	30
3.5.4.3 Uji Steroid dan Triterpenoid.....	40
3.5.4.4 Uji Saponin.....	40
3.5.4.5 Uji Tanin.....	40
3.5.5 Uji Antidiabetes	40
3.5.5.1 Penyiapan Hewan Coba.....	40
3.5.5.2 Perlakuan Hewan Coba	41
3.5.5.3 Pembuatan Larutan Alokasan.....	42
3.5.5.4 Pembuatan Larutan CMC	42
3.5.5.5 Pengondisian Mencit Diabetes Mellitus	42
3.5.5.6 Pembuatan Kontrol Positif dan Kontrol Negatif mencit DM	43
3.5.5.7 Terapi Mencit Diabetes dengan Ekstrak Bekatul	43
3.5.6 Pengukuran Aktivitas SOD	43
3.5.6.1 Pembuatan Larutan Standar SOD.....	43
3.5.6.2 Analisis Aktivitas SOD pada Sampel.....	44
3.5.6.2.1 Preparasi Sampel	44
3.5.6.2.2 Penentuan Aktivitas SOD pada Sampel	44
3.6 Analisis Data	45
BAB IV PEMBAHASAN.....	46
4.1 Preparasi Bekatul dan Analisis Kadar Air	46
4.2 Ekstraksi Bekatul	47
4.3 Uji Fitokimia Ekstrak Bekatul	48
4.3.1 Kandungan Senyawa Alkaloid.....	50
4.3.2 Kandungan Senyawa Steroid	52
4.3.3 Kandungan Senyawa Saponin.....	53
4.3.4 Kandungan Senyawa Tanin	54
4.4 Potensi Ekstrak Bekatul Terhadap Aktivitas SOD Mencit DM.....	55
4.4.1 Pengondisian Mencit DM	55
4.4.2 Pengaruh Ekstrak Bekatul Terhadap Aktivitas SOD Ginjal	56
4.5 Pemanfaatan Bekatul dalam Perspektif Islam.....	63
BAB V PENUTUP	67
5.1 Kesimpulan	67
5.2 Saran.....	67
DAFTAR PUSTAKA	68
LAMPIRAN.....	76

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Bekatul dan Anatomi.....	8
Gambar 2.2 Struktur Inti Alkaloid	14
Gambar 2.3 Struktur Dasar Flavonoid	14
Gambar 2.4 Struktur Steroid	15
Gambar 2.5 Struktur Triterpenoid.....	16
Gambar 2.6 Struktur Glikosida Saponin	16
Gambar 2.7 Struktur Tanin	17
Gambar 2.8 Gambar Mencit.....	20
Gambar 2.9 Struktur Aloksan	22
Gambar 2.10 Reaksi Aloksan.....	23
Gambar 2.11 Reaksi Peredaman Radikal oleh Tokoferol	28
Gambar 2.12 Struktur Refresentatif Tiga Dimensi SOD	28
Gambar 2.13 Produksi dan Mekanisme Radikal Bebas	30
Gambar 2.14 Reaksi Katalisis Enzim MnSOD	30
Gambar 2.15 Reaksi Katalisis Enzim CuSOD	31
Gambar 4.1 Reaksi pada Reagen Dragendorff.....	51
Gambar 4.2 Reaksi Dugaan Steroid	52
Gambar 4.3 Reaksi Hidrolisis Saponin dalam Air	54
Gambar 4.4 Reaksi Dugaan Tanin	55
Gambar 4.5 Reaksi Radikal Superoksida dan NBT	58
Gambar 4.6 Rata-rata Aktivitas SOD dan Kadar Glukosa Darah Mencit.....	62

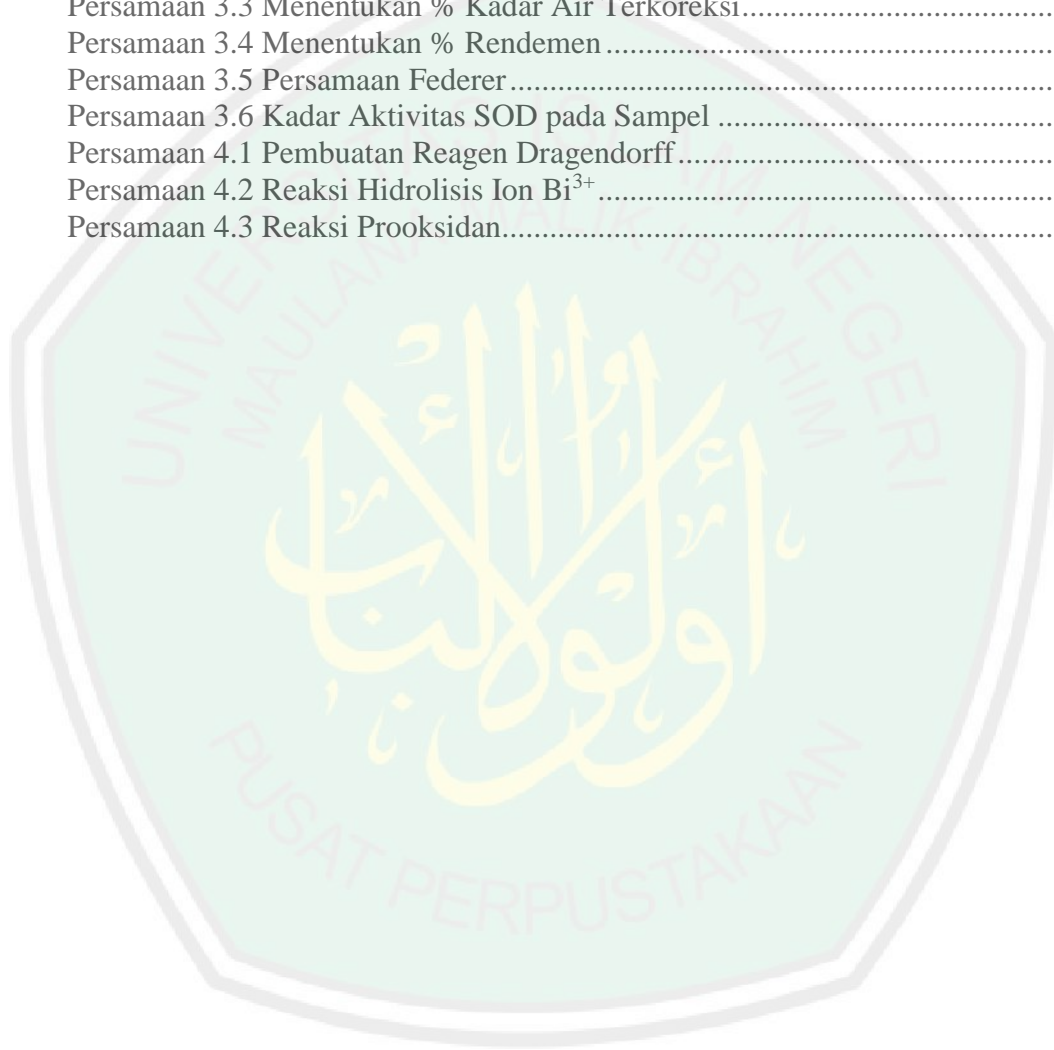
DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan Bekatul.....	9
Tabel 2.2 Senyawa Bioaktif pada Bekatul	11
Tabel 2.3 Konstanta Dielektrikum dan Tingkat Kelarutan Pelarut.....	12
Tabel 2.4 Klasifikasi Diabetes Berdasarkan Etimologi	19
Tabel 2.5 Sifat Biologis Mencit	21
Tabel 4.1 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Bekatul.....	49
Tabel 4.2 Rata-rata Aktivitas SOD	59
Tabel 4.3 Uji Analisis Statistik ANOVA.....	63



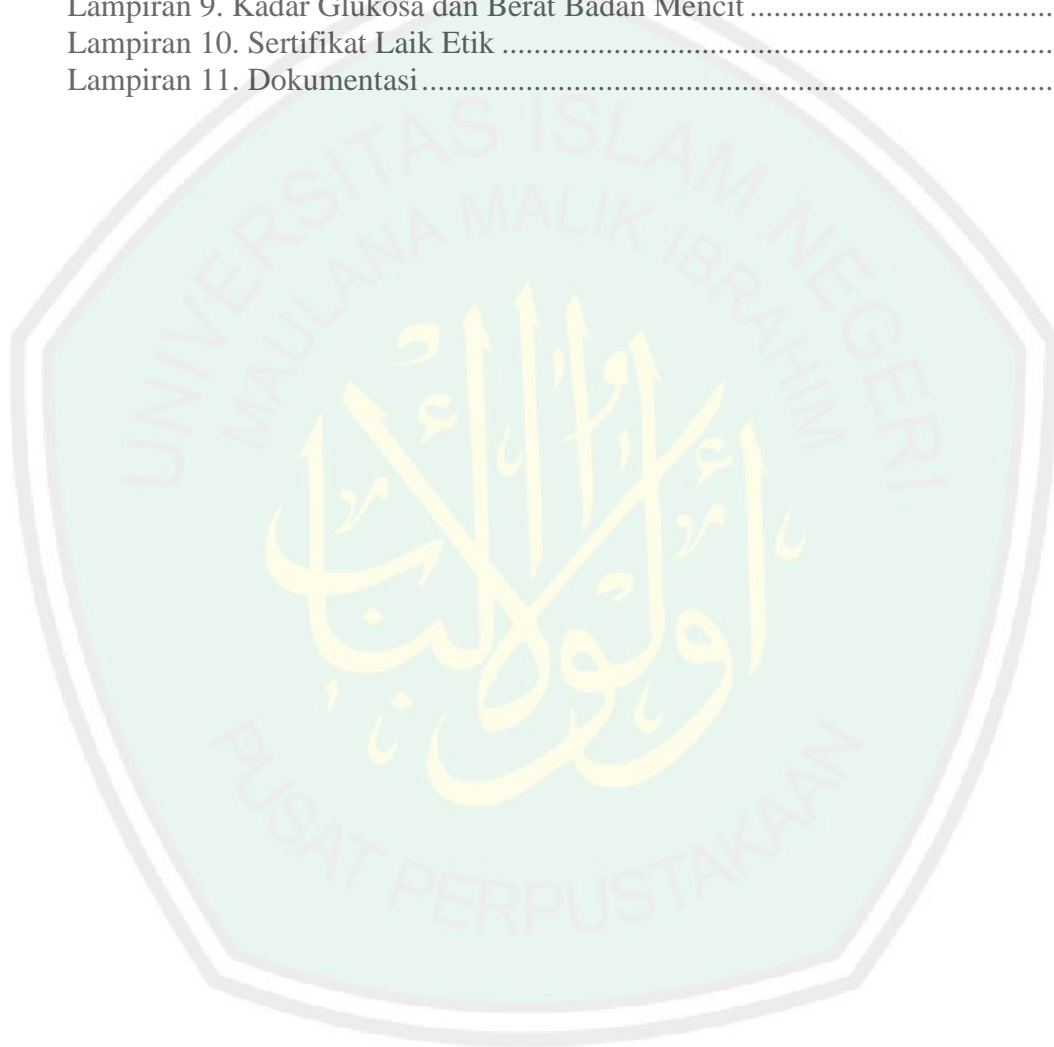
DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 2.1. Tahap Inisiasi Pembentukan Radikal Bebas	24
Persamaan 2.2. Tahap Propagasi Pembentukan Radikal Bebas.....	25
Persamaan 2.3. Tahap Terminasi Pembentukan Radikal Bebas	25
Persamaan 2.4. Reaksi Katalisis MnSOD	31
Persamaan 2.5. Reaksi Peredaman Radikal Bebas.....	32
Persamaan 2.6. Hukum Lambert-Beer	34
Persamaan 3.1 Penentuan Kadar Air.....	38
Persamaan 3.2 Menentuntukan Faktor Koreksi	38
Persamaan 3.3 Menentukan % Kadar Air Terkoreksi.....	38
Persamaan 3.4 Menentukan % Rendemen	39
Persamaan 3.5 Persamaan Federer	41
Persamaan 3.6 Kadar Aktivitas SOD pada Sampel	45
Persamaan 4.1 Pembuatan Reagen Dragendorff.....	51
Persamaan 4.2 Reaksi Hidrolisis Ion Bi^{3+}	51
Persamaan 4.3 Reaksi Prooksidan.....	61



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian.....	76
Lampiran 2. Skema Kerja	77
Lampiran 3. Pembuatan dan Perhitungan Larutan.....	84
Lampiran 4. Pembuatan dan Perhitungan Dosis	87
Lampiran 5. Perhitungan Analisis Kadar Air dan Rendemen Ekstrak.....	91
Lampiran 6. Aktivitas SOD.....	93
Lampiran 7. Analisis Statistik ANOVA Aktivitas SOD secara Manual.....	98
Lampiran 8. Analisis Statistik ANOVA Aktivitas SOD dengan SPSS	100
Lampiran 9. Kadar Glukosa dan Berat Badan Mencit	101
Lampiran 10. Sertifikat Laik Etik	103
Lampiran 11. Dokumentasi.....	104



ABSTRAK

Sholeha, M. 2019. **Potensi Ekstrak Bekatul (*Rice bran*) Terhadap Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) Mencit (*Mus musculus*) Diabetes.**
Pembimbing I: Diana Candra Dewi, M.Si; Pembimbing II: Nur Aini, M.Si;
Konsultan: Anik Maunatin, M.Si

Kata kunci: bekatul, senyawa aktif, antidiabetes, aktivitas SOD

Diabetes mellitus merupakan penyakit metabolik yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemia). Kondisi hiperglikemia dapat menyebabkan stres oksidatif sehingga antioksidan alami berupa superoksida dismutase (SOD) menurun. Bekatul mengandung senyawa aktif antioksidan berupa steroid yang dapat meningkatkan aktivitas SOD dalam tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak bekatul terhadap aktivitas SOD (*Suproksida dismutase*) mencit (*Mus musculus*) diabetes.

Metode yang digunakan untuk memperoleh ekstrak bekatul adalah maserasi dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak bekatul diidentifikasi fitokimia. Mencit dikondisikan menderita diabetes dengan diinduksi aloksan dosis 5,6 mg/20 g BB. Terapi ekstrak bekatul dilakukan dengan pemberian dosis masing-masing sebesar 9,8; 11,2 dan 14 mg/20 g BB mencit *Mus musculus* galur Balb/c selama 14 hari. Uji aktivitas SOD dilakukan pada organ ginjal mencit menggunakan metode spektrofotometri dengan menginduksi radikal superoksida dari reaksi antara xantin dan xantin oksidase.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak bekatul dengan pelarut etanol 96% positif mengandung senyawa aktif golongan alkaloid, steroid, saponin dan tanin. Pengujian aktivitas SOD pada tiap perlakuan terapi memberikan hasil sebesar 9,41; 10,11 dan 8,66 U/mL. Dosis terbaik dalam meningkatkan aktivitas SOD ditunjukkan pada pemberian terapi ekstrak bekatul dengan dosis 2 yaitu sebesar 10,11 U/mL.

ABSTRACT

Sholeha, M. 2019. **Potency of Rice bran extract on the Dismutase Superoxide (SOD) activity in Diabetes Mice (*Mus musculus*)**. Supervisor 1: Diana Candra Dewi, M.Si; Supervisor II: Nur Aini, M.Si; Consultant: Anik Maunatin, M.Si

Keywords: bran, active compound, antidiabetic, SOD activity

Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by an increase in blood glucose levels (hyperglycemia). The condition of hyperglycemia can cause oxidative stress so that natural antioxidants such as superoxide dismutase (SOD) decrease. Bran contains antioxidant active compounds in the form of steroids that can increase SOD activity in the body. This study aims to determine the potential of bran extract for the activity of diabetic SOD (Suproxide dismutase) (*Mus musculus*) diabetes.

The method used to obtain bran extract was maceration with 96% ethanol. The phytochemical identified bran extract. Mice are conditioned to suffer from diabetes with alloxan induction dose of 5.6 mg /20 g BB. Bran extract therapy was carried out by giving each dose of 9.8; 11.2 and 14 mg / 20 g BB of *Mus musculus* Balb / c strain for 14 days. The SOD activity test was carried out on mouse organs using spectrophotometric methods by inducing superoxide radicals from the reaction between xanthine and xanthine oxidase.

The results showed that bran extract with ethanol 96% solvent was positive containing active compounds of alkaloids, steroids, saponins and tannins. Testing of SOD activity in each therapeutic treatment yielded a yield of 9.41; 10.11 and 8.66 U / mL. The best dose in increasing SOD activity was shown in the administration of bran extract with dose 2 which was 10.11 U / mL.

الملخص

صالحة، مَرَأة. ٢٠١٩. الأمكانية من استخراج نخالة الأرز إلى نشاط داء سكري ديزموتاز (SOD) الفئران (*Mus musculus*) السكري. المشرفة I : ديانا جانديرا ديوي، الماجستير ؛ المشرفة II : نور عيني، الماجستير ؛ المستشار عنيق معونة الماجستير

كلمات البحث : النخالة، المركبة النشيطة، المضادة لمرض السكر، نشاط SOD

مرض السكري هو مرض استقلابي يتميز بارتفاع قدر الجلوكوز في الدم (فرط سكر الدم). حالة ارتفاع السكر في الدم يمكن أن تسبب الإجهاد التأكسدي حتى أن مضادات الأكسدة الطبيعية مثل ديسموتاز الفائق SOD إنقاص. النخالة يحتوي على المركبة النشيطة مضادة للأكسدة في شكل المنشطة التي يمكن أن تزيد نشاط SOD في الجسم. هدف هذا البحث إلى معرفة إمكانية استخراج النخالة إلى نشاط داء السكري SOD الفئران (*Mus musculus*) داء السكري.

الطريقة المستخدمة للحصول على استخراج النخالة هي النقع مع مذيب الإيثانول ٩٦٪. ثم الاختبار من استخراج النخالة الذي تحديده من النبات لمضادة الالتهاب في جرعة الفئران هي مشروطة تعاني من مرض السكري مع الحث ان تبلغ ٥,٦ mg /g ٢٠ BB. التنفيذ من علاج المستخرج بإعطاء كل جرعة من ٨,٩, ١١, ٢ و ١٤ mg /g ٢٠ BB من الفئران (*Mus musculus*) ثم Balb/c حول ١٤ يوما و اختبار الأنشطة SOD في أعضاء الكلى. تم إجراء اختبار النشاط SOD على كلى الفئران باستخدام أساليب الطيف الضوئي عن طريق حث جذور الفائق من التفاعل بين زانثين وأكساناز زانثين. أظهرت نتائج البحث أن استخراج النخالة مع مذيب إيثانول ٩٦٪ كان موجباً يحتوي على المركبة النشيطة من الفلوييد، الستيرويد، السابونين والتانين. ثم في اختبار النشاط SOD في كل معاملة العلاج أنتاجت عن ٩,٤١ ؛ ١٠,١١ و ٨,٦٦ U/mL. عرض أفضل الجرعة في إعطاء استخراج النخالة مع الجرعة ٢ اي كانت ١٠,١١ U/mL.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes mellitus merupakan penyakit yang semakin tahun menjadi permasalahan kesehatan yang serius di masyarakat. Penderita diabetes mellitus di Indonesia terhitung sekitar 8,6 juta orang dan diperkirakan pada tahun 2030 jumlahnya mencapai 21,3 juta jiwa (Wild et al., 2004). Diabetes mellitus umumnya disebabkan karena perubahan pola hidup dan berkurangnya kesadaran terhadap pengaturan pola hidup. American Diabetes Association (2012), menyatakan bahwa diabetes mellitus merupakan kelompok penyakit metabolik kronis tidak menular, yang ditandai dengan hiperglikemia akibat cacat pada sekresi insulin, aksi insulin atau keduanya serta terjadi perubahan progresif terhadap struktur sel beta pankreas.

Diabetes mellitus terbagi menjadi 2 jenis yaitu diabetes mellitus tipe 1 dan tipe 2. Ning Harmanto (2004), menyatakan bahwa Diabetes mellitus tipe 1 atau *insulin dependent diabetes mellitus* (IDDM) terjadi akibat faktor genetik karena kekurangan insulin yang ditandai dengan sistem imun tubuh yang menghancurkan sel-sel β pankreas, sehingga sel β tidak mampu memproduksi hormon insulin yang berfungsi untuk menurunkan kadar glukosa darah. Diabetes mellitus tipe 2 atau *non-insulin dependent diabetes mellitus* (NIDDM) terjadi akibat gaya hidup yang tidak baik. Kebutuhan insulin yang meningkat mendorong pankreas berusaha memproduksi insulin dalam jumlah lebih. Namun kondisi ini tidak bertahan lama, sampai akhirnya sel β kehilangan kemampuan atau disfungsi sel β dalam

memproduksi insulin dengan jumlah yang cukup untuk merespon kadar glukosa yang meningkat.

Salah satu pengobatan yang telah dilakukan untuk penderita diabetes mellitus yaitu berupa suntikan insulin dan pemberian obat oral antidiabetes. Namun pemberian obat tersebut cenderung menyebabkan ketergantungan dan efek samping seperti sakit kepala, pusing, mual dan anoreksia (Widowati dkk, 1997). Oleh karena itu peneliti berusaha mencari alternatif pengobatan tradisional menggunakan tanaman yang mengandung senyawa-senyawa aktif sebagai antidiabetes.

Allah SWT telah menciptakan tumbuh-tumbuhan dengan beragam jenisnya untuk memberi manfaat dan kenikmatan bagi manusia. Sebagaimana Allah SWT berfirman dalam al-Qur'an surat Ali Imron ayat 191:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمٰوٰتِ وَالْاَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هٰذَا بَطِيْلًا سُبْحٰنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ (١٩١)

Artinya: “Yaitu orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka.”(Ali Imron: 191).

Ayat tersebut menunjukkan bahwa manusia diperintahkan untuk senantiasa berfikir atas ciptaan Allah SWT (Quthb, 2011). Oleh karena itu manusia perlu mempelajari dan mencari tahu segala sesuatu di langit dan bumi untuk menemukan manfaatnya. Salah satunya adalah bekatul yang merupakan hasil samping penggilingan padi yang berpotensi sebagai tanaman berkhasiat sebagai obat.

Bekatul merupakan salah satu sumber pangan yang mengandung antioksidan seperti vitamin E dan γ -oryzanol. Zang et al., (2010) menyatakan bekatul beras hitam mengandung beberapa senyawa aktif seperti flavonoid, fenolik, antosianin dan tiga bentuk sianida berpotensi sebagai antioksidan. Dalam Friedman (2013) menyatakan bahwa bekatul beras putih mengandung senyawa aktif seperti, asam fenolik sebanyak 2101 $\mu\text{g/g}$, α -tokoperol 71 $\mu\text{g/g}$ dan γ -orizanol 3681 $\mu\text{g/g}$. Adom et al., (2002) melaporkan bahwa antioksidan pada bekatul berupa oryzanol, tokoferol dan asam ferulat mampu menghambat penyakit diabetes mellitus. Pemberian dosis 200 mg/kg ekstrak bekatul beras hitam mampu menurunkan kadar glukosa darah hingga 100 mg/dL pada tikus diabetes (Dwinani dan Arifah, 2014).

Ekstraksi bekatul dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol. Prinsip utama ekstraksi maserasi adalah mengekstrak senyawa aktif berdasarkan tingkat kepolaran dan kemampuan dari suatu pelarut dalam mengikat metabolit sekunder pada sampel atau dengan prinsip *like dissolves like* (Khopkar, 2010). Friedman (2013), menyatakan bahwa ekstrak etanol bekatul menunjukkan efisiensi ekstraksi yang tinggi yang mengandung senyawa bioaktif sebagai antioksidan. Etanol memiliki kemampuan yang tinggi dalam melarutkan senyawa aktif dan merupakan pelarut organik yang direkomendasikan untuk mengekstraksi obat herbal sebelum diproduksi dalam bentuk farmasetis modern (Saifudin, 2014). Penelitian Dwinani dan Arifah (2014), menyatakan ekstrak etanol 96% bekatul beras hitam bila dibandingkan dengan kontrol negatif telah mampu menurunkan kadar glukosa darah pada hari ke-10 setelah pemberian perlakuan dan menunjukkan kemampuan menurunkan kadar glukosa darah yang setara dengan

kontrol normalnya yaitu dari 248 mg/dL menjadi 100 mg/dL. Hal ini menunjukkan bahwa komponen bioaktif sebagai antidiabetes pada bekatul terekstrak secara maksimal. Oleh karena itu, dalam penelitian ini digunakan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 96%. Etanol 96% lebih banyak menarik kandungan kimia metabolit sekunder dibandingkan metabolit primer, dikarenakan 96% yang berarti 96% etanol sebagai pelarut metabolit sekunder dan 4% air sebagai pelarut metabolit primer (Saputra dkk., 2016).

Ekstrak etanol bekatul diujikan untuk mengetahui efektivitas antioksidan dengan pemberian dosis 9,8 mg/20 g BB; 11,2 mg/20 g BB dan 14 mg/20 g BB yang telah dikonversi pada mencit (Dwinani dan Arifah, 2014). Agen diabetagonik yang digunakan adalah aloksan. Aloksan merupakan bahan kimia untuk mengondisikan hewan coba menderita diabetes. Dalam Lenzen (2008), aloksan merupakan analog glukosa toksik di sel beta pankreas yang menghasilkan radikal superoksida, H_2O_2 dan radikal hidroksil. Peningkatan radikal superhidroksida menyebabkan meningkatnya hidrogen peroksida dan radikal hidroksil yang menyebabkan terjadi kondisi hiperglikemia. Penelitian Arifin dkk., (2007) dan Suarsana dkk., (2010) menyatakan bahwa induksi aloksan dilakukan pada mencit dengan dosis 200 mg/kg berat badan dan minuman yang mengandung glukosa 10% diberikan selama dua hari setelah pemberian aloksan sehingga aloksan dan glukosa dapat merusak sel beta jaringan pankreas sehingga menyebabkan diabetes permanen.

Kerusakan sel beta pankreas menyebabkan tubuh tidak bisa menghasilkan insulin sehingga terjadi keadaan hiperglikemia (Suarsana dkk., 2010). Kondisi hiperglikemia disebabkan karena adanya radikal bebas atau (ROS) *reactive*

oxygen species, sehingga dapat menyebabkan stres oksidatif, yaitu suatu kondisi produksi ROS melebihi kapasitas antioksidan dalam tubuh sehingga akan mengarahkan pada oksidasi molekul-molekul penting dalam tubuh (Robertson et al., 2003; Bowen-Forbes et al., 2010). Retnaningsih dkk., (2013) menyatakan spesies oksigen reaktif (ROS) berperan terhadap patogenesis berbagai inflamasi dan disfungsi sel beta pankreas. Tubuh memiliki penangkal untuk menanggulangi radikal bebas tersebut, yaitu enzim antioksidan salah satunya adalah enzim *Superoksida dismutase* (SOD) (Wresdiyati et al., 2008; Astuti et al., 2009; Nurhayati dkk., 2011).

SOD merupakan enzim antioksidan yang diproduksi secara alami oleh organisme yang mengonsumsi oksigen (Piyatu, 2007). Aktivitas enzim SOD memiliki peran penting dalam sistem pertahanan tubuh dan sebagai antioksidan primer dalam menanggulangi radikal bebas, yaitu anion superoksida (Winarsi, 2007; Rahmawati dkk., 2014). Namun, kondisi hiperglikemia yang terjadi secara berkelanjutan dapat memicu stres oksidatif lebih lanjut, karena mampu menghasilkan radikal bebas lebih banyak. Ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan yang dihasilkan dapat menurunkan efektivitas antioksidan di dalam tubuh. Oleh karena itu, asupan antioksidan eksogen sangat penting guna membantu kerja enzim antioksidan intrasel untuk mencegah kerusakan sel (Wiyono, 2003; Suarsana dkk., 2010). Penelitian Andriyani dkk., (2015), menunjukkan bahwa aktivitas SOD jantung tikus mengalami peningkatan dengan terapi ekstrak umbi binahong dari 5,38 U/mL pada kondisi diabetes menjadi 5,51 U/mL setelah pemberian terapi. Penelitian Ratnaningsih dkk., (2013), menyatakan bahwa pemberian asupan tempe koro benguk dapat

meningkatkan aktivitas antioksidan serum tikus hiperglikemia dari 90,8% menjadi 97,8%.

Berdasarkan uraian diatas maka perlu dilakukan penelitian uji fitokimia untuk mengetahui senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan dan mengetahui efektivitas ekstrak bekatul terhadap aktivitas SOD mencit diabetes, sehingga bekatul dapat dimanfaatkan sebagai antidiabetes.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Golongan senyawa aktif apakah yang terkandung dalam ekstrak bekatul berdasarkan hasil uji fitokimia?
2. Berapa dosis terbaik ekstrak bekatul dalam meningkatkan aktivitas SOD mencit (*Mus musculus*) diabetes?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan pada penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak bekatul berdasarkan hasil uji fitokimia.
2. Untuk mengetahui dosis terbaik ekstrak bekatul dalam meningkatkan aktivitas SOD mencit (*Mus musculus*) diabetes.

1.4 Batasan Masalah

1. Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jantan, galur balb/c, umur 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram.

2. Bekatul yang digunakan adalah bekatul beras putih diambil dari daerah Gresik, Jawa Timur.
3. Pelarut yang digunakan yaitu etanol 96% menggunakan metode maserasi.
4. Parameter uji yaitu aktivitas SOD dari organ ginjal mencit
5. Golongan senyawa yang diidentifikasi pada uji fitokimia yaitu flavonoid, alkaloid, tannin, saponin, steroid.

1.5 Manfaat Penelitian

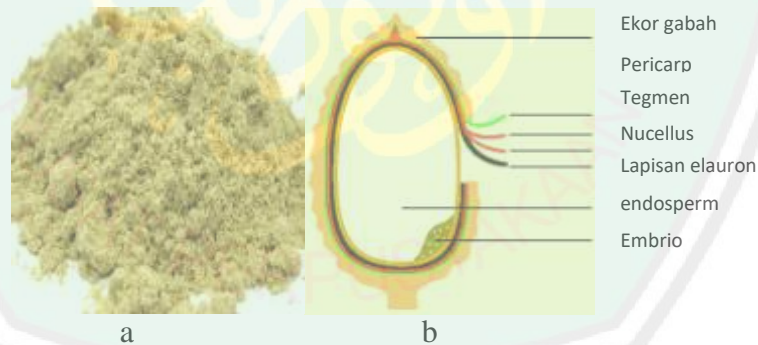
Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pengaruh ekstrak bekatul yang dapat dimanfaatkan sebagai antidiabetes yang mampu meningkatkan aktivitas SOD dalam tubuh, sehingga dapat meningkatkan nilai guna limbah penggilingan padi sebagai obat herbal alternatif penyakit diabetes mellitus.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bekatul

Menurut definisinya, dedak (*bran*) adalah hasil samping proses penggilingan padi, terdiri atas lapisan sebelah luar butiran padi dengan sejumlah lembaga biji. Sementara bekatul (*polish*) adalah lapisan sebelah dalam dari butiran padi, termasuk sebagian kecil endosperm berpati. Namun, karena alat penggilingan padi tidak memisahkan antara dedak dan bekatul maka umumnya dedak dan bekatul bercampur menjadi satu dan disebut dengan dedak atau bekatul saja (Hadipernata, 2007). Bekatul terdiri atas beberapa lapisan, yaitu pericarp, tegmen, lapisan aleuron (Nursalim, 2007). Berikut ditunjukkan penampakan bekatul dan bagian-bagian dari biji padi.



Gambar 2.1 (a) Bekatul dan (b) Anatomi padi (Nursalim, 2007)

Ketersediaan bekatul cukup melimpah di Indonesia, namun pemanfaatannya sebagai obat herbal masih terbatas. Penelitian ini menggunakan bekatul yang diambil dari daerah Gresik yang merupakan dataran rendah dengan ketinggian 2 sampai 25 meter di atas permukaan laut (PemKab Gresik, 2017).

Salah satu faktor yang mempengaruhi kadar kandungan senyawa aktif pada tumbuhan adalah letak geografisnya. Sehingga penelitian ini diharapkan dapat memperoleh jenis senyawa aktif yang lebih beragam.

Bekatul adalah sumber vitamin B kompleks dan tokoferol, tetapi rendah vitamin A dan vitamin C. Sebagian besar vitamin yang ada dalam padi terdapat pada bagian aleuron dan lembaga. Hal ini menjadikan bekatul sebagai bahan yang kaya akan kandungan vitamin. Vitamin B kompleks dan vitamin E tokoferol dan tokotrienol banyak ditemukan di dalam bekatul (220-320 ppm), sedangkan vitamin A (0.9-1.6 ppm) dan vitamin C hanya sedikit jumlahnya (Barber dan Cermen, 1980). Bekatul mengandung komponen antioksidan lebih dari 100 jenis, diantaranya γ oryzanol (2200-3000 ppm), tokoferol dan tokotrienol (220-320 ppm), fitosterol (2230-4400 ppm), karotenoid (0.9-1.6 ppm), vitamin B (tiamin, 2231 ppm) (Helal, 2005). Kandungan gizi bekatul ditunjukkan pada Tabel 2.1 (Nursalim, 2007).

Tabel 2.1 Kandungan bekatul (Nursalim, 2007)

Kandungan	Jumlah
Air	2,49%
Protein	8,77%
Lemak	1,09%
Abu	1,60%
Serat	1,69%
Karbohidrat	84,36%
Kalori	382, 32 kal
Logam berat	-

Senyawa aktif pada bekatul menjadi topik penelitian penting karena dapat memberikan fungsi-fungsi fisiologis dalam pencegahan penyakit generatif. Bekatul padi berfungsi sebagai sumber antioksidan yang banyak mengandung

senyawa bioaktif individual, antaranya telah terbukti menunjukkan efek menguntungkan pada sel, hewan, dan manusia (Friedman, 2014). Allah berfirman dalam QS. Asy Syu'araa ayat 80:

وَإِذَا مَرَضْتُ فَبُهِتَ الَّذِينَ
فَهُوَ يَشْفِينِ

Artinya: “Dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan aku” (QS. Asy Syu'araa: 80)

Ayat ini menjelaskan bahwa Allah SWT yang memberikan penyakit dan memberikan kesembuhan kepada makhluk-Nya yang harus dilakukan dengan proses ikhtiar (Quthb, 2001). Sesungguhnya Allah SWT menurunkan satu penyakit melainkan menurunkan obat untuk penyakit tersebut. Karena dialah Allah SWT yang mengetahui atas segala sesuatu sedangkan makhluknya tidak. Maka dari itu sebagai manusia hendaklah selalu bersyukur atas nikmat yang diberikan serta merenungi dan mempelajari ciptaan-Nya.

Kandungan senyawa bioaktif dari bekatul seperti tokoferol berperan sebagai antioksidan dengan mencegah kerusakan dinding sel sehingga mampu mencegah hemolisis sel darah merah (Kahlon et al., 1994). Aktivitas antioksidan pada senyawa fenolik berperan sebagai penangkal radikal bebas. Vitamin E dan orizanol merupakan senyawa yang berharga untuk menjaga kesehatan manusia, antara lain sebagai zat yang dapat menurunkan kadar kolesterol darah, mencegah terjadinya kanker dan memperlancar sekresi hormonal (David, 2008). Susunan senyawa bioaktif dari bekatul ditunjukkan pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Senyawa bioaktif pada bekatul (Friedman, 2014)

Asam Penolik dan Sinamik	Antosianin, Flavonoid	Susunan Steroid
Asam kafeik	Monomer antosianin,	2,4-metilen sikloartenol
Asam kumarik	dimer,	ferulat
Asam ferulik	dan polimer	γ -orizanol
Asam vanillic	Sianidin glukosida	tokoferol
	Sianidin rutosida	tokotrienol

2.2 Ekstraksi dengan Metode Maserasi

Ekstraksi merupakan kegiatan menarik kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut (Sax, 1998). Ekstraksi merupakan metode pemisahan yang cukup baik. Pemisahan ini dapat dilakukan baik dalam tingkat makro sampai pada tingkat mikro. Ekstraksi merupakan suatu proses yang dilakukan untuk memperoleh kandungan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan maupun hewan. Proses pembuatan ekstrak yang baik harus melewati beberapa tahapan diantaranya yaitu pembuatan serbuk simplisia, pemilihan cairan pelarut, separasi dan pemurnian, pemekatan atau penguapan, pengeringan ekstrak dan menghitung rendemen (Depkes RI, 2000)

Maserasi berasal dari bahasa latin *macerace*, artinya merendam (Ansel, 1989). Maserasi merupakan cara yang sederhana dalam metode ekstraksi yaitu dengan merendam simplisia dalam pelarut. Pelarut masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat-zat aktif sehingga zat aktif akan larut. Karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel, maka larutan yang pekat didesak keluar. Peristiwa tersebut terjadi berulang-ulang dan terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel (Octavia, 2009).

Proses ekstraksi maserasi sangat cocok digunakan dalam isolasi senyawa γ -orizanol karena tidak menggunakan suhu tinggi sehingga tidak merusak

senyawa γ -orizanol dalam sampel (Guenther, 2006). Menurut Harborne (1987), metode maserasi digunakan untuk mengekstrak jaringan tanaman yang belum diketahui kandungan senyawanya yang kemungkinan bersifat tidak tahan panas sehingga kerusakan komponen tersebut dapat dihindari. Kekurangan dari metode ini adalah memerlukan waktu yang cukup lama dan membutuhkan banyak pelarut.

Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus memenuhi syarat, yaitu pelarut harus merupakan pelarut terbaik untuk bahan yang diekstraksi dan pelarut harus dapat memisahkan senyawa aktif dengan baik (Winarno dkk., 1973). Selain itu, konstanta dielektrik merupakan salah satu ukuran kepolaran pelarut. Besarnya polaritas dari suatu pelarut proporsional dengan besarnya konstanta dielektriknya (Stahl, 1985). Konstanta dielektrikum ditunjukkan pada Tabel 2.3 (Sax, 1998).

Tabel 2.3 Konstanta dielektrum dan tingkat kelarutan pada pelarut (Sax,1998)

Jenis Pelarut	Konstanta Dielektrikum	Tingkat Kelarutan dalam Air
Heksana	1,9	Tidak larut
Petroleum eter	2,28	Tidak larut
Kloroform	4,81	Sedikit
Etil asetat	6,02	Sedikit
Etanol	24,30	Larut
Air	78,4	Larut

Pemilihan jenis pelarut harus mempertimbangkan faktor-faktor diantaranya memiliki daya larut yang tinggi terhadap senyawa yang dilarutkan, stabil secara fisika dan kimia dan tidak menyebabkan perubahan secara kimia pada komponen ekstrak (Bernasconi, 1995). Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah pelarut etanol 96% karena cenderung aman, tidak beracun dan tidak berbahaya, serta mempunyai polaritas yang tinggi dan selektif sehingga

dapat mengekstrak senyawa aktif (pada bekatul) lebih banyak dibandingkan jenis pelarut organik lainnya (Andriyeani dkk., 2015).

2.3 Uji Fitokimia

Senyawa fitokimia adalah zat kimia alami yang terdapat di dalam tanaman yang memberikan cita rasa, aroma, ataupun warna khas pada tanaman tersebut. Beberapa senyawa fitokimia dapat berpotensi sebagai antikanker, antimikroba, antioksidan, antitrombotik, meningkatkan sistem kekebalan, antiinflamasi, mengatur tekanan darah, menurunkan kolesterol serta mengatur kadar gula darah (Astawan dan Andreas, 2008).

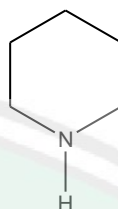
Senyawa fitokimia umumnya terkandung dalam senyawa metabolit sekunder yang berfungsi untuk pertahanan tumbuhan pada lingkungannya. Beberapa jenis senyawa fitokimia adalah alkaloid, flavonoid, kuinon, tannin, polifenol, saponin, steroid dan masih banyak lagi fungsinya saling melengkapi sehingga bermanfaat bagi tubuh (Rizki, 2013)

2.3.1 Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa organik yang terdapat dalam tumbuhan, bersifat basa dan struktur kimianya mempunyai sistem lingkaran heterosiklis dengan nitrogen sebagai hetero atomnya. Unsur-unsur penyusun alkaloid adalah karbon, hidrogen, nitrogen dan oksigen. Adanya nitrogen dalam lingkaran pada struktur kimia alkaloid menyebabkan bersifat alkali.

Ekstraksi merupakan salah satu cara untuk mendapatkan alkaloid dari tumbuhan. Pelarut yang digunakan untuk mendapatkan alkaloid adalah pelarut yang dapat mengendapkan senyawa alkaloid. Beberapa pelarut yang penting

adalah pereaksi Mayer (merkuri potasium klorida) dan pelarut Dragendorff (bismut potasium iodida). Berikut adalah struktur inti dari alkaloid (Sumardjo, 2009).

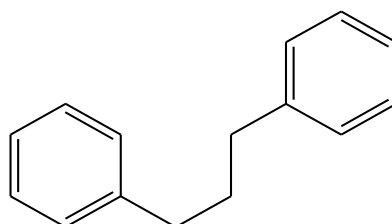


Gambar 2.2 Struktur Inti Alkaloid (Sumardjo, 2009)

Kebanyakan alkaloid adalah amina tersier yang memiliki satu atau lebih atom karbon asimetris sehingga di dalam larutan dapat menunjukkan kerja optis. Alkaloid dan garam-garamnya banyak digunakan sebagai obat (Sumardjo, 2009).

2.3.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa polifenol. Flavonoid sangat efektif digunakan sebagai antioksidan. Flavonoid merupakan kelompok pigmen fenolat yang memberikan warna pada sayuran, buah-buahan dan bunga. Figmen ini digambarkan sebagai deretan $C_6-C_3-C_6$ (cincin benzen terdistribusi) diambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon. Apabila rantai C_3 berakhir pada OH fenol dari cincin benzen. Dikenal berbagai senyawa flavonoid yang tergantung pada derajat oksidasinya yaitu antosianidin, flavonol, flovonon serta flavononal (Tim Penulis Laboratorium Kimia-Biokimia Pangan, 2006).



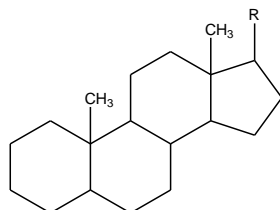
Gambar 2.3 Struktur Dasar Flavonoid (Sumardjo,2009)

Identifikasi senyawa flavonoid dapat dilakukan dengan penambahan logam Mg dan beberapa tetes HCl pekat. Adanya senyawa flavonoid ditunjukkan terbentuk warna merah atau jingga (Astuti, 2012). Flavonoid mampu bekerja sebagai *scavenger* radikal bebas dengan adanya gugs hidroksil dalam susunan gugus fenol serta ikatan rangkap terkonjugasi, sehingga dapat menghambat radikal bebas serta dapat meningkatkan aktivitas antioksidan endogen salah satunya yaitu aktivitas *superoksida dismutase* (Retno dkk., 2013).

2.3.3 Steroid dan Triterpenoid

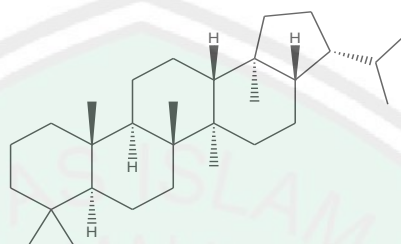
Steroid adalah salah satu kelas utama dari lipid yang memiliki struktur yang berbeda dari kelas-kelas lipid lainnya. Fitur utama dari steroid adalah tiga cincin sikloheksan dan satu siklopentana dalam sistem cincin yang menyatu. Steroid adalah keluarga molekul lipid yang mencakup kolesterol, hormon steroid dan garam empedu. Pada umumnya gugus metil berada pada C₁₀ dan C₁₃, rantai samping alkil dapat juga berada pada C₁₇. Sterol adalah steroid yang memiliki gugus hidroksi pada C₃. Atom karbon tambahan dapat berada pada rantai samping (Sumbono, 2016).

Steroid yang terdapat dalam jaringan tumbuhan umumnya berasal dari triterpenoid sikloartenol. Uji steroid yang banyak digunakan adalah reaksi Lieberman-burchard (anhidrat asetat-asam sulfat pekat) yang dengan kebanyakan triterpen dan sterol memberikan warna hijau-biru (Harborne, 1987).



Gambar 2.4 Struktur Steroid (Sumardjo, 2009)

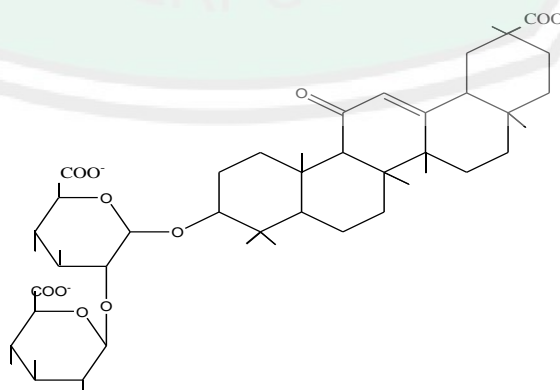
Triterpenoid adalah senyawa dengan kerangka karbon berasal dari enam isoprene dan secara biosintesis yang diturunkan dari hidrokarbon C_{30} asiklik yaitu skualena. Senyawa ini berupa alkohol, aldehida atau asam karboksilat berstruktur siklik (Harborne, 1987).



Gambar 2.5 Struktur Triterpenoid (Sumardjo, 2009)

2.3.4 Saponin

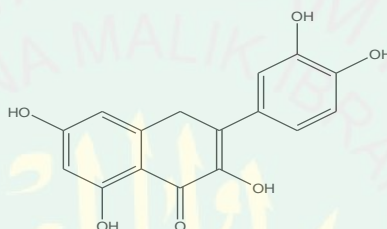
Saponin adalah glikosida, yaitu metabolit sekunder yang banyak terdapat di alam yang terdiri dari gugus gula yang berikatan dengan aglikon atau sapogenin. Saponin memiliki sifat sebagai antivirus, antibakteri, antikanker, antitumor dan penurun kolesterol (Mardiana, 2012). Pengujian senyawa saponin secara sederhana dapat dilakukan dengan menggunakan alkohol dan air dari tumbuhan dan perhatikan jika busa terbentuk tahan lama pada cairan maka mengandung senyawa saponin (Harborne, 1987).



Gambar 2.6 Struktur Glikosida Saponin (Sumardjo, 2009)

2.3.5 Tanin

Tanin merupakan senyawa organik polifenol dengan rasa pahit yang kuat dengan efek adstringen. Tannin merupakan senyawa dengan jumlah gugus hidroksil yang banyak dan terdapat dalam kelompok tumbuh-tumbuhan. Tannin dapat berfungsi sebagai antioksidan karena memiliki kemampuan dalam menstabilkan fraksi lipid. Selain itu tanin memiliki keaktifan dalam menghambat lipoksigenase (Indrawati dan Razimin, 2013).



Gambar 2.7 Struktur Tanin (Sumardjo, 2009)

2.4 Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus berasal dari kata Yunani *diabetes* yang artinya mengalir terus, *mellitus* berarti madu atau manis. Istilah tersebut menunjukkan tentang keadaan tubuh penderita, yaitu adanya cairan manis yang terus menerus mengalir (Dalimartha, 2007). Diabetes mellitus adalah penyakit metabolik yang ditandai dengan terjadinya peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemia) yang disebabkan oleh gangguan sekresi insulin, sehingga terjadi abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak dan protein (Price, 1999). Hiperglikemia kronis terbukti meningkatkan stres oksidatif yang mengakibatkan berkurangnya jumlah *glucose transporter* (GLUT) dan berdampak pada peningkatan resistensi insulin, lemahnya insulin *signaling* dan mengganggu sekresi insulin oleh sel β pankreas (Kaneto dkk., 1999).

Efek hiperglikemia terhadap sel beta pankreas dapat digolongkan dalam beberapa bentuk, pertama glukotoksisitas sel beta yang merupakan kerusakan *irreversible*. Kedua adalah ausnya sel beta *beta cell exhaustion* adalah kelainan yang *reversible* dan terjadi lebih dini dibandingkan dengan toksisitas dan yang ketiga adalah desensitasi sel beta yaitu gangguan sementara sel beta yang dirangsang oleh hiperglikemia yang berulang dan keadaannya akan kembali normal bila gula darah dinormalkan (Insani, 2013). Beberapa ahli berpendapat bahwa dengan meningkatnya umur, maka intoleransi terhadap glukosa juga meningkat. Intoleransi glukosa pada usia lanjut berkaitan dengan obesitas, aktivitas fisik yang kurang, berkurangnya massa otot, penyakit penyerta, penggunaan obat-obatan sehingga terjadi penurunan sekresi insulin dan resistensi insulin (Misnadiarly, 2006).

Diagnosis diabetes biasanya diikuti dengan adanya gejala poliuria (produksi urin yang berlebihan), polidipsia (peningkatan rasa haus), polifagia (rasa lapar yang berlebihan) dan penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan penyebabnya. Nilai glukosa darah normal adalah 60-100 mg/dL dan glukosa serum, 70-110 mg/dL. Ketika kadar glukosa darah lebih besar dari 180 mg/dL, dapat terjadi glukosuria (gula dalam urin). Bila gula darah meninggi mencapai ≥ 200 mg/dL seseorang menderita diabetes mellitus (Kee dan Hayes, 1996). Diagnosis diabetes dapat dipastikan apabila hasil pemeriksaan kadar glukosa darah sewaktu ≥ 200 mg/dL dan hasil pemeriksaan kadar glukosa darah puasa ≥ 126 mg/dL (Dalimartha, 2007).

2.4.1 Klasifikasi Diabetes Mellitus

Klasifikasi diabetes berdasarkan etiologi penyakit ditunjukkan pada Tabel 2.4 (Bilous dan Richard, 2010).

Tabel 2.4 Klasifikasi diabetes berdasarkan etimologi (Bilous dan Richard, 2010)

Jenis Diabetes	Etiologi
Tipe 1	Disebabkan oleh penghancuran sel β pada pulau Langerhans. Tergantung suntikan insulin dari luar tubuh
Tipe 2	Disebabkan oleh kombinasi resistansi dan disfungsi sekresi insulin sel β
Tipe khusus lain	Disebabkan oleh kondisi seperti endokrinopati, penyakit eksokrin pankreas, sindrom genetik
Diabetes gestasional	Diabetes yang muncul pertama kali saat kehamilan GMP (Glukosa Puasa Terganggu) atau TGT (Toleransi Glukosa Terganggu)

2.4.2 Hubungan Diabetes Mellitus dengan Ginjal

Diabetes melitus adalah suatu kelompok penyakit metabolik dengan karakteristik penyakit hiperglikemi yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, gangguan kerja insulin atau keduanya. Apabila kondisi hiperglikemia pada pankreas terjadi secara terus menerus, maka akan menimbulkan berbagai komplikasi kronik pada mata, ginjal, saraf dan pembuluh darah (Hendromartono, 2014).

Ginjal merupakan organ vital yang berperan penting dalam mempertahankan kestabilan lingkungan tubuh. Ginjal mengatur keseimbangan cairan tubuh, elektrolit dan asam basa dengan cara penyaringan darah melalui, reabsorpsi selektif air, serta mengekresi kelebihan sebagai kemih. Kelainan yang terjadi pada ginjal penyandang diabetes melitus dimulai dengan adanya mikroalbuminuria. Tingginya kadar gula dalam darah akan membuat struktur ginjal berubah sehingga mengganggu fungsi kerja ginjal. Mikroalbuminuria

umumnya didefinisikan sebagai ekskresi albumin lebih dari 30 mg/hari dan dianggap penting untuk timbulnya nefropati diabetik yang jika tidak terkontrol kemudian akan berkembang menjadi proteinuria (Rivandi dan Yonata, 2015).

Nefropati diabetik (ND) merupakan komplikasi penyakit diabetes mellitus yang termasuk dalam komplikasi mikrovaskular, disebabkan karena terjadi kerusakan pada pembuluh darah halus pada ginjal. Kerusakan pembuluh darah berlanjut dengan penurunan fungsi laju filtrasi glomerular dan berakhir dengan keadaan gagal ginjal (Ritz dkk., 2000 dalam Probosari). Terjadi perubahan pada membran basalis glomerulus yaitu proliferasi dari sel-sel mesangium. Hal ini menyebabkan glomerulosklerosis dan berkurangnya aliran darah sehingga terjadi perubahan permeabilitas membran basalis glomerulus yang ditandai dengan timbulnya albuminuria (Sari dan Hisyam, 2014).

2.5 Mencit (*Mus musculus L*)

Menurut Arrington (1972), klasifikasi mencit menurut (*Mus musculus L*) taksonomi adalah sebagai berikut.

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Mus</i>
Spesies	: <i>Mus musculus</i>



Gambar 2.8 Mencit (*Mus musculus*)

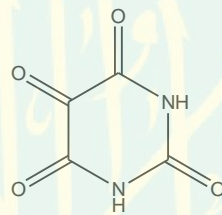
Mencit (*Mus musculus*) merupakan hewan yang mudah ditangani, bersifat penakut dan fotofobik, cenderung sembunyi dan berkumpul, lebih aktif pada malam hari, memiliki suhu normal badan 37,5°C, dan laju respirasi normal 163/menit. Mencit hidup di daerah yang cukup luas penyebarannya, mulai dari iklim dingin, sedang maupun panas dan dapat hidup terus-menerus dalam kandang atau secara bebas. Mencit dapat digunakan sebagai hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian biologis maupun biomedis dan dipelihara secara intensif. Menurut Falconer (1981), mencit sebagai hewan percobaan sangat praktis untuk penelitian kuantitatif, karena sifatnya yang mudah berkembangbiak, mencit juga dapat digunakan sebagai hewan model untuk mempelajari seleksi terhadap sifat-sifat kuantitatif. Oleh karena itu mencit banyak digunakan sebagai hewan coba penelitian dalam bidang obat-obatan, genetik, diabetes mellitus dan obesitas. Menurut Smith dan Mangkoewidjojo (1998), sifat-sifat biologis mencit ditunjukkan pada Tabel 2.5 (Andri 2007).

Tabel 2.5 Sifat biologis mencit (*Mus musculus*)

Kreteria	Keterangan
Lama bunting	19-21 hari
Umur sapih	21 hari
Umur dewasa	35 hari
Umur dikawinkan	8 minggu
Berat dewasa	
• Jantan	20-40 g
• Betina	18-35 g
Berat sapih	18-20 g
Kecepatan tumbuh	1 g / hari
Siklus estrus	4-5 hari
Perkawinan	Pada waktu estrus
Fertilitas	2 jam setelah kawin
Aktivitas	Nokturnal (malam)
Berat lahir	0.5-1,0 g

2.6 Aloksan

Aloksan (2,4,5,6-tetraoksipirimidin; 5,6-dioksiurasil) merupakan senyawa hidrofilik dan tidak stabil (Gambar 2.10). Aloksan memiliki rumus molekul $C_4H_2N_2O_4$ dengan nama lain mesoxalyl carbamida, merupakan senyawa hasil kondensasi yang berasal dari satu molekul urea dengan satu molekul asam mesooksalat. Aloksan memiliki efek diabetogenik ketika diberikan secara intravena, intraperitoneal atau subkutan. Dosis yang diperlukan untuk menginduksi tergantung pada spesies, rute pemberian dan status nutrisi. Hewan yang dipuaskan akan lebih rentan terhadap aloksan (Szkudelski, 2001).

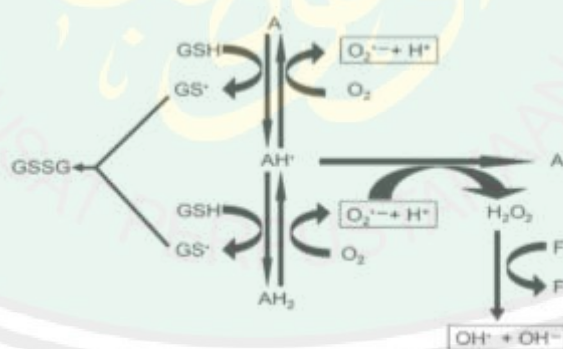


Gambar 2.9 Struktur kimia aloksan (Nugroho, 2011)

Kondisi diabetes atau hiperglikemia pada hewan coba ditimbulkan melalui pemberian zat diabetogen seperti aloksan. Diabetogen dapat menyebabkan keadaan hiperglikemia permanen dalam dosis yang tinggi, misalnya aloksan dan streptozotosin. Keduanya adalah analog sitotoksik glukosa (Lenzen, 2008). Dalam penelitian ini menggunakan diabetogen aloksan karena aloksan dapat merusak sel secara spesifik pada sel β pankreas (Nugroho, 2011).

Aloksan secara cepat dapat merusak pankreas, aksinya diawali oleh pengambilan yang cepat oleh sel β Langerhans. Terjadi proses reduksi dalam sel beta pankreas dengan adanya agen pereduksi seperti kelompok *glutathione* (GSH), sistein, askorbat dan ikatan protein sulfidril (-SH). Aloksan bereaksi

dengan dua gugus $-SH$ pada situs pengikatan gula oleh enzim glukokinase dan membentuk ikatan disulfida yang menyebabkan inaktivasi enzim. Hasil dari reduksi aloksan membentuk asam dialurat. Selanjutnya asam dialurat mengalami reoksidasi menjadi aloksan melalui siklus redoks yang menghasilkan spesies oksigen reaktif (ROS) dan radikal superoksida ($O_2\bullet$). Radikal superoksida mengalami dismutasi karena adanya superoksida dismutase menghasilkan hidrogen peroksida (H_2O_2). Hidrogen peroksida yang tidak terdismutasi akibat kurangnya enzim SOD akan membentuk radikal hidroksil ($OH\bullet$). Adanya ion ferro dan hidrogen peroksida membentuk radikal hidroksi yang sangat reaktif melalui reaksi fenton (Nugraho, 2011). Radikal hidroksil akan terus terbentuk yang menyebabkan sel beta pankreas mengalami destruksi dan insulin tidak terbentuk sehingga kadar glukosa darah meningkat (Rohillah and Shahjad 2012; Yuriska, 2009 dalam Andriyeani, 2015). Berikut adalah mekanisme induksi aloksan turunan spesies oksigen reaktif sel beta pankreas (Lenzen, 2008).



Gambar 2.10 Reaksi siklis redoks antara aloksan dan asam dialurat. A, aloksan; AH•, aloksan radikal; AH₂, asam dialurat; GS•, glukokinase radikal; GSSG, oksida glukosa; OH•, hidroksil radikal; O₂^{•-}, superoksida radikal (Lenzen, 2008).

Faktor lain selain pembentukan oksigen reaktif adalah gangguan pada homeostatis kalsium intraseluler. Aloksan dapat meningkatkan konsentrasi ion

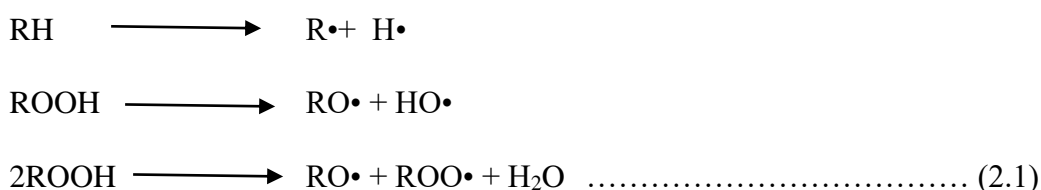
kalsium bebas sitosolik pada sel β Langerhans pankreas. Influx kalsium akibat aloksan tersebut mengakibatkan depolarisasi sel β Langerhans. Pada kondisi tersebut, konsentrasi insulin meningkat sangat cepat, dan secara signifikan mengakibatkan gangguan pada sensitivitas insulin perifer dalam waktu singkat (Nugroho, 2011).

2.7 Radikal Bebas

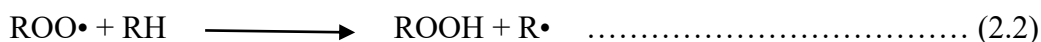
Radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa reaktif, yang secara umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan pada orbital luarnya. Adanya elektron tidak berpasangan ini menyebabkan radikal bebas secara kimiawi menjadi sangat reaktif dan tidak stabil (Winarsi, 2007). Radikal bebas dapat bermuatan positif, negatif dan tidak bermuatan (Setiawan, 2005).

Radikal bebas terbentuk dari metabolisme dalam tubuh (internal) dan dari luar tubuh (eksternal). Dari dalam tubuh mencakup superoksida ($O_2\bullet$), hidroksil ($OH\bullet$), peroksil ($ROO\bullet$), hidrogen peroksida (H_2O_2), oksigen tunggal ($1O_2$), oksida nitrit ($NO\bullet$) dan peroksinitrit ($ONOO\bullet$). Dari luar tubuh antara lain berasal dari: asap rokok, polusi, radiasi, sinar UV, obat, pestisida, limbah industri dan ozon (Siswono, 2005). Pembentukan radikal bebas terjadi melalui tiga tahap yaitu sebagai berikut (Winarsi 2007).

Tahap inisiasi yaitu awal pembentukan radikal bebas



Tahap propagasi yaitu pemanjangan rantai radikal



Tahap terminasi yaitu bereaksinya senyawa radikal dengan radikal lain sehingga kondisi propagasinya rendah.



Radikal bebas dalam tubuh manusia salah satunya berupa *Reactive oxygen species* (ROS). Spesies oksigen reaktif (ROS) berperan terhadap patogenesis berbagai inflamasi dan disfungsi sel beta (β). Hiperglikemi menyebabkan peningkatan ROS dalam mitokondria yang berakibat kerusakan *deoxyribonucleat acid* (DNA). Menurunnya kadar enzim antioksidan sel menjadikan sel β pankreas rentan terhadap stres oksidatif. Reaktifitas radikal bebas akan berdampak mulai dari kerusakan sel atau jaringan, autoimun, penyakit degeneratif seperti kanker, aterosklerosis, jantung koroner dan diabetes mellitus. Pada pengidap diabetes yang glukosanya tidak terkontrol, terjadi peningkatan radikal bebas dan aktivitas enzim antioksidan yang rendah sehingga perlu asupan antioksidan untuk menetralkan radikal bebas tersebut. Untuk itu perlu dicari bahan pangan yang dapat mengurangi kasus penyakit diabetes mellitus yang memiliki keamanan tinggi dan mempunyai aktivitas antioksidan dan bersifat hipoglikemi (Retnaningsih dkk., 2013).

2.8 Antioksidan

Antioksidan adalah substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein dan lemak. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif.

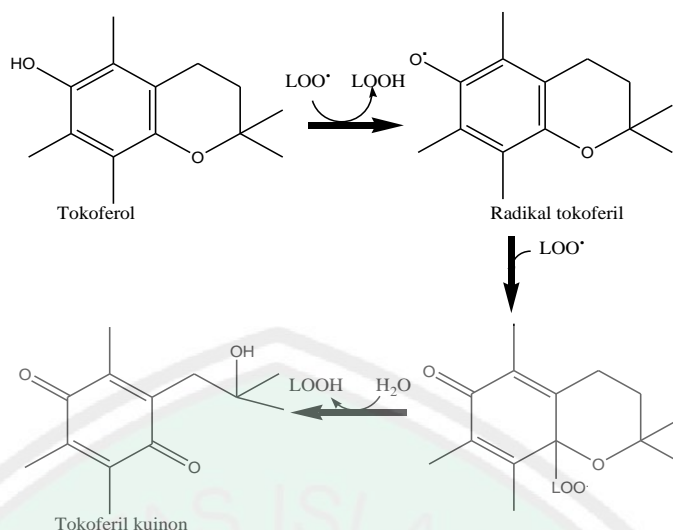
Antioksidan dalam pengertian kimia adalah senyawa pemberi elektron (*electron donor*), dalam arti biologis antioksidan adalah semua senyawa yang dapat meredakan radikal bebas dan *reactive oxygen species* (ROS) yang bersifat oksidan termasuk protein pengikat logam. Enzim-enzim yang dapat memusnahkan radikal bebas adalah *superoksida dismutase* (SOD), *glutathion peroksidase* (GPx), dan katalase. Antioksidan sering diistilahkan sebagai peredam dan pemerangkap *scavenger* radikal bebas yaitu molekul yang dapat bereaksi dengan radikal bebas dan berfungsi menetralkan radikal bebas (Percival, 1998).

Sumber antioksidan berdasarkan mekanisme kerjanya digolongkan menjadi tiga kelompok yaitu antioksidan primer meliputi enzim *superoksida dismutase* (SOD), katalase dan *glutathion peroksidase* (GSH-Px). Antioksidan primer disebut juga antioksidan enzimatis. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan primer, apabila dapat memberikan atom hidrogen secara cepat pada senyawa radikal, kemudian radikal antioksidan yang terbentuk segera berubah menjadi senyawa yang lebih stabil. Sumber kedua yaitu antioksidan sekunder disebut juga dengan antioksidan non enzimatis. Antioksidan ini berupa komponen non nutrisi dan komponen nutrisi dari sayuran dan buah-buahan. Antioksidan

sekunder meliputi vitamin E, vitamin C, karoten, bilirubin dan albumin. Senyawa antioksidan non enzimatis akan menangkap radikal bebas kemudian mencegah reaktivitas amplifikasinya. Sumber ketiga yaitu antioksidan tersier meliputi sistem enzim *DNA-repair* dan *metionin superoksida reduktase*. Enzim-enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas (Winarsi, 2007).

Vitamin E (tokoferol) merupakan antioksidan golongan steroid yang terkandung dalam bekatul. Vitamin E adalah suatu zat penyapu radikal bebas yang lipofilik. Vitamin ini berfungsi sebagai pelindung terhadap peroksidasi lemak di dalam membran. Dari tiga vitamin yang memiliki kemampuan berfungsi sebagai antioksidan dan menghentikan reaksi berantai radikal bebas (vitamin E, vitamin C, dan karotenoid), vitamin E adalah satu-satunya yang berperan fisiologis semata-mata untuk menyingkirkan radikal bebas (Marsk, 2000).

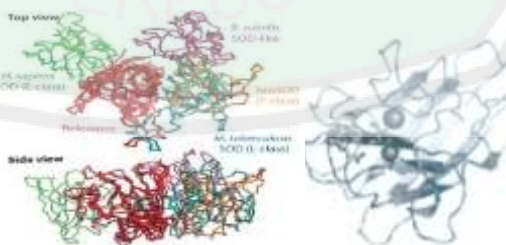
Vitamin E terdiri dari struktur tokoferol, dengan berbagai gugus metil yang melekat padanya, dan sebuah rantai sisi fitil. Di antara struktur tersebut, tokoferol- α adalah antioksidan yang paling kuat. Vitamin E adalah penghenti reaksi penyebar radikal bebas yang efisien di membran lemak karena bentuk radikal bebas distabilkan oleh resonansi. Oleh karena itu, radikal vitamin E memiliki kecenderungan kecil untuk mengekstraksi sebuah atom hydrogen dari senyawa lain dan menyebarkan reaksi. Sebaliknya, radikal vitamin E dapat berinteraksi secara langsung dengan radikal peroksi lemak sehingga ia kehilangan atom hidrogen lainnya, dan menjadi tokoferil kuinon yang teroksidasi sempurna. Reaksi peredaman radikal bebas oleh tokoferol ditunjukkan pada Gambar 2.11.



Gambar 2.11 Reaksi peredaman radikal bebas oleh senyawa tokoferol (Marsk, 2000)

2.9 Superoksida Dismutase (SOD)

Superoksida dismutase merupakan metaloenzim yang aktivitasnya tergantung adanya kofaktor logam Cu, Zn dan Mn (Fridovich, 2006). SOD pertama kali diisolasi oleh Mann dan Kleilin pada tahun 1938. Enzim ini dikenal dengan sebutan eritrocuprein, indolefenol oksidase dan tetrazolium oksidase. Enzim SOD tersusun atas sembilan macam asam amino dengan komponen utama tirosin dan lisin. Struktur representatif tiga dimensi enzim yang merupakan protein ini disajikan dalam Gambar 2.12.



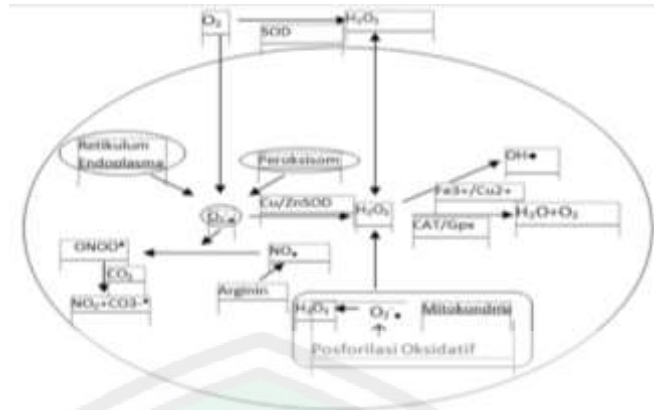
Gambar 2.12 Struktur Representatif Tiga Dimensi SOD (Nurhayati,2011)

Aktivitas enzim SOD memiliki peran penting dalam sistem pertahanan tubuh, terutama terhadap aktivitas senyawa oksigen yang reaktif yang dapat

menyebabkan stress oksidatif (Winarsi, 2007). Superoksida dismutase termasuk enzim primer yang memiliki peran penting dalam pertahanan tubuh (Retnaningsih dkk., 2013). Keberadaan aktivitas SOD bervariasi pada organ tubuh yaitu terdapat dalam jumlah yang tinggi pada hepar selanjutnya kelenjar adrenal, ginjal, darah, limpa, pankreas, otak, paru-paru, lambung, usus dan ovarium (Permana, 2007).

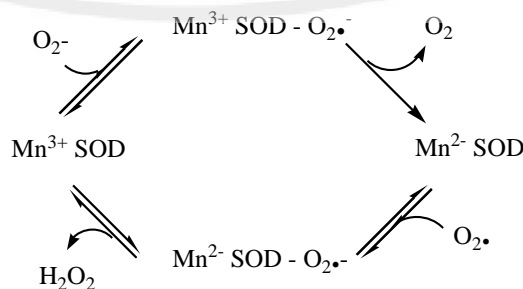
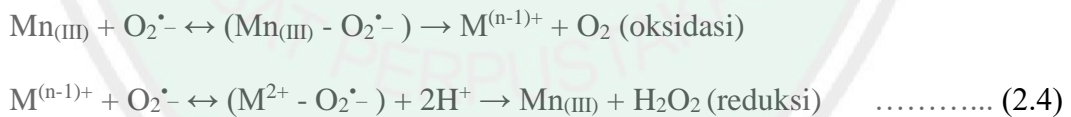
Beberapa jenis SOD yang sudah diketahui, yaitu CuZnSOD, Mn-SOD dan FeSOD. Antioksidan CuZnSOD terdapat pada retikulum endoplasma, nukleus dan peroksisom, Mn-SOD terdapat di mitokondria, sedangkan FeSOD tidak terdapat pada manusia. Logam Cu^+ sebagai katalisator sedangkan Zn^{2+} diperlukan sebagai stabilisator enzim. Penurunan kadar SOD berimplikasi terhadap beberapa kondisi dan penyakit seperti, arthritis, anemia Fanconi, infeksi saluran pernapasan, katarak dan infertile. Jadi, pengukuran SOD dapat dipakai untuk mendiagnosis seperti kanker, jantung koroner maupun diabetes (Winarsi, 2007).

Produksi ROS umumnya terjadi di mitokondria. Mitokondria menghasilkan radikal superoksida. Superoksida adalah molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan yang diproduksi dalam level yang tinggi sebagai hasil fosforilasi oksidatif dan akan diubah menjadi senyawa H_2O_2 yang stabil oleh MnSOD. Namun H_2O_2 berpotensi untuk berinteraksi dengan berbagai molekul yang dapat menimbulkan kerusakan sel, terutama dengan adanya ion logam Fe^{2+} sehingga akan memecah hidrogen superoksida (H_2O_2) yang bersifat tidak reaktif menjadi radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) yang reaktif. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.13. sehingga radikal hidroksil dapat melukai molekul di dalam tubuh. (Loyal, 2016).



Gambar 2.13 Produksi dan mekanisme radikal bebas (Loyal, 2016).

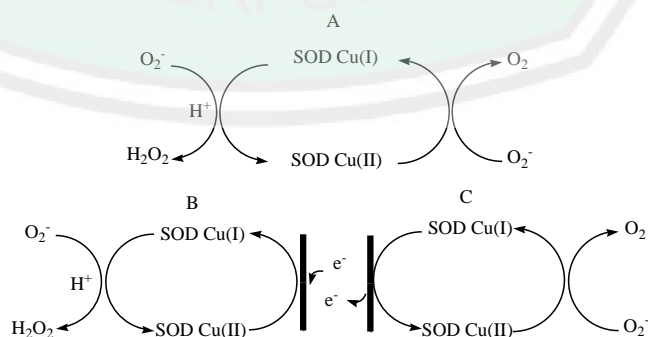
SOD berfungsi sebagai enzim yang mengkatalisis proses dismutasi ion superoksida ($O_2^{\bullet-}$) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2) melalui reaksi oksidasi dan reduksi. Umumnya mitokondria merupakan sumber utama dalam produksi $O_2^{\bullet-}$. MnSOD berperan penting dalam melindungi sel dari stress oksidatif. Selain itu metaloenzim diluar sel yaitu CuSOD juga berperan dalam proses tersebut. Reaksi enzimatik oleh MnSOD terdiri dari reaksi biomolekuler dengan siklus katalitik yang melibatkan dua setengah reaksi yang berbeda, dimana dalam reaksi oksidasi, substrat ($O_2^{\bullet-}$) dioksidasi menjadi O_2 dan dalam reaksi reduksi, $O_2^{\bullet-}$ diubah menjadi H_2O_2 . Reaksi katalisis yang terjadi pada MnSOD ditunjukkan pada Gambar 2.14.



Gambar 2.14 Reaksi katalisis enzim MnSOD terhadap peredaman radikal superoksida (Sari dan Amanah, 2014)

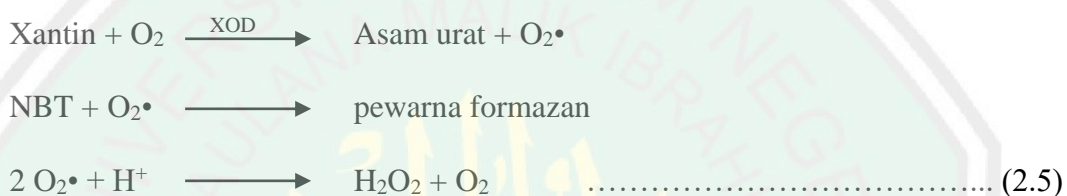
Nahari (2015), menjelaskan bahwa reaksi enzimatik oleh CuSOD yaitu anion superoksida ($O_2^{\bullet-}$) mengalami reduksi dengan adanya penambahan elektron sehingga menjadi $O_2^{\bullet-}$, kemudian $O_2^{\bullet-}$ bereaksi dengan $2H^+$ membentuk H_2O_2 . Selain itu reaksi oksidasi Cu^+ menjadi Cu^{2+} dengan memberikan elektronnya kepada $O_2^{\bullet-}$. Terjadi juga reaksi oksidasi spontan dari $O_2^{\bullet-}$ menjadi O_2 dengan melepaskan elektron dan akan diterima oleh ion tembaga yaitu Cu^{2+} tereduksi menjadi Cu^+ . Reaksi dugaan katalisis yang terjadi pada CuSOD ditunjukkan pada Gambar 2.15.

Berdasarkan reaksi redoks oleh metaloenzim terbentuk senyawa radikal hidrogen peroksida (H_2O_2) yang bersifat kurang reaktif. Hidrogen peroksida diubah menjadi oksigen dan air oleh enzim *katalase* (Cat). Hal tersebut memicu terjadinya keseimbangan antar radikal bebas dengan peredam radikal. Akan tetapi, dapat terjadi ketidakseimbangan apabila kadar ROS di dalam tubuh berlebihan, sehingga SOD tidak mampu menetralkan ROS dalam tubuh. Peningkatan produksi ROS menimbulkan kerusakan dan disfungsi jaringan dengan menyerang, mendenaturasi dan memodifikasi struktur dan fungsi molekul. Hal inilah yang menyebabkan kerusakan pada ginjal. Sehingga perlu diperoleh antioksidan eksogen untuk menekan terjadinya penyebaran kerusakan sel dan komplikasi.



Gambar 2.15 Reaksi oksidasi reduksi oleh CuSOD. (A) Dismutasi $O_2^{\bullet-}$; (B) Reaksi reduksi; (C) Reaksi oksidasi yang dimediasi oleh SOD Cu (I/II) pasangan redoks dibatasi oleh permukaan elektroda (Anonymous^b, 2013 dalam Nahari, 2015).

Aktivitas SOD dapat ditetapkan dengan beberapa cara, namun sebagian besar pengukurannya dilakukan secara tidak langsung. Salah satu pengukuran aktivitas SOD dapat dilakukan berdasarkan metode spektrofotometri dengan menginduksi radikal superoksida yang dihasilkan dari reaksi antara xantin dan xantin oksidase. Radikal superoksida nantinya akan bereaksi dengan sitokrom C atau dengan nitro biru tetrazolium (NBT) menghasilkan warna formazan ungu kebiruan. Warna yang terbentuk diukur dengan spektrofotometer sinar tampak pada $\lambda=580$ nm. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut (Rahman dkk., 2012).



2.10 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer yang sesuai untuk pengukuran di daerah spektrum ultraviolet dan sinar tampak terdiri dari suatu sistem optik dengan kemampuan menghasilkan sinar monokromatis dalam jangkauan panjang gelombang 200-800 nm. Suatu spektrum ultraviolet meliputi daerah ultraviolet (190-380 nm), spektrum *Vis (Visible)* bagian sinar tampak (380-780) (Gandjar, 2007).

Prinsip kerja spektrofotometer adalah bila cahaya (monokromatik maupun campuran) jatuh pada suatu medium homogen, sebagian dari sinar masuk akan dipantulkan, sebagian diserap, dan sisanya diteruskan. Nilai yang keluar dari cahaya yang diteruskan dinyatakan dalam nilai absorbansi dan berbanding lurus dengan konsentrasi sampel. Spektrofotometer UV-Vis tersusun atas sumber spektrum yang kontinyu, monokromator, sel pengabsorpsi untuk larutan sampel

atau blanko dan suatu alat untuk mengukur perbedaan absorpsi antara sampel dan blanko ataupun pembanding (Khopkar, 1990).

Pengukuran dengan alat spektrofotometer UV-Vis didasarkan pada hubungan antara berkas radiasi elektromagnetik yang di transmisikan (diteruskan) atau yang diabsorpsi dengan tebalnya cuplikat dengan konsentrasi dari komponen penyerap. Hubungan tersebut dinyatakan dalam Hukum Lambert-Beer (Gandjar, 2007):

$$A = a \cdot b \cdot c \dots\dots\dots(2.6)$$

Keterangan:

- a = Daya serap
- b = Tebal kuvet
- c = Konsentrasi larutan
- A = Absorbansi sampel



BAB III

METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari hingga Agustus 2018 di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Laboratorium Fisiologi Hewan Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang serta Laboratorium FAAL Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam ekstraksi adalah seperangkat alat gelas, ayakan 60 mesh, penyaring *Buchner*, *rotary evaporator*, oven, neraca analitik, kertas saring *Whatman*, desikator, *aluminium foil* dan shaker.

Alat yang digunakan untuk uji fitokimia yaitu seperangkat alat gelas, pipet tetes dan lemari asam. Kemudian alat yang digunakan untuk antidiabetes yaitu dalam pemeliharaan mencit antara lain: kandang berupa kotak berukuran 20 × 30 × 40 cm, sarung tangan, botol minum dan tempat makan. Alat untuk perlakuan induksi antara lain: jarum suntik dan alat-alat gelas. Kemudian alat untuk mengukur kadar glukosa yaitu gunting, kapas dan glukotest merk *GlucoDr*. Alat untuk perlakuan terapi antara lain: alat gelas, spuit 1 mL, sarung tangan dan sonde. Untuk perlakuan membedah dan mengambil organ hewan coba antara lain: gunting steril, jarum pentul, kapas, plastik, pinset dan cawan petri, meja preparat

dan lemari *freezer*. Alat pemeriksaan kadar SOD diantaranya alat gelas, mikropipet, tabung endroff, vortex, neraca analitik, inkubator, sentrifus dan spektrofotometer UV-Vis.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bekatul beras padi diperoleh dari mesin penggiling di daerah Gresik, Jawa Timur. Bahan yang digunakan dalam ekstraksi maserasi antara lain: aquades, etanol 96% dan gas N₂. Bahan untuk uji fitokimia adalah reagen Dragendorff, reagen Mayer, metanol 50%, logam Mg, HCl 2%, HCl pekat, kloroform, asam asetat anhidrat, aquades larutan FeCl₃ 1%, H₂SO₄ dan HCl 1 N. Bahan uji antidiabetes berupa mencit jenis (*Mus musculus*) jantan, berumur 2-3 bulan, dengan berat badan 20-30 gram. Bahan pemeliharaan mencit yaitu makanan mencit, air minum dan serbuk kayu. Bahan untuk membuat mencit dalam kondisi diabetes yaitu aloksan, larutan NaCl 0,9 % dan CMC Na 0,5%. Bahan pengukuran aktivitas SOD antara lain organ pankreas, alkohol 70%, *Superoksida dismutase* (SOD) murni, *Xantine*, *Xantine oksidase*, *Nitroblue tetrazolium* (NBT) dan *phosphate buffer saline* (PBS).

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel bekatul beras padi yang diambil dari hasil penggilingan. Bekatul disaring dengan ukuran 60 mesh dan dilakukan analisis kadar air selanjutnya dimaserasi menggunakan etanol 96%. Bekatul yang telah dimaserasi kemudian diekstraksi dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kasar. Ekstrak kemudian dialiri gas N₂ dengan tujuan menghilangkan sisa pelarut dan selanjutnya diuji sebagai antidiabetes. Ekstrak

yang diperoleh dimasukkan kedalam gelas vial dan dilapisi dengan aluminium foil yang disimpan pada suhu 4°C.

Ekstrak kasar dilanjutkan dengan uji fitokimia menggunakan uji reagen, pengujian meliputi senyawa alkaloid, flavonoid, tannin, saponin dan terpenoid. Setiap perlakuan menggunakan 4 ekor mencit yang ditunjukkan sebagai berikut

- a. 4 ekor kontrol negatif (menderita diabetes) yang diinduksi aloksan dosis 5,6 mg/20 g BB (K-)
- b. 4 ekor kontrol normal tanpa perlakuan (K0)
- c. 4 ekor yang diterapi ekstrak bekatul dosis 9,8 mg/20 g BB + CMC Na 0,5% (D1).
- d. 4 ekor yang diterapi dengan dosis 11,2 mg/20 g BB + CMC Na 0,5% (D2).
- e. 4 ekor yang diterapi dengan dosis 14 mg/20 g BB + CMC Na 0,5% (D3).

Selanjutnya dilakukan uji aktivitas SOD pada organ ginjal dengan metode spektrofotometri. Selanjutnya dilakukan analisis *One Way ANOVA* menggunakan SPSS.

3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Preparasi sampel
2. Analisis kadar air
3. Ekstraksi menggunakan metode maserasi
4. Uji fitokimia dengan reagen
5. Uji antidiabetes

5.1 Penyiapan hewan coba

5.2 Perlakuan hewan coba

5.3 Pembuatan larutan aloksan

5.4 Pembuatan mencit diabetes

5.5 Pembuatan kontrol normal dan kontrol negatif mencit diabetes

5.6 Terapi mencit diabetes dengan ekstrak bekatul

5.7 Pembedahan mencit

6. Pengukuran aktivitas SOD (*Superoksida dismutase*)

7. Analisis data

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Preparasi Sampel

Bekatul yang digunakan dalam penelitian ini adalah bekatul dari jenis beras putih hasil penggilingan padi. Bekatul sebanyak 250 gram diayak dengan ayakan ukuran 60 mesh dan dibungkus dengan *aluminium foil*. Setelah itu, sampel dioven selama 60 menit pada suhu 40 °C, kemudian didinginkan pada suhu ruang. Sampel kering dan disimpan untuk analisis lebih lanjut.

3.5.2 Penetapan Kadar Air (AOAC, 1984)

Sampel yang telah dipreparasi, selanjutnya dilakukan penetapan kadar air pada sampel bekatul. Disiapkan cawan porselen kemudian di oven pada suhu 100-105 °C sekitar 15 menit untuk menghilangkan kadar air yang terdapat pada cawan porselen. Kemudian, cawan porselen kering disimpang dalam desikator selama 10 menit, kemudian ditimbang berat cawan porselen kosong hingga diperoleh berat cawan yang konstan. Selanjutnya, ditimbang dan dimasukkan 5 gram sampel bekatul ke dalam cawan porselen dan di oven pada suhu 100-105 °C sekitar 15

menit untuk menghilangkan kadar air yang terdapat pada sampel. Kemudian sampel didinginkan dalam desikator selama 10 menit dan ditimbang. Selanjutnya sampel dipanaskan kembali dalam oven sekitar 15 menit dan didinginkan dalam desikator selama 10 menit dan ditimbang kembali hingga diperoleh berat konstan. Diulang perlakuan ini hingga diperoleh berat konstan. Kadar air dalam bekatul dapat dihitung menggunakan persamaan (3.1) (AOAC, 1984):

$$\text{kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\% \dots \dots \dots (3.1)$$

Keterangan: a = Bobot cawan kosong
 b = Bobot cawan + sampel sebelum dikeringkan
 c = Bobot cawan + sampel setelah dikeringkan

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}} \dots \dots \dots (3.2)$$

$$\% \text{ kadar air terkoreksi} = \text{kadar air} - \text{faktor koreksi} \dots \dots \dots (3.3)$$

Kadar air yang dihasilkan diharapkan mencapai < 10% sehingga kadar air tidak berpengaruh pada proses ekstraksi meserasi.

3.5.3 Ekstraksi bekatul

Ekstraksi pada bekatul menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Sebanyak 250 gram bekatul direndam menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1,5 L. Ini berdasarkan perbandingan bahan dengan pelarut adalah 1:6 b/v yaitu 40 g sampel dalam 240 mL (Andriyani dkk., 2015). Kemudian dimaserasi dengan dishaker selama 24 jam dan disaring menggunakan penyaring vakum. Ampas dimaserasi kembali selama 2 hari dengan perlakuan yang sama. Hasil filtrat 1 dan filtrat 2 yang diperoleh digabung dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu tidak lebih dari 60°C. Kemudian, dialiri dengan gas N₂ untuk menghilangkan pelarut yang masih tersisa pada ekstrak kasar. Ekstrak pekat

dimasukkan ke dalam gelas vial yang dilapisi aluminium dan disimpan pada suhu 4°C. Kemudian dihitung rendemen dari ekstrak bekatul dengan persamaan berikut (Harborne, 1987):

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \dots\dots\dots(3.4)$$

3.5.4 Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Bekatul

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif pada ekstrak bekatul. Cara pengujiannya yaitu ekstrak bekatul dilarutkan dalam masing-masing pelarut. Selanjutnya dilakukan uji alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, dan steroid (Indrayani dkk, 2006).

3.5.4.1 Uji Alkaloid (Astuti, 2012)

Sebanyak 0,5 mL ekstrak bekatul konsentrasi 10.000 ppm dimasukkan ke tabung reaksi, ditambah 0,5 mL HCl 2% dan larutan dibagi dalam dua tabung reaksi. Tabung 1 ditambah 2-3 tetes reagen Dragendorff apabila mengandung alkaloid maka akan memberikan warna kuning-merah dan tabung 2 ditambah 2-3 tetes reagensia Mayer. Jika membentuk endapan warna putih maka menunjukkan sampel mengandung alkanoid.

3.5.4.2 Uji Flavonoid (Astuti, 2012)

Ekstrak bekatul sebanyak 0,5 mL konsentrasi 10.000 ppm diambil dan ditambahkan 2 mL metanol panas 50%. Kemudian ditambahkan 4-5 tetes HCl pekat dan logam Mg secukupnya. Apabila terbentuk warna warna merah atau jingga maka menunjukkan adanya senyawa flavonoid dalam sampel.

3.5.4.3 Uji Steroid dan Triterpenoid (Astuti, 2012)

Ekstrak bekatul sebanyak 0,5 mL konsentrasi 10.000 ppm dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 0,5 mL kloroform, 1 mL asetat anhidrat dan

0,5 mL H₂SO₄ pekat. Larutan dikocok perlahan dan dibiarkan selama beberapa menit. Steroid akan memberikan warna biru atau hijau membentuk cincin, sedangkan triterpenoid memberikan warna merah atau ungu.

3.5.4.4 Uji Saponin (Astuti, 2012)

Ekstrak bekatul sebanyak 0,5 mL konsentrasi 10.000 ppm dimasukkan pada tabung reaksi dan ditambahkan 0,5 mL aquades sambil dikocok selama 1 menit, lalu ditambahkan 2 tetes HCl 1 N. Apabila terbentuk busa yang tetep stabil \pm 7 menit, maka ekstrak positif mengandung saponin.

3.5.4.5 Uji Tanin (Kurniawan dkk, 2013)

Ekstrak bekatul sebanyak 0,5 mL konsentrasi 10.000 ppm dimasukkan ke tabung reaksi ditambahkan 3 tetes FeCl₃ 1%. Terbentuknya warna hijau kebiruan atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin.

3.5.5 Uji Antidiabetes

3.5.5.1 Penyiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah mencit jenis (*Mus musculus*) jantan, berumur 2-3 bulan, dengan berat badan 20-30 gram. Sebelum perlakuan, mencit dipelihara dalam kandang berukuran 20 x 30 x 40 cm yang diberi alas serbuk kayu dan anyaman kawat sebagai penutup kandang. Kemudian dilengkapi dengan tempat makanan dan botol minum. Pemberian makan dan minum dilakukan setiap hari sebanyak 2 kali setiap pagi dan sore.

3.5.5.2 Perlakuan Hewan Coba

Penelitian dilakukan dengan enam kelompok perlakuan. Jumlah sampel dari tiap kelompok perlakuan dihitung menggunakan persamaan Federer (Felicia, 2009).

$$\text{Persamaan Federer} = (n-1) (t-1) \geq 15 \dots\dots\dots(3.5)$$

Keterangan: t = jumlah kelompok

n = jumlah pengulangan tiap sampel

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

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

$$4n - 4 \geq 15 \text{ maka, } n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan maka jumlah sampel yang diperlukan oleh setiap kelompok perlakuan adalah 4 ekor mencit. Sehingga jumlah minimal sampel yang digunakan adalah 20 ekor mencit. Hewan coba dirawat di *animal house* Laoratorium Jurusan Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Ketentuan dari tiap-tiap kelompok adalah sebagai berikut.

- a. Kelompok kontrol negatif yaitu yang diinduksi aloksan dengan dosis 5,6 mg/20 g BB + NaCl 0,9% (K-).
- b. Kelompok kontrol normal tanpa perlakuan (K0).
- c. Kelompok mencit yang diterapi ekstrak bekatul dengan dosis 9,8 mg/20 g BB + CMC Na 0,5% (D1)
- d. Kelompok mencit yang diterapi ekstrak bekatul dengan dosis 11,2 mg/20 g BB + CMC Na 0,5% (D2)
- e. Kelompok mencit yang diterapi ekstrak bekatul dengan dosis 14 mg/20 g BB + CMC Na 0,5% (D3)

3.5.5.3 Pembuatan Larutan Aloksan dan Glukosa (Arifin dkk., 2007)

Aloksan digunakan dengan dosis sebesar 5,6 mg/20 g BB mencit dilarutkan dalam larutan NaCl 0,9% maksimal 1mL. Pembuatan larutan NaCl 0,9% dilakukan dengan cara ditimbang 0,9 g NaCl dilarutkan ke dalam aquades

dan ditandabatkan hingga 100 mL. Selanjutnya dikocok hingga homogen. Mencit dinyatakan telah terjangkit diabetes ditunjukkan dengan kadar glukosa darah mencapai ≥ 200 mg/dL. Pembuatan larutan glukosa 10% dengan cara melarutkan 10 g glukosa dalam 100 ml aquades.

3.5.5.4 Pembuatan Larutan CMC 0,5%

CMC-Na ditimbang sebanyak 0,25 g dan dilarutkan dengan aquades panas sebanyak 25 mL hingga homogen. Selanjutnya ditandabatkan hingga 50 mL. Sehingga diperoleh larutan CMC-Na 0,5% dalam 50 mL aquades.

3.5.5.5 Pengkondisian Mencit Diabetes Mellitus (DM)

Aloksan yang akan diinjeksikan diambil dari larutan stok. Volume yang diambil disesuaikan dengan berat badan mencit yang akan diinjeksi. Digunakan dosis 5,6 mg/20 g BB yang dilakukan 1 kali injeksi. Cara penginjeksian aloksan menggunakan langkah injeksi intraperitoneal, yaitu mencit diposisikan menghadap kearah frontal hingga terlihat bagian abdomennya. Pada daerah rongga abdomen yang sejajar dengan kaki disemprotkan alkohol 70%, kulit dicubit hingga terasa bagian ototnya. Kemudian spuit dimasukkan pada bagian abdomen dan segera dimasukkan aloksan secara perlahan. Selanjutnya dilepas spuit dari bagian abdomen mencit dan abdomen mencit disemprot dengan alkohol 70% kembali (Nahari, 2015). Injeksi aloksan dikakukan dengan rentan waktu sampai kadar glukosa darah mencit mencapai ≥ 200 mg/dl. Selanjutnya dilakukan terapi.

3.5.5.6 Pembuatan Kontrol Negatif dan Kontrol Normal Mencit Diabetes

Mencit kontrol negatif, yaitu kelompok yang di injeksikan aloksan 5,6 mg/20 g BB + NaCl 0,9%. Sedangkan pada kelompok kontrol normal, mencit tidak diberikan perlakuan (Ridwan dkk., 2012).

3.5.5.7 Terapi Mencit Diabetes dengan Ekstrak Bekatul

Mencit diabetes diterapi dengan ekstrak bekatul dengan dosis 9,8 mg/20 g BB; 11,2 mg/20 g BB dan 14 mg/20 g BB sebanyak 14 kali berturut-turut dalam waktu 14 hari. Kelompok kontrol normal tidak diberi perlakuan hanya diberi makanan dan minuman tanpa ekstrak bekatul. Sedangkan kelompok kontrol negatif diinjeksikan aloksan 5,6 mg/20 g BB + NaCl 0,9%. Pemberian terapi dilakukan secara oral menggunakan sonde lambung setiap pagi hari.

3.5.6 Pengukuran Aktivitas SOD

3.5.6.1 Pembuatan Larutan Standar Aktivitas SOD

Larutan standar SOD dibuat dari larutan stok SOD sebesar 1000 U/mL. Selanjutnya dilakukan pengenceran larutan masing-masing sebesar 10, 20, 40, 80 dan 100 U/mL dengan perhitungan yang dijelaskan pada Lampiran 6. Kemudian diambil masing-masing larutan sebanyak 100 μ L ditambah PBS pH 7,4 sebanyak 100 μ L kemudian disentrifuse selama 5 menit dengan kecepatan 2600 rpm μ L. Supernatan yang diperoleh diambil untuk mengukur aktivitas SOD. Diambil supernatan pada masing-masing larutan sebanyak 100 μ L ditambah larutan campuran *Xantine* 2,9 mL dan sitokrom c atau NBT dengan perbandingan 1:10 lalu divortex selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan *Xantine oksidase* 100 μ L lalu divortex selama 5 menit. Selanjutnya sampel diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 30 °C dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3500

rpm. Blanko yang digunakan pada pengukuran ini adalah PBS pH 7,4. Kemudian masing-masing sampel dengan aktivitas SOD 10, 20, 40, 80 dan 100 mL dan blanko dipindahkan kedalam kuvet. Kemudian dianalisis dengan spektrofotometer pada λ 580 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh dibuat kurva standar dan diperoleh persamaan $y = 0.9995x + 0.0525$ dan $R^2 = 0.9995$. Selanjutnya digunakan untuk mengukur aktivitas SOD pada sampel ginjal.

3.5.6.2 Analisis Aktivitas SOD Sampel Ginjal

3.5.6.2.1 Preparasi Sampel

Preparasi sampel merupakan langkah mengisolasi enzim SOD. Preparasi sampel organ ginjal diambil setelah dilakukan dislokasi leher dan pembedahan pada mencit. Kemudian ditimbang sebanyak 100 mg dan digerus hingga halus, lalu ditambah 100 μ L PBS pH 7,4, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Terbentuk 2 lapisan yaitu supernatant dan pelet. Diambil bagian supernatant kemudian ditampung dalam eppendorf dan dibungkus dengan *aluminium foil* disimpan pada suhu 2-8°C. Semua perlakuan dilakukan pada kondisi dingin agar enzim SOD yang diisolasi dalam keadaan inaktif dan mencegah terjadinya denaturasi protein.

3.5.6.2.2 Penentuan Aktivitas SOD pada Sampel

Diambil supernatan larutan silat sebanyak 100 μ L ditambah larutan campuran *Xantine* 2,9 mL dan sitokrom c atau NBT dengan perbandingan 1:10 lalu divortex selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan *Xantine oksidase* 100 μ L lalu divortex selama 5 menit. Selanjutnya sampel diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 30 °C dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3500 rpm. Blanko yang digunakan pada pengukuran ini adalah PBS pH 7,4. Kemudian

sampel dan blanko dipindahkan kedalam kuvet dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 580 nm (Chen et al., 1996). Setelah diperoleh nilai absorbansi sampel, maka dihitung aktivitas SOD dengan persamaan dari hasil kurva standar.

$$X = y - b / a \dots\dots\dots (3.6)$$

Keterangan:

- X = Kadar enzim (Unit/mL)
- y = Nilai absorbansi A580 nm
- b = Intercept
- a = Slope

3.6 Analisis Data

Data disajikan dalam bentuk tabel dan grafik disertai dengan deskripsi hasil. Analisis data hasil aktivitas *superoksida dismutase* (SOD) yang diperoleh dari semua kelompok diolah secara statistik menggunakan uji *One Way ANOVA* (Analisis Variasi Satu Arah) untuk melihat ada tidaknya perbedaan antar kelompok mengenai pengaruh penambahan konsentrasi ekstrak etanol 96% bekatul terhadap aktivitas enzim *superoksida dismutase* (SOD) organ pankreas pada mencit. Jika terdapat perbedaan secara bermakna, dilanjutkan dengan uji Duncan yang bertujuan untuk mengetahui kelompok mana saja yang memiliki perbedaan yang nyata jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dan kontrol positif pada taraf nyata 0.05 (Saleh dkk, 2012).

BAB IV

PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Bekatul (*Rice bran*) dan Analisis Kadar Air

Penelitian ini menggunakan sampel bekatul (*Rice bran*) yang diambil dari hasil proses penggilingan padi di daerah Gresik. Preparasi sampel bekatul dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu bekatul melalui proses pengayakan dengan ukuran 60 mesh yang berfungsi untuk meratakan ukuran sampel sehingga dapat mendukung proses ekstraksi dengan baik. Menurut Voight (1995), bahwa semakin kecil ukuran partikel maka semakin besar luas permukaan simplisia, yang menjadikan dinding sel lebih sering berinteraksi dengan pelarut sehingga dapat mengambil senyawa-senyawa aktif secara maksimal.

Simplisia bekatul selanjutnya dianalisis kadar air menggunakan metode termogravimetri. Analisis kadar air dilakukan untuk mengetahui persentase kandungan air dalam simplisia bekatul berdasarkan berat kering. Winarno (2004), analisis kadar air dilakukan dengan pemanasan dengan suhu 100 - 105 °C selama 2-3 jam hingga diperoleh berat konstan. Selanjutnya selisih berat sebelum pengeringan dan setelah pengeringan merupakan kadar air yang menguap. Hasil kadar air yang diperoleh dari simplisia bekatul dalam penelitian ini adalah 1,12 % dengan perhitungan seperti pada Lampiran 5.

Kadar air yang rendah menunjukkan bahwa sampel berpotensi untuk dapat diekstrak secara maksimal oleh pelarut. Kadar air suatu sampel akan baik jika memiliki persentase ≤ 10 %, ini telah sesuai dengan standar Farmakope Herbal Indonesia (Depkes, 2008). Hal ini menunjukkan bahwa bahan mencapai

kestabilan optimum dan dapat mencegah pertumbuhan mikroba pada saat ekstraksi. Semakin kecil kadar air maka semakin banyak pelarut dapat mengekstrak suatu sampel sehingga komponen senyawa aktif dapat diperoleh lebih maksimal.

4.2 Ekstraksi Bekatul (*Rice bran*)

Ekstraksi dilakukan untuk mengisolasi senyawa aktif dalam suatu sampel dan metode yang digunakan yaitu ekstraksi maserasi. Ekstraksi maserasi merupakan metode yang dilakukan dengan cara merendam simplisia dengan pelarut dalam suhu ruang dan waktu yang ditentukan. Ditjen POM (2000) memaparkan bahwa kelebihan dari metode maserasi yaitu tidak merusak kandungan senyawa aktif pada sampel dan prosesnya cukup sederhana.

Ekstraksi maserasi bekatul dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 96 %. Pelarut etanol 96 % memiliki sifat semi polar hingga polar sehingga dapat mengekstrak kandungan senyawa aktif dalam bekatul. Purwanto dkk., (2014), dalam penelitiannya menyatakan bahwa bekatul mengandung senyawa-senyawa polar seperti asam lemak berupa asam oleat, linoleat, linolenat, palmitat, dan stearat.

Maserasi dilakukan selama 24 jam dengan pengocokan pada kecepatan 120 rpm pada suhu ruang. Proses pengocokan bertujuan untuk memaksimalkan kontak antara sampel dengan pelarut. Semakin meningkat interaksi antara sampel dan pelarut maka semakin mudah pelarut dapat menembus dinding sel dan mendesak senyawa aktif pada sampel, sehingga jumlah ekstrak yang diperoleh optimum. Filtrat dan residu dipisahkan dengan proses penyaringan menggunakan

corong *Buchner* karena memiliki kelebihan dapat menyaring secara cepat dengan memperkecil tekanan dalam sistem dengan cara menghisap menggunakan pompa vakum sehingga filtrat dalam pengalir dengan cepat. Filtrat yang diperoleh berwarna kuning kecoklatan. Dilakukan remaserasi kembali dengan perlakuan yang sama yang bertujuan untuk mendapatkan senyawa aktif dengan maksimal.

Filtrat hasil penyaringan dipekatkan dengan tujuan memisahkan pelarut dengan senyawa aktif menggunakan *vacum rotary evaporator*. Prinsip kerja alat tersebut yaitu proses pemisahan ekstrak dari pelarut dengan penurunan tekanan yang dipercepat oleh putaran labu sehingga pelarut dapat menguap 5-10 °C di bawah titik didihnya (Kristanti dkk., 2008). Hasil ekstrak bekatul yang diperoleh berwujud kental berminyak dan berwarna kuning kecoklatan. Sesuai dengan pernyataan Yosi dkk (2014), ekstrak minyak bekatul berwarna kuning diduga berasal dari zat warna, yaitu salah satu fraksi yang tidak tersabunkan yang secara alami terdapat pada ekstrak minyak bekatul tersebut. Rendemen yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu sebesar 14,65%. Perhitungan rendemen terdapat pada Lampiran 6. Hasil rendemen menunjukkan nilai dari banyaknya komponen pada bekatul yang tertarik oleh pelarut sehingga diperoleh ekstrak kasar bekatul.

4.3 Uji Fitokimia Ekstrak Bekatul

Senyawa fitokimia merupakan senyawa bioaktif metabolit sekunder pada tumbuhan yang berfungsi sebagai pelindung untuk dapat bertahan dan beradaptasi terhadap lingkungan. Senyawa fitokimia yang diuji dalam penelitian ini yaitu alkaloid, flavonoid, steroid, saponin dan tanin. Tujuan dari pengujian fitokimia yaitu untuk mengetahui adanya senyawa aktif pada ekstrak bekatul yang

dilakukan secara kualitatif. Prinsip dalam metode ini yaitu melihat perubahan warna ketika dicampurkan dengan reagen dan dibandingkan dengan standar dari masing-masing pengujian.

Tahap yang dilakukan pada penelitian ini yaitu dengan mengambil ekstrak bekatul sesuai dengan kadar yang ditentukan. Kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan reagen yang sesuai dengan senyawa aktif yang diidentifikasi. Berikut hasil uji fitokimia dari ekstrak bekatul yang ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil uji fitokimia ekstrak etanol 96% bekatul (*Rice Bran*)

Analisis	Hasil Uji Ekstrak Bekatul (+/-)	Warna Sampel	Warna Standar
Alkaloid			
➤ Mayer	-	Hijau kekuningan	Endapan kekuningan
➤ Dragendorff	++	Endapan jingga	Endapan jingga
Flavonoid	-	Hijau kekuningan	Merah/Jingga
Steroid/	+	Sedikit	Hijau
Triterpenoid		kebiruan	kebiruan(steroid), Kecoklatan/Merah (triterpen)
Saponin	+++	Terbentuk busa stabil	Terbentuk busa stabil
Tanin			
➤ FeCl ₃	++	Hijau kebiruan	Hijau kebiruan

Keterangan: +++ = Kandungan senyawa banyak
 ++ = Kandungan senyawa sedikit
 + = Kandungan senyawa sangat sedikit
 - = Tidak mengandung senyawa

Table 4.1 menunjukkan bahwa identifikasi senyawa alkaloid dengan reagen Mayer menunjukkan hasil negatif yang ditandai dengan tidak terbentuknya endapan berwarna putih kekuningan. Hal ini dapat disebabkan karena pereaksi Meyer tidak terlalu reaktif dengan alkaloid yang terdapat pada ekstrak bekatul.

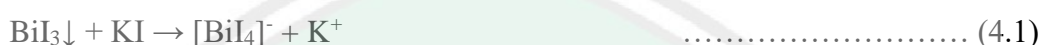
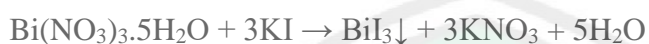
Tidak semua alkaloid mengendap dengan reaksi Mayer. Pengendapan yang terjadi akibat reaksi Mayer bergantung pada rumus bangun alkaloidnya. Penelitian Syafitri (2016) dan Ulfa (2016) mengungkapkan bahwa pengujian senyawa alkaloid dengan reagen Mayer pada ekstrak etanol 96% dan 99,5% bekatul memberikan hasil negatif.

Identifikasi senyawa flavonoid juga menunjukkan hasil negatif yang ditandai dengan tidak tampak adanya pembentukan warna pada sampel. Hal ini disebabkan karena dalam ekstrak bekatul beras putih tidak memiliki senyawa flavonoid (antosianin) yang sesuai dengan pernyataan Friedman (2013), bahwa kandungan antosianin pada bekatul beras putih sebesar 0 µg/g. Senyawa antosianin (flavonoid), sianidin 3 glukosida dan peonidin 3 glukosida serta turunan senyawa sianidin merupakan senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan dan dapat memberikan warna pada beras (Adzkiya, 2011). Kenyataannya bahwa pada beras putih tidak memiliki pigmen warna antosianin yang merupakan flavonoid, sehingga pada ekstrak bekatul yang digunakan tidak mengandung senyawa flavonoid namun mengandung senyawa-senyawa lain yang berpotensi sebagai antioksidan. Kandungan metabolit sekunder pada bekatul menjadi bervariasi karena kondisi yang berbeda seperti lingkungan tempat tumbuh termasuk suhu, udara, sinar matahari, kelembaban udara, dan keadaan tanah serta waktu panen.

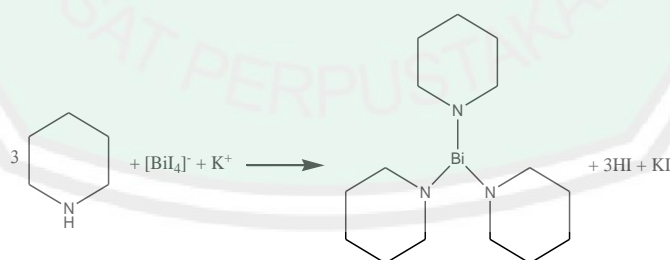
4.3.1 Kandungan Senyawa Alkaloid pada Ekstrak Bekatul

Senyawa alkaloid selain dapat dianalisis menggunakan reagen Mayer (kalium tetraiodomerkurat) juga dapat dianalisis dengan reagen Dragendorff (kalium tetraiodobismutat). Reagen Dragendorff mengandung $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ (bismuth nitrat) dan KI (kalium iodida) dengan reaksi pada Persamaan 4.1. Dalam

pembuatan reagen ditambahkan larutan HCl agar ion Bi^{3+} tetap berada dalam larutan dan tidak mengalami proses hidrolisis. Vogel (1990) menyatakan bahwa penambahan larutan HCl pada reagen berfungsi agar kesetimbangan akan bergeser ke arah kiri sehingga bismuth nitrat tidak terhidrolisis menjadi BiO^+ . Reaksi ditunjukkan pada Persamaan 4.2.



Bismuth nitrat bereaksi dengan kalium iodida membentuk endapan Bismut(III) iodida kemudian larut dalam kalium iodida berlebih sehingga membentuk kalium tetraiodobismutat. Selanjutnya kalium tetraiodobismutat membentuk kompleks logam dengan alkaloid dan membentuk endapan jingga. Nitrogen digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K^+ yang merupakan ion logam. Reaksi dugaan yang terbentuk ditunjukkan pada Gambar 4.1.



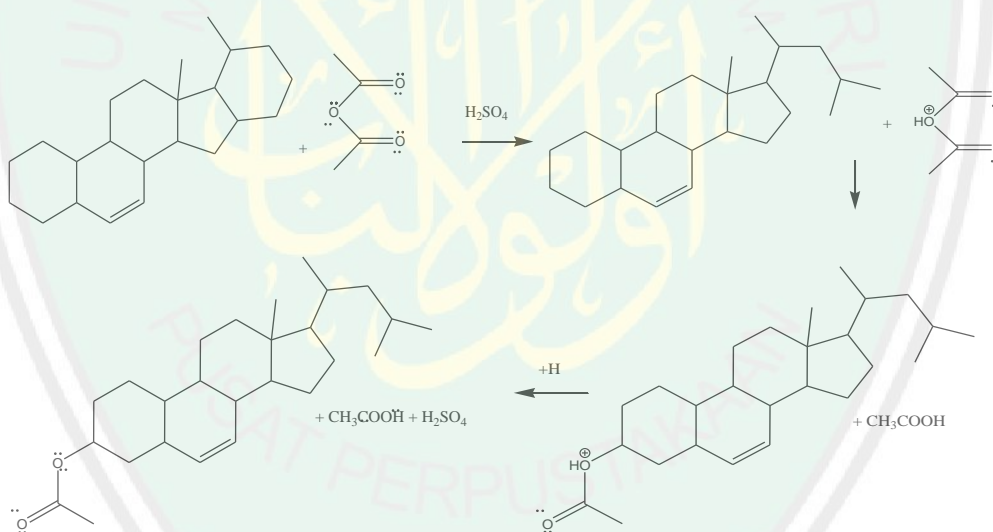
Gambar 4.1 Reaksi dugaan antara reagen Dragendorff dengan alkaloid (Marliana dkk., 2005)

Penelitian yang dilakukan dengan reagen Dragendorff memberikan hasil positif yang ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna jingga pada

sampel. Sehingga secara kualitatif ekstrak etanol 96% bekatul terbukti mengandung senyawa alkaloid. Hal ini sesuai dengan penelitian Syafitri (2016), yang menunjukkan bahwa ekstrak bekatul positif mengandung alkaloid yang diuji dengan reagen Dragendorff.

4.2.2 Kandungan Senyawa Steroid pada Ekstrak Bekatul

Uji fitokimia senyawa steroid dilakukan dengan cara ekstrak bekatul ditambah larutan asam asetat anhidrat untuk reaksi asetilasi gugus hidroksil dan kloroform. Selanjutnya ditambahkan asam sulfat pekat melalui dinding tabung secara perlahan. Identifikasi senyawa steroid dalam penelitian ini memberikan hasil positif yang ditunjukkan dengan munculnya warna hijau kebiruan pada ekstrak. Reaksi dugaan yang terbentuk ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Reaksi dugaan senyawa steroid membentuk kompleks steroid (Azizah, 2010).

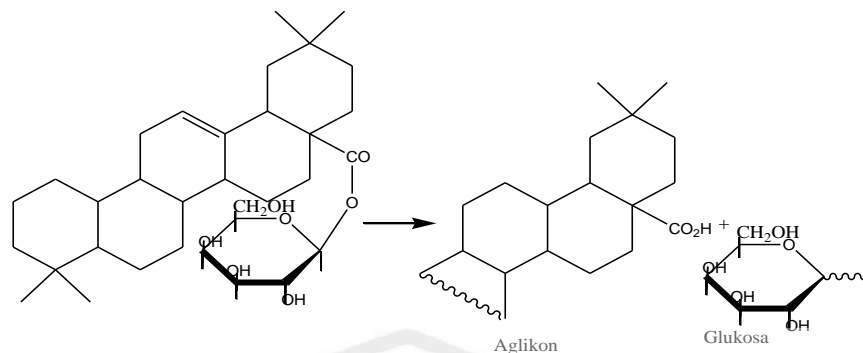
Penambahan H_2SO_4 pekat bertujuan untuk mendestruksi kompleks asetil steroid. Harborne (1897), menyatakan H_2SO_4 pekat lebih bersifat reaktif jika bereaksi dengan steroid. Hal ini dikarenakan kemampuan asam sulfat yang

lebih mudah masuk mengatasi efek sterik yang besar dari molekul steroid sehingga senyawa kompleks yang dihasilkan lebih stabil.

Ekstrak bekatul tampak seperti minyak yang bersifat non polar dan senyawa steroid merupakan molekul lipid yang bersifat non polar. Friedman (2014) menyatakan bahwa bekatul mengandung beberapa jenis steroid seperti 2,4-metilensikloartanil ferulat, sikloartenol ferulat, γ -orizanol, tokoferol, tokotrienol. Senyawa-senyawa tersebut berfungsi sebagai antioksidan yang memiliki potensi sebagai antidiabetes sebagaimana dinyatakan dalam Kahlon et al., (1994) dan David (2008), bahwa steroid berpotensi sebagai antioksidan yang dapat mencegah kerusakan dinding sel dan dapat menurunkan kadar kolesterol darah. Sehingga dalam ekstrak etanol 96% bekatul positif mengandung senyawa steroid yang sesuai dengan penelitian Syafitri (2016) menyatakan bahwa ekstrak bekatul mengandung senyawa steroid.

4.3.3 Kandungan Senyawa Saponin pada Ekstrak Bekatul

Senyawa saponin merupakan senyawa metabolit sekunder yang termasuk dalam kelompok steroid aglikon. Identifikasi senyawa saponin dilakukan dengan cara ekstrak ditambahkan dengan air dan 2 mL HCl 0,1 N kemudian dikocok. Ekstrak dikatakan positif mengandung saponin apabila terbentuk busa permanen dan tidak hilang ketika ditambahkan HCl. Reaksi ditunjukkan pada Gambar 4.3. Pembentukan busa terjadi karena senyawa memiliki gugus polar dan gugus nonpolar yang bersifat aktif permukaan sehingga saat dikocok dengan air saponin dapat membentuk misel. Santi dkk. (2008) dan Robinson (1995), juga menyatakan bahwa pada struktur misel gugus polar menghadap ke luar sedangkan gugus non polarnya menghadap ke dalam, keadaan inilah yang tampak seperti busa.

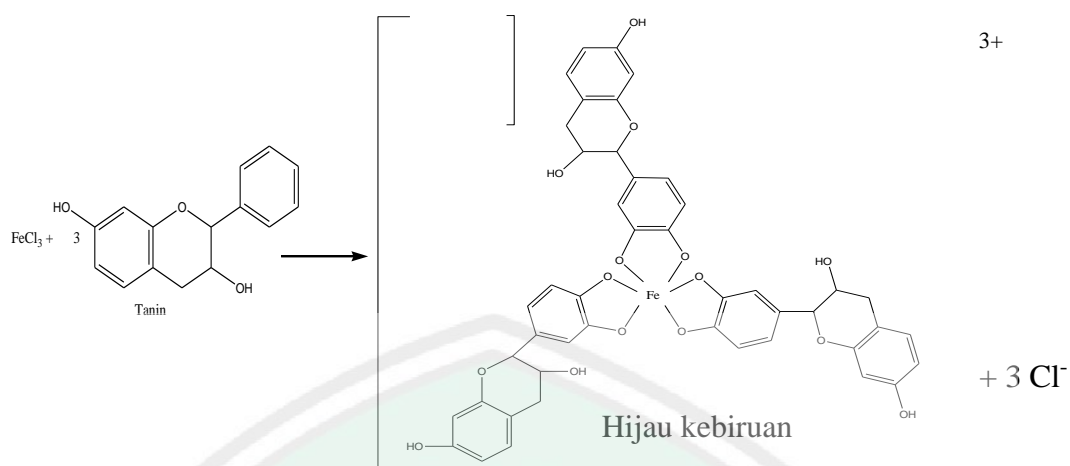


Gambar 4.3 Reaksi hidrolisis saponin di dalam air (Illing dkk., 2017).

Berdasarkan hasil penelitian, identifikasi senyawa saponin menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya busa permanen pada sampel. Sesuai dengan penelitian Syafitri (2016) bahwa pada penelitian ini dapat dibuktikan bahwa pada ekstrak etanol 96% bekatul positif mengandung senyawa saponin.

4.3.4 Kandungan Senyawa Tanin pada Ekstrak Bekatul

Uji senyawa tanin dilakukan dengan cara ekstrak bekatul ditambahkan 2 tetes FeCl_3 1%. Tanin merupakan senyawa polifenol yang termasuk dalam senyawa fenolik. Sehingga Robinson (1995), menyatakan pereaksi FeCl_3 dipergunakan untuk identifikasi senyawa fenol termasuk tanin. Gugus fenol akan bereaksi dengan FeCl_3 dan membentuk senyawa kompleks yang ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kebiruan atau hijau kehitaman. Dalam penelitian ini, identifikasi senyawa tanin memberikan hasil positif yang dibuktikan dengan terbentuknya warna hijau kebiruan pada sampel. Sehingga ekstrak etanol 96% bekatul terbukti mengandung senyawa tanin. Reaksi dugaan senyawa tanin dengan FeCl_3 pada sampel ditunjukkan pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Reaksi dugaan antara tanin dengan FeCl_3 (Marliana dkk., 2005).

4.4 Potensi Ekstrak Bekatul (*Rice bran*) Terhadap Aktivitas *Superoksida Dismutase* (SOD) Ginjal Mencit Model Diabetes Mellitus

4.4.1 Pengondisian Mencit Diabetes Mellitus

Pengondisian mencit diabetes dilakukan dengan induksi larutan aloksan dosis 5,6 mg/ 20g BB. Mencit yang digunakan yaitu mencit putih jantan karena memiliki sistem imun yang cenderung tidak dipengaruhi oleh hormon reproduksi. Hal ini disebabkan karena kadar hormon estrogen pada mencit jantan relatif rendah dibanding mencit betina. Hana (2017) juga menjelaskan bahwa adanya hormon estrogen pada mencit betina dapat memicu efek stres yang dihasilkan oleh kortisol dan adrenalin. Selain itu, mencit memiliki komponen darah dan organ yang dapat mewakili mamalia khususnya manusia.

Induksi dilakukan dengan intraperitoneal yaitu injeksi dilakukan pada daerah rongga abdomen yang sejajar dengan kaki. Tujuan pemberian melalui rute ini adalah agar induksi yang dilakukan tanpa melalui saluran pencernaan dan langsung tertuju pada pembuluh darah. Dosis aloksan yang digunakan yaitu 5,6 mg/ 20g BB. Dalam penelitian ini dosis tersebut terbukti menimbulkan kondisi hiperglikemia pada hewan coba mencit. Hal ini sesuai dengan penelitian yang

dilakukan Arifin dkk., (2007), bahwa dosis tersebut dapat meningkatkan kadar glukosa darah mencit secara permanen.

Kondisi diabetes pada mencit dapat diketahui dengan mengukur kadar glukosa darah menggunakan glukometer strip. Prinsip pemeriksaan pada metode ini adalah strip test diletakkan pada alat, ketika darah diteteskan pada zona reaksi tes strip, katalisator glukosa akan mereduksi glukosa dalam darah. Intensitas dari elektron yang terbentuk dalam alat strip setara dengan konsentrasi glukosa dalam darah (Hones dkk., 2008; Sari, 2014). Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa setelah diinduksi aloksan kemudian ditunggu selama 4 hari mencit mengalami hiperglikemia dengan kadar gula darah mencapai ≥ 200 mg/dL, sehingga mencit dikatakan menderita diabetes. Diagnosis diabetes juga dapat diamati dari adanya gejala pada mencit seperti poliuria (sekresi urin meningkat), banyak minum dan pasif bergerak. Hal ini sesuai dengan pernyataan Fatimah (2015), bahwa gejala diabetes akan menimbulkan glukosuria (adanya glukosa dalam urin), polidipsia (peningkatan rasa haus), polifagia (rasa lapar yang berlebihan) dan penurunan berat badan.

4.4.2 Pengaruh Ekstrak Bekatul Terhadap Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) Ginjal Mencit Diabetes

Superoksida dismutase merupakan antioksidan endogen yang secara alami berada di dalam sel manusia. Superoksida dismutase memiliki peran utama sebagai pelindung sel dari aktivitas senyawa oksigen reaktif. Adanya oksigen reaktif dalam tubuh disebabkan karena kondisi stres oksidatif akibat diabetes. Stres oksidatif terjadi karena produksi antara radikal bebas dan sistem peredam radikal tidak seimbang. Keadaan hiperglikemia secara terus-menerus akan menyebabkan penurunan antioksidan alami dalam tubuh akibat banyaknya

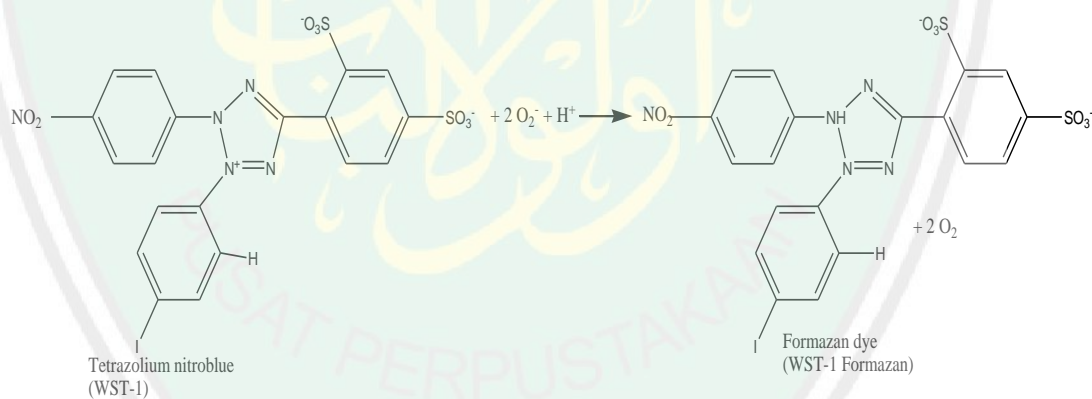
Reactive Oxygen Species (ROS). Menurut Bowen et al., (2008) ROS yang melebihi kapasitas antioksidan dalam tubuh akan mengarahkan pada oksidasi molekul-molekul penting dalam tubuh sehingga membahayakan jaringan bahkan menyebabkan kematian sel.

Kerugian akibat kondisi stres oksidatif yang terjadi dalam jangka panjang dapat menimbulkan komplikasi pada organ-organ salah satunya yaitu pada ginjal. Wresdiyati dan Makita 1995 dalam Wresdiyati dkk., 2012 melaporkan bahwa kondisi stres dapat meningkatkan jumlah peroksisom pada jaringan ginjal kera jepang. Peningkatan jumlah radikal bebas tersebut dapat meningkatkan proses oksidasi yang terjadi di peroksisom. Salah satu komplikasi ginjal akibat diabetes mellitus yaitu nefropati diabetika yang merupakan penyebab terjadinya gagal ginjal. Oleh karena itu tubuh perlu antioksidan dari luar untuk meningkatkan antioksidan dalam tubuh yang berperan sebagai *scavenger* penetral radikal.

Pengukuran aktivitas SOD dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian terapi ekstrak bekatul terhadap peningkatan aktivitas SOD pada ginjal mencit diabetes. Tahapan awal penelitian ini yaitu dibuat kurva standar yang berfungsi sebagai acuan untuk mencari kadar aktivitas SOD. Digunakan SOD murni dengan konsentrasi 10, 20, 40, 80 dan 100 U/mL kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 580 nm karena warna komplementer yang dihasilkan adalah warna ungu. Diperoleh nilai persamaan yaitu $y = 0.009x + 0.0525$ dengan nilai $R^2 = 0.9995$.

Pengukuran aktivitas SOD pada ginjal dilakukan dengan menimbang jaringan ginjal sebanyak 100 mg dan dihaluskan, kemudian ditambah PBS (pH

7,4) yang berfungsi sebagai pelarut. Buffer inilah yang nantinya membantu sel dalam mempertahankan konsistensi pH (Medicago, 2010). Kemudian sampel *disentrifuse* untuk memisahkan pellet dan supernatan. Supernatan silat yang diperoleh ditambahkan dengan larutan campuran xantine dan NBT atau sitokrom c, selanjutnya ditambahkan xantine oksidase lalu divortex dan diinkubasi selama 30 menit. Reaksi penghambatan Pembentukan radikal superoksida dihasilkan dari reaksi antara xantin dan xantin oksidase. Inkubasi dilakukan untuk proses penghambatan sitokrom c oleh superoksida. Radikal superoksida yang bersifat reaktif akan dinetralkan oleh enzim SOD pada sampel dengan mereduksi tetrazolium (berwarna kuning) dalam Nitroblue Tetrazolium (NBT) atau sitokrom c menjadi formazan (berwarna biru keunguan). Reaksi yang terjadi ditunjukkan Persamaan 2.5 dan reaksi menghambatan NBT ditunjukkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Reaksi radikal superoksida dengan NBT menghasilkan formazan (Ukeda et al, 1999)

Aktivitas SOD dapat diketahui berdasarkan laju penghambatan NBT atau sitokrom c oleh anion superoksida. Hasil dari proses oksidasi xantin menghasilkan asam urat dan anion superoksida. Asam urat dan anion superoksida selanjutnya akan mereduksi sitokrom c. Reduksi sitokrom c diamati berdasarkan kenaikan

absorbansi pada panjang gelombang 580 nm (Winarsi, 2007). Semakin besar aktivitas reduksi sitokrom c, semakin besar nilai absorbansi yang diperoleh maka semakin tinggi aktivitas SOD yang terkandung dalam sampel. Hal ini sesuai dengan Rahman dkk., (2012) menyatakan semakin pekat warna yang dihasilkan maka aktivitas enzim SOD semakin tinggi.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, hasil rata-rata aktivitas enzim SOD ginjal mencit pada masing-masing perlakuan ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Rata-rata aktivitas SOD

No	Perlakuan	Aktivitas (U/mL)
1	Kontrol normal (K0)	5,97
2	Kontrol negatif (K-)	4,41
3	Dosis 1 (D1)	9,41
4	Dosis 2 (D2)	10,11
5	Dosis 3 (D3)	8,66

Keterangan:

Kontrol normal (K0) : Tanpa perlakuan

Kontrol negatif (K-) : Injeksi aloksan dosis 5,6 mg/20 g BB

Dosis 1 (D1) : Pemberian terapi ekstrak bekatul dosis 9,8 mg/20g BB

Dosis 2 (D2) : Pemberian terapi ekstrak bekatul dosis 11,2 mg/20g BB

Dosis 3 (D3) : Pemberian terapi ekstrak bekatul dosis 14 mg/20g BB

Rata-rata aktivitas SOD menunjukkan bahwa pada kontrol normal (tanpa induksi) memiliki nilai sebesar 5,97 U/mL ketika mengalami diabetes pada kontrol negatif (diinduksi aloksan) aktivitas SOD mengalami penurunan dengan nilai sebesar 4,41 U/mL. Rahmawati dkk., (2014) menyatakan bahwa tingginya aktivitas SOD kelompok normal dikarenakan kadar glukosa darahnya yang normal sehingga tidak memicu produksi radikal bebas yang berlebih. Sebaliknya, rendahnya aktivitas SOD kelompok diabetes (K-) berhubungan dengan kondisi stres oksidatif akibat induksi aloksan. Kemudian hasil pemberian terapi ekstrak

bekatul menunjukkan bahwa pada dosis 1 dan dosis 2 mengalami peningkatan aktivitas SOD yaitu sebesar 9,41 dan 10,1 U/mL, selanjutnya pada dosis 3 menunjukkan bahwa aktivitas SOD mengalami penurunan dengan nilai sebesar 8,66 U/mL.

Pemberian dosis 1 menunjukkan aktivitas SOD yang dihasilkan lebih rendah dari pemberian dosis 2. Hal ini terjadi karena dosis yang diberikan lebih sedikit sehingga aktivitas SOD yang dihasilkan lebih rendah. Kemudian pada dosis 2 menunjukkan hasil peningkatan aktivitas SOD tertinggi. Hal ini menunjukkan bahwa pada dosis tersebut ekstrak bekatul dapat menghambat radikal bebas akibat stres oksidatif karena kandungan steroidnya berupa tokoferol, tokotrienol dan γ -orizanol yang berpotensi sebagai antioksidan. Reaksi peredaman radikal oleh salah satu senyawa antioksidan pada ekstrak bekatul berupa tokoferol ditunjukkan pada Gambar 2.11. Sehingga dalam penelitian ini dosis terbaik yang berpotensi meningkatkan aktivitas SOD ditunjukkan pada pemberian terapi dengan dosis 2. Kondisi aktivitas SOD yang tinggi dapat memberikan efek positif bagi pertahanan sel-sel jaringan. Wresdiyati *et al* (2012), menyatakan bahwa hal tersebut membuat SOD lebih ringan dalam mengkatalis reaksi dismutase radikal superoksida menjadi produk lain yang lebih stabil, sehingga kadarnya dalam sel menjadi lebih terjaga.

Pada pemberian dosis 3 diperoleh hasil aktivitas SOD yang lebih rendah daripada dosis 2. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan terjadi penghambatan respon dan terjadi prooksidasi terhadap senyawa antioksidan dalam ekstrak oleh antioksidan dalam tubuh. Besar konsentrasi antioksidan yang ditambahkan dapat berpengaruh pada laju oksidasi. Pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan

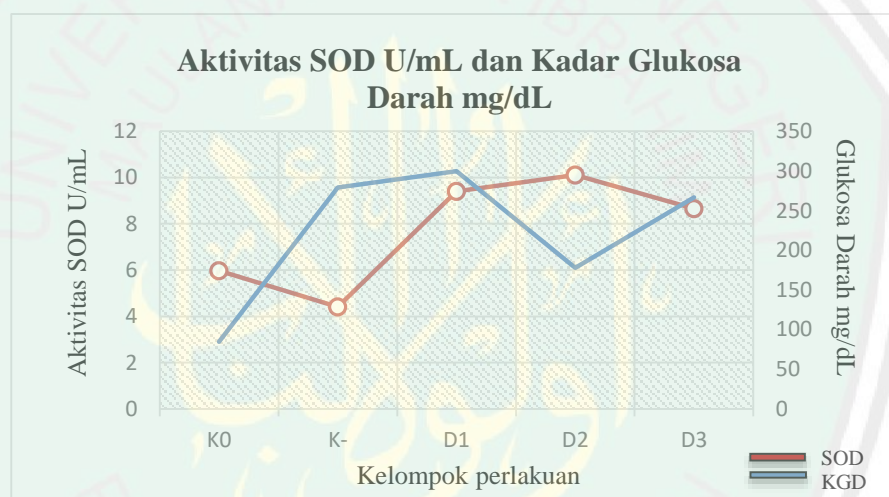
sering lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi prooksidan. Pengaruh jumlah konsentrasi pada laju oksidasi tergantung pada struktur antioksidan, kondisi dan sampel. Berikut reaksi prooksidan yang terjadi ditunjukkan pada Persamaan 4.3 (Gordon 1990).



Antioksidan hanya akan berfungsi ketika ada senyawa prooksidan (pemicu proses oksidasi) dalam tubuh. Ketika dosis antioksidan dan prooksidan tidak seimbang atau kadar antioksidan tinggi sedangkan prooksidan rendah, maka tubuh akan membentuk senyawa prooksidan untuk menyeimbangkan kadarnya dengan antioksidan, dan hal ini akan membuat sel-sel radikal bebas tidak bisa diperbaiki lagi. Sehingga efek terapeutik dalam ekstrak bisa berubah menjadi efek toksik akibat pemberian dosis yang berlebih dan dapat mengurangi kemampuan senyawa aktif dalam meningkatkan aktivitas SOD. Seperti penelitian Andrieyani (2015), menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak umbi binahong pada dosis 1 mengalami peningkatan aktivitas SOD yaitu sebesar 5,511 U/mL dan mengalami penurunan pada pemberian dosis 2 dan dosis 3 yaitu menjadi 5,24 dan 4,94 U/mL pada tikus diabetes.

Hasil rata-rata aktivitas SOD yang diperoleh selanjutnya dapat dikorelasikan dengan hasil penelitian Fuadah (2018), yaitu rata-rata kadar glukosa darah mencit yang telah diterapi selama 14 hari yang ditunjukkan pada Gambar 4.6. Berdasarkan hasil aktivitas SOD dan kadar glukosa darah mencit menunjukkan bahwa pada pemberian terapi ekstrak bekatul dengan dosis 2 dapat meningkatkan aktivitas SOD tertinggi sekaligus menurunkan kadar glukosa mencit hingga kondisi normal yaitu sebesar 177,75 mg/dL. Hal ini menunjukkan

bahwa antioksidan berupa steroid dan asam fenolik dalam ekstrak bekatul mampu meredam radikal bebas akibat stress oksidatif yang disebabkan oleh kondisi diabetes dan mampu memperbaiki kerja insulin dalam menurunkan kadar glukosa darah yang sesuai Friedman (2013), menyatakan bahwa senyawa dalam bekatul berupa tokoferol, tokotrienol dan γ -orizanol dapat bekerja secara sinergis dalam memperbaiki kerusakan sel dan menangkal radikal bebas. Apabila kadar glukosa darah berada pada keadaan hiperglikemia maka antioksidan alami dalam tubuh akan menurun. Begitupun sebaliknya, jika kadar glukosa darah pada tubuh dalam keadaan normal maka aktivitas SOD dalam tubuh seimbang.



Keterangan:

Kontrol normal (K0) : Tanpa perlakuan

Kontrol negatif (K-) : Injeksi aloksan dosis 5,6 mg/20 g BB

Dosis 1 (D1) : Pemberian terapi ekstrak bekatul dosis 9,8 mg/20g BB

Dosis 2 (D2) : Pemberian terapi ekstrak bekatul dosis 11,2 mg/20g BB

Dosis 3 (D3) : Pemberian terapi ekstrak bekatul dosis 14 mg/20g BB

Gambar 4.6 Grafik aktivitas SOD dan kadar glukosa darah

Namun, rata-rata hasil aktivitas SOD uji statistik menggunakan analisis variasi *one way ANOVA* dengan signifikansi 95% menunjukkan hasil yang tidak signifikan. Hasil analisis ringkasan perhitungan *ANOVA* ditunjukkan pada Tabel 4.3. Berdasarkan hasil analisis *ANOVA* ditunjukkan bahwa nilai signifikan >

0.05, maka hipotesis H_0 diterima dan H_1 ditolak. Sehingga dapat diketahui bahwa pemberian ekstrak bekatul tidak berpengaruh nyata terhadap aktivitas SOD pada ginjal mencit yang menderita diabetes. Senyawa aktif pada ekstrak bekatul dapat diasumsikan lebih terfokus dalam menyeimbangkan ion radikal dan menstimulasi hormon insulin untuk menurunkan kadar glukosa darah pada tahap awal. Sehingga aktivitas SOD yang dihasilkan pada mencit diabetes tidak sebanding dengan penurunan kadar glukosa yang diperoleh. Dapat disimpulkan bahwa lama pemberian terapi ekstrak bekatul sebagai antioksidan sangat berpengaruh terhadap peningkatan aktivitas SOD pada mencit diabetes.

Table 4.3 Hasil ringkasan ANOVA terhadap aktivitas SOD ginjal mencit

	Jumlah kuadrat	Df	Rata-rata	F	Sig.
Anyat Kelompok	93.829	4	23.457	15.538	.242
Dalam Kelompok	228.784	15	15.252		
Total	322.613	19			

4.5 Pemanfaatan Bekatul dalam Perspektif Islam

Allah SWT memberikan karunia kepada manusia berupa nikmat dengan menciptakan alam semesta dan seluruh isinya salah satunya tumbuh-tumbuhan sebagai tanda kekuasaanNya agar manusia dapat merenung dan berfikir. Allah SWT tidak menciptakan segala sesuatu di dunia dengan sia-sia. Sebagaimana firmanNya dalam QS. Az- Zumar ayat 21:

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَسَلَكَهُ يَنَابِيعَ فِي الْأَرْضِ ثُمَّ يُخْرِجُ بِهِ زَرْعًا مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ ثُمَّ يَهِيَجُ فَنَرَاهُ مُصْفَرًّا ثُمَّ يَجْعَلُهُ حُطَامًا إِنَّ فِي ذَلِكَ لَذِكْرًا لِأُولَى الْأَلْبَابِ ٢١

Artinya: “ Apakah kamu tidak memperhatikan, bahwa sesungguhnya Allah menurunkan air dari langit, maka diaturnya menjadi sumber-sumber air di bumi

kemudian ditumbuhkan-Nya dengan air itu tanam-tanaman yang bermacam-macam warnanya, lalu menjadi kering lalu kamu melihatnya kekuning-kuningan, kemudian dijadikan-Nya hancur berderai-derai. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat pelajaran bagi orang-orang yang mempunyai akal". (QS. Az- Zumar: 21)

Berdasarkan tafsir jalalain ayat tersebut mengandung makna bahwa Allah SWT menegaskan kepada manusia bahwa Allah menurunkan air dari langit dengan memasukkan air itu ke tempat-tempat yang dapat menjadi sumber air, kemudian Allah menumbuhkan dengan air itu tanam-tanaman dengan bermacam-macam warna, lalu ia menjadi layu dan kering, lalu kamu melihatnya sesudah hijau menjadi kekuning-kuningan kemudian dijadikan-Nya hancur berderai dan rontok. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat pelajaran serta peringatan bagi orang-orang yang mau mengambil pelajaran darinya untuk menyimpulkan keesaan dan kekuasaan Allah SWT.

Tumbuh-tumbuhan yang Allah SWT ciptakan di bumi akan memberikan manfaat bagi manusia yang berfikir. Bahkan tumbuhan yang sudah dimanfaatkan dan menghasilkan hasil samping berupa limbah dapat dimanfaatkan kembali untuk kemaslahatan manusia. Seperti yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan bekatul hasil samping penggilingan padi dengan menempuh beberapa proses pengujian, sehingga memberikan manfaat bagi orang-orang yang berusaha dan mau mempelajari ciptaan Allah SWT.

Bekatul merupakan hasil samping penggilingan padi atau limbah yang biasa digunakan sebagai campuran pada makanan ternak. Namun, dalam penelitian ini mengungkap bahwa bekatul mengandung senyawa aktif berupa alkaloid, steroid, tanin dan saponin yang berperan sebagai antioksidan yang berpotensi sebagai antidiabetes. Oleh karena itu Allah SWT memerintahkan

kepada manusia yang telah dikaruniai akal agar selalu berusaha mengkaji dan memikirkan segala yang terjadi di bumi ini. Segala penyakit yang Allah ciptakan tidak lepas dengan ujian yang Allah timpakan kepada manusia agar manusia mau berusaha mencari penawarnya. Hal yang harus diketahui oleh seorang muslim adalah tidaklah Allah menciptakan suatu penyakit kecuali Dia juga menciptakan penawarnya. Sebagaimana sabda Rasulullah SAW:

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

“ *Tidaklah Allah menurunkan penyakit kecuali Dia juga menurunkan penawarnya* ”. (HR Bukhari)

Imam Muslim meriwayatkan sebuah hadits dari Jabir bin ‘Abdullah *radhiyallahu ‘anhu*, dari Rasulullah SAW, bahwasannya beliau bersabda,

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ، فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ

“ *Setiap penyakit ada obatnya. Apabila obat itu tepat untuk suatu penyakit, penyakit itu akan sembuh dengan seizin Allah ‘Azza wa Jalla* ”. (HR. Muslim)

Hadits-hadits tersebut menjelaskan bahwa semua penyakit yang Allah berikan kepada manusia melainkan Allah memberikan pula obat penawarnya. Contohnya seperti Allah ciptakan adanya penyakit diabetes, dan Allah ciptakan pula penawarnya. Seperti hasil yang diperoleh dalam penelitian ini bahwa ekstrak bekatul mampu menurunkan kadar glukosa darah mencit diabetes walaupun masih tergolong tinggi yaitu sebesar 439 mg/dL pada H-0 dan setelah H-14 terapi diperoleh hasil sebesar 177 mg/dL dan dosis terbaik ditunjukkan pada penggunaan dosis terapi 11,2 mg/ 20 g BB. Selain itu ekstrak bekatul juga mampu

meningkatkan aktivitas enzim SOD walaupun tidak berpengaruh terhadap penurunan kadar glukosa darah akibat diabetes seperti yang ditunjukkan pada hasil analisis statistik dengan nilai signifikan $> 0,05$ yaitu sebesar $0.242 > 0,05$. Oleh karena itu, perlu dilakukan penambahan waktu terapi dan penambahan variasi dosis ekstrak bekatul agar diperoleh hasil kadar glukosa darah yang tergolong normal dan berpengaruh terhadap peningkatan SOD pada mencit diabetes. Pelaksanaan penelitian ini merupakan bentuk ikhtiar manusia untuk mendapatkan obat penawar dari suatu penyakit dengan cara memikirkan segala sesuatu yang telah diwahyukan Allah SWT di dalam al-qur'an sebagai petunjuk dan tuntunan dalam kehidupan. Kemudian Allah juga berfirman dalam surat Al An'am ayat 17:

وَإِنْ يَمْسَسْكَ اللَّهُ بَضْرًا فَلَا كَاشِفَ لَهُ إِلَّا هُوَ وَإِنْ يَمْسَسْكَ بِخَيْرٍ فَهُوَ عَلَىٰ كُلِّ شَيْءٍ قَدِيرٌ

“Dan jika Allah menimpakan sesuatu kemudharatan kepadamu, maka tidak ada yang menghilangkannya melainkan Dia sendiri. Dan jika Dia mendatangkan kebaikan kepadamu, maka Dia Maha Kuasa atas tiap-tiap sesuatu”. (Qs. Al An'am: 17)

Ayat tersebut menjelaskan bahwa segala penyakit maupun kesembuhan yang diberikan semata-mata hanyalah bergantung pada kehendakNya. Penyakit yang disembuhkan dengan obat dan dokter hanyalah sebagai perantara untuk mencapai kesembuhan, sedangkan kesembuhan hanya datang dari Allah SWT. Karena Dialah yang menciptakan segala sesuatu. Semujarab apapun obat dan sehebat apapun dokter itu, namun jika Allah tidak menghendaki kesembuhan baginya, maka kesembuhan itu tidak akan pernah didapat.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan:

1. Golongan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak bekatul dengan pelarut etanol 96% antara lain alkaloid, steroid, saponin dan tanin.
2. Dosis terbaik ekstrak bekatul dalam meningkatkan aktivitas SOD mencit diabetes ditunjukkan pada dosis 2 dengan pemberian terapi 11,2 mg/20 g BB mencit yaitu sebesar 10,11 U/mL.

5.2 Saran

Penelitian ini masih menggunakan ekstrak kasar bekatul sehingga perlu pengujian lebih lanjut menggunakan uji KLT pada agar diperoleh senyawa yang lebih murni. Dalam penelitian ini juga memperoleh hasil data aktivitas SOD yang sangat fluktuatif dan hasil analisis statistik menunjukkan sig. < 0,05 yang berarti terapi ekstrak bekatul tidak berpengaruh terhadap aktivitas SOD mencit diabetes. Sehingga perlu dilakukan pemberian waktu terapi yang diperpanjang hingga 21 hari dan dilakukan penambahan dosis terapi sehingga hasil terapi yang diperoleh lebih maksimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Adom K, Liu R. 2002. Antioxidant Activity of Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:21, 6182-6187
- Adzkiya M. A. Z. 2011. Kajian Potensi Antioksidan Beras Merah dan Pemanfaatannya pada Minuman Beras Kencur. *Tesis*. Bogor: Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor
- American Diabetes Association. 2012. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Journal Diabetes Care*, Volume 35, Suplemen 1, January 2012.
- Andri, W. Y. 2007. Produksi Mencit Putih (*Mus Musculus*) dengan Substitusi Bawang Putih (*Allium sativum*) dalam Ransum. *Skripsi*. Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor. P. 3-5
- Andrieyani., A. Hanapi., A. G. Fasya., dan H. Hasanah. 2015. Identifikasi Senyawa Flavonoid dan Efek Terapi Ekstrak Etanol 70 % Umbi Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Terhadap Kadar Glukosa Darah dan Aktifitas SOD (*Superoksida dismutase*) Jantung Tikus yang Diinduksi Alokasan. *ALCHEMY*. Vol. 4, No. 1, hal 73-78
- Ansel, H. C. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi, Edisi III*. Jakarta: Universitas Indonesia Press
- AOAC (Association of Official analytical Chemists). 1984. *Official Methods of Analysis*. Washington D.C.
- Astawan, M., dan Andreas, L. K. 2008. *Khasiat Warna-Warni Makanan*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama
- Astuti, S., Muchtadi, D., Astawan, M., Purwantara, B., Wresdiyati, T. 2009. Pengaruh Pemberian Tepung Kedelai Kaya Isoflavon Terhadap Kadar Malonaldehid (MDA), Aktivitas *Superoksida Dismutase* (SOD) Testis dan Profil Cu, Zn-SOD Tubuli Seminiferi Testis Tikus Jantan. *J. Teknol. dan Industri Pangan*. 20(2): 129–134
- Azizah, R. R. 2010. Uji Fitokimia Tumbuhan *Anona squamosal L*. *Naskah Laporan Publikasi*. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjajaran.
- Barber, S., dan Carmen, B. B. 1980. *Rice Bran: Chemistry and Technology*. Di dalam: Luh BS. *Rice: Production and Utilization*. Wesport, USA: The Avi Publishing Company, Inc
- Bernasconi, G. 1995. *Teknologi Kimia. Jilid 2*. Edisi Pertama. Jakarta: PT. Pradaya Paramita

- Bilous, R., dan Richard, D. 2010. *Buku Pegangan Diabetes*. Pnj. Yudha, E.K. 2014. Jakarta: Bumi Medika
- Bowen–Forbes, CS., Zhang, Y., and Nair, MG. 2010. Anthocyanin Content, Antioxidant, Anti–inflammatory and Anticancer Properties of Blackberry and Raspberry Fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*. 23(6): 554–60
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F. 1996. Structural Analysis of Anti-Oxidative Peptides from Soybean β -Conglicinin. *Journals Agria Food Chem*. 43: 574-578
- Curling S., C. Clausen., and J. Winandy. 2002. *Relationships between Mechanical Properties Loss, and Chemical Composition of Wood During Incipient Brown-Rot Decay*. Forest Prod 52 (7/8): 34-39.
- D’Adamo, P. J., dan Whitney, C. 2009. *Diabetes*. Pnj. Setyadhini, T. E. Yogyakarta : Anggota IKAPI
- Danimartha, S. 2007. *Ramuan Tradisional untuk Pengobatan Diabetes Mellitus*. Jakarta: Penebar Swadaya
- Depkes, RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan, Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. Jakarta
- Depkes, RI. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia, Edisi I*. Jakarta
- Ditjen, POM. 2000. *Metode Analisis PPOM*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI
- Dwinani, S. N., dan Arifah, S. W. 2014. *Kemampuan Ekstrak Etanol Bekatul Beras Hitam dalam Menurunkan Kadar Glukosa Darah pada Tikus Nefropati Diabetes*. Naskah Publikasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Fatimah, R. N. 2015. *Diabetes Melitus Tipe 2. Review Artikel*. J Majority. Fakultas kedokteran Universitas Lampung. Vol. 4 No. 5
- Felicia. 2009. *Efek Neuropati Ekstrak Air Akar Acalypha Indica Linn (Akar Kucing) Dosis 20 mg dan 25 mg secara eks Vivo pada Saraf Otot Gastroknemius Katak*. *Skripsi tidak diterbitkan*. Jakarta: Jurusan Kedokteran Hewan Univertas Indonesia.
- Fridovich, L. 2006. Superoxide Dismutase An Enzymic Function for Erythrocyte (hemocuprein). *Journal of BiolChem*. 25;244 (22): 6049-55

- Friedman, M. 2013. Rice Brans, Rice Bran Oils, and Rice Hulls: Composition, Food and Industrial Uses, and Bioactivities in Humans, Animals, and Cells. *Review Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61, 10626-10627
- Fuadah, N., Akyunul, J., Diana, C. D. 2019. Pengaruh Terapi ekstrak Etanol 96% Bekatul Terhadap Kadar Glukosa Darah dan MDA (*Molandaldehyde*) pada Hati Mencit (*Mus musculus*) Diabetes Mellitus. *Skripsi*. Tidak Dipublikasi. UIN Malang
- Gordon, M.H. 1990. **The Mechanism of Antioxidants Action In Vitro**. In **B.J.F. Hudson, editor. Food Antioxidants**. *Elvesier Applied Science*. London
- Guenther, E. 2006. *Minyak Atsiri Jilid I*. Penj. Ketaren, S. Jakarta: Universitas Indonesia Press
- Hadipernata, M. 2007. Mengolah Dedak Menjadi Minyak (Rice Bran Oil). *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*, 29(4)8-10.
- Hana, I. 2017. *Farmakologi*. Naskah Publikasi SCRIBD
- Harborne, J. 1987. Metode Fitokimia: *Penuntun Cara Modern menganalisis Tumbuhan*. Cetakan Kedua. Pnj. Padmawinata, K., dan I. Soediro. Bandung: ITB
- Helal A. M. 2005. Rice Bran in Egypt. *Cairo: Kaha for Environmental and Agricultural Projects*.
- Hidayat, F. 2012. *Dan Jika Aku Sakit, Dialah yang Menyembuhkanku*. Artikel Publikasi. Muslim or.id
- Indrawati, N. L., dan Razimin. 2013. *Bawang Dayak Si Umbi Ajaib Penakluk Aneka Penyakit*. Yogyakarta: Agro Media.
- Illing, I., Safitri, w., Erfiana. 2017. Uji Fitokimia Ekstrak Buah Dengan. *Jurnal Dinamika*. E-ISSN: 2503-4863. Vol. 08. No.1
- Insani, G. 2013. *Patofisiologi Sel Beta Pankreas*. Naskah Publikasi SCRIBD.
- Joshi, G., Johson J.A. 2012. The Nrf2-ARE Pathway: A Valuable Therapeutic Target for The Treatment of Neurodegenerative Disease. *Recent Pat CNS Drug Discov*. 218-229. 7(3)
- Kahlon T.S., F.I. Chow, M.M. Chiu, C.A. Hudson dan R.N. Sayre. 1996. Cholesterollowering by Rice Bran and Rice Bran Oil Unsaponifiable Matter in Hamsters. *Cereal Chem*. 73(1):69-74 1996.

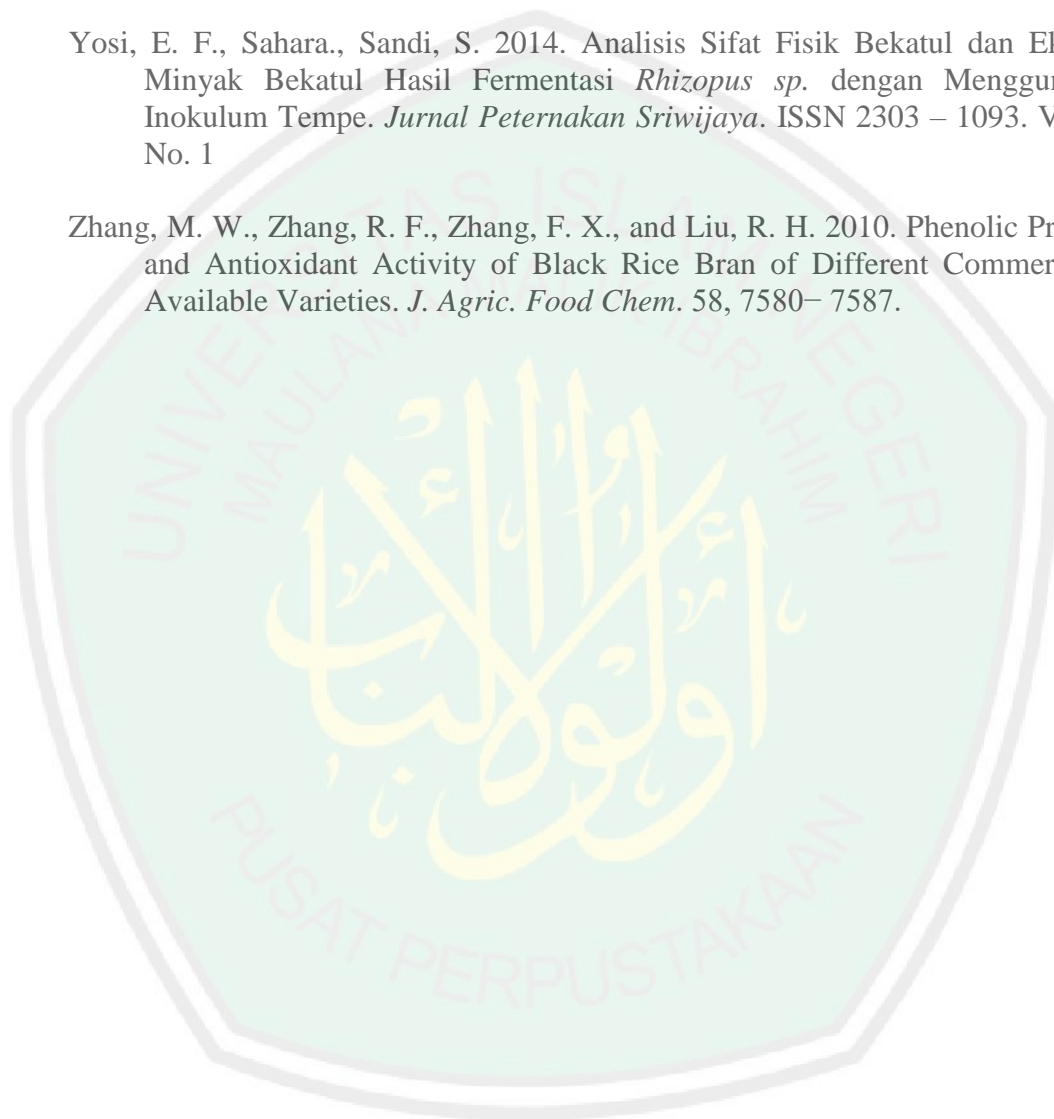
- Kaneto, et.al. 1999. Beneficial Effects of Antioxidants in Diabetes: Possible Protection of Pancreatic β -Cells Against Glucose Toxicity. *Diabetes*. 48, 2398-2406.
- Kee, J. R., and Hayes, E. R. 1996. *Farmakologi, Pendekatan Proses Keperawatan*. Pnj. Anugrah, P. Yogyakarta: Anggota IKAPI.
- Khopkar, S. M. 2010. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Penj. A. Saptorahardjo. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Kristanti, A. N., Aminah, N. S., Tanjung, M. dan Kurniadi, B. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Universitas Airlangga Press.
- Kristina, H. Nurmasari, S. Rusdi. 2016. Kadar Peroksida Lipid dan Aktivitas Superoksida Dismutase Serum Darah pada Penderita Diabetes Melitus Tipe 2. *Jurnal BIOMA*. Biologi UNJ Press. ISSN : 0126-3552.
- Layal, K. 2016. Peran Nrf2 dalam Patogenesis Stres Oksidatif dan Inflamasi pada Penyakit Ginjal Kronik. *Jurnal Syifa' MEDIKA*. Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Palembang. Vol. 7, No.1
- Lenzen, S. 2008. Mechanisems of Alloxan and Steptrozotocin-Induced Diabetes. *Diabetologia*. 51, 216-226
- Lukiati, B., Aulanni'am., dan Darmanto, W. 2012. Profil Distribusi Inos dan Kadar NO Pankreas Tikus Diabetes Mellitus Hasil Induksi MLD-STZ Panca Pemberian Ekstrak Etanol Temugiring (*Curcuma heyneana*). *Jurnal kedokteran Hewan*. Vol 6. No.2
- Mardiana, L. 2012. *Daun Ajaib Tumpas Penyakit*. Jakarta: Swadaya Grup
- Marsk, D. 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar*. Jakarta: EGC
- Medicago, A. B. 2010. *Phospate Buffered Saline Spesification Sheet*. Hlm, 247
- Minarno, E. K. 2015. Skrining Fitokimia dan Kandungan Total Flavanoid pada Buah *Carica pubescens* Lenne dan K. Koch di Kawasan Bromo, Cangar, dan Dataran Tinggi Dieng. *El Hayah*. Vol. 5. No. 2
- Muhammad, Jalaluddin Al-Imam. 2010. *Tafsir Jalalain*. Penerjemah Junaidi, N. Surabaya: eLBA.
- Nahari, D. Y. 2015. Pemisahan Golongan Senyawa Aktif dan Penentuan Kandungan Fenolik Total dari Ekstrak Etanol Umbi Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steen) Serta Efek Terapinya Terhadap Aktivitas SOD (*Superoksida dismutase*) Hati Tikus Diabetes. *Skripsi*. Jurusan Kimia, UIN Malang.

- Ning, H. 2004. *Menumpas Diabetes Mellitus bersama Mahkota Dewa*. Depok: PT.Agromedia Pustaka
- Nugroho, E. A. 2011. Review Hewan Percobaan Diabetes Mellitus: Patologi dan Mekanisme Aksi Diabetogenik. *Jurnal Biodeversitas*. Vol. 7, No. 4 ISSN 1412-033x Hal. 378-382
- Nurhayati, S., Teja, K., dan Mukh, S. 2011. *Superoksida Dismutase (SOD): Apa dan Bagaimana Peranannya dalam Radioterapi*. Buletin Alara. Vol. 13, No. 2, hal. 67 – 74
- Nursalim, Y., Z. Y. Rozali. 2007. *Bekatul: Makanan yang Menyehatkan*. Jakarta: Agromedia
- Octavia, D, R. 2009. Uji Aktivitas Penangkapan Radikal Ekstrak Petroleum Eter, Etil Asetat dan Etanol daun Binahong (*Anredera cordifolia (Ten) Steenis*) dengan Metode DPPH. *Skripsi Diterbitkan*. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah
- Pearce. E. C. *Anatomi dan Fisiologi untuk Paramedis*. Jakarta: Gramedia
- Percival, M. 1998. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*: 1-4.
- Piyatu, L. 2007. *Penapisan Aktivitas Superoksida Dismutase dan Identifikasi Spesies dengan Metode 16 S rDNA dari Bakteri Asal Indonesia*. Departement Pharmacy.
- Prangdimurti, E., Muhtadi, D., Astawan, M., dan Zakaria, F. R. 2006. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Suji (*Pleomele angustifolia N. E. Brown*). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol. XXVII No. 2.
- Price, S. A., dan Lorraine, M. W. 1999. *Patofisiologi. Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Jakarta: EGC.
- Priyanto. 2007. *Toksisitas Obat, Zat kimia dan Terapi Antidotum*. Leskonfi: Depok.
- Hendromartono. 2014. *Nefropati Diabetik. Dalam: Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Edisi VI Jilid II. Jakarta: Pusat Penerbit FKUI; hlm 2386-396.
- Purwanto, A., Fajriyati, A. N., Wahyuningtyas, D. 2014. Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Rendemen dan Aktivitas Antioksidan dalam Ekstrak Minyak Bekatul Padi (*Rice bran oil*). *Jurnal Ekuilibrium*. ISSN : 1412-9124 Vol. 13 No.1.
- Quthb, S. 2001. *Tafsir Fi Zhilalil Qur'an*. Jakarta: Gema Insani Press

- Rahmawati, G. Rachmawati, F. N., Winarsi, H. 2014. Aktivitas *Superoksida Dismutase* Tikus Diabetes yang Diberi Ekstrak Batang Kapulaga dan Glibenklamid. *Scripta Biologica* Vol. 1, No. 3: 197–201
- Retnaningsih, C., Darmono, B. W., Siti, F. M. 2013. Peningkatan Aktivitas Antioksidan *Superoksida Dismutase* pada Tikus Hiperglikemi dengan Asupan Tempe Koro Benguk (*Mucuna Pruriens* L). *AGRITECH*. Vol. 33, No. 2
- Ritz, E., Keller, C., Kristian, H., Bergis. 2000. *Nephropathy of Type II Diabetes Mellitus*. *Nephrol Dial Transplant*. 11 Suppl 9: 38-44 dalam Probosari.
- Rizki, F. 2013. *The Miracle of Vegetables*. Jakarta: PT. Agromedia Mustaka.
- Robertson, R. P., J. Harmon, P. O., Tran, Y. Tanaka And H. Takahashi. 2003. Glucose Toxicity in Beta-Cells: Type 2 Diabetes, Good Radicals Gone Bad, and The Glutathione Connection. *Diabetes* 52: 581-587.
- Robinson, T. 1995. *The Organic Constituen of Higher Plants. 6th Edition*. Department of Biochemistry. University of Massachusetts.
- Rohilla, A., and Shahjad, A. 2012. Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects. *Review Article*. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. ISSN: 2229-3701. Vol. 3 (2)
- Saifudin, A. 2014. *Senyawa Alam Metabolik Sekunder: Teori, Konsep dan Teknik Pemurnian*. Yogyakarta: Deepublish.
- Saleh, C., Sitorus., dan Nursanti. 2012. Uji Hipoglikemik Ekstrak Etanol Umbi. *Anredera cordifolia* (Ten) Steenis. *Jurnal*. Samarinda: Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Mulawarman. Vol 11. Hal: 96-99.
- Sangi, M., Max R. J. R., Herny, E. I., Simbala dan Veronica, M. A. M. 2008. Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara. *Jurnal*. Chem. Prog. Jurusan Kimia dan Biologi Fakultas MIPA UNSRAT Manado. Vol. 1, No. 1.
- Saputra, F., E. M. Sutrisna., Nurhayani. 2016. Uji Efek Ekstrak Etanol 96% Anggur Merah (*Vitis vinifera*) terhadap Penurunan Kadar Trigliserida pada Tikus Putih (*Rattus Novergicus*) yang Diinduksi Triton X-100. *Biomedika*. Vol. 8 No. 2.
- Sari, F. W., Amanah, F. N. 2014. Mangan (Mn) dalam *Superoksida Dismutase* (SOD). *Makalah Publikasi Bioorganik*. Fakultas Matematika dan ilmu Pengetahuan Alam: UNS.
- Sax, D., Lewis, R., 1998. *Dictionary Chemistry*. Canada: Galler Internasional.

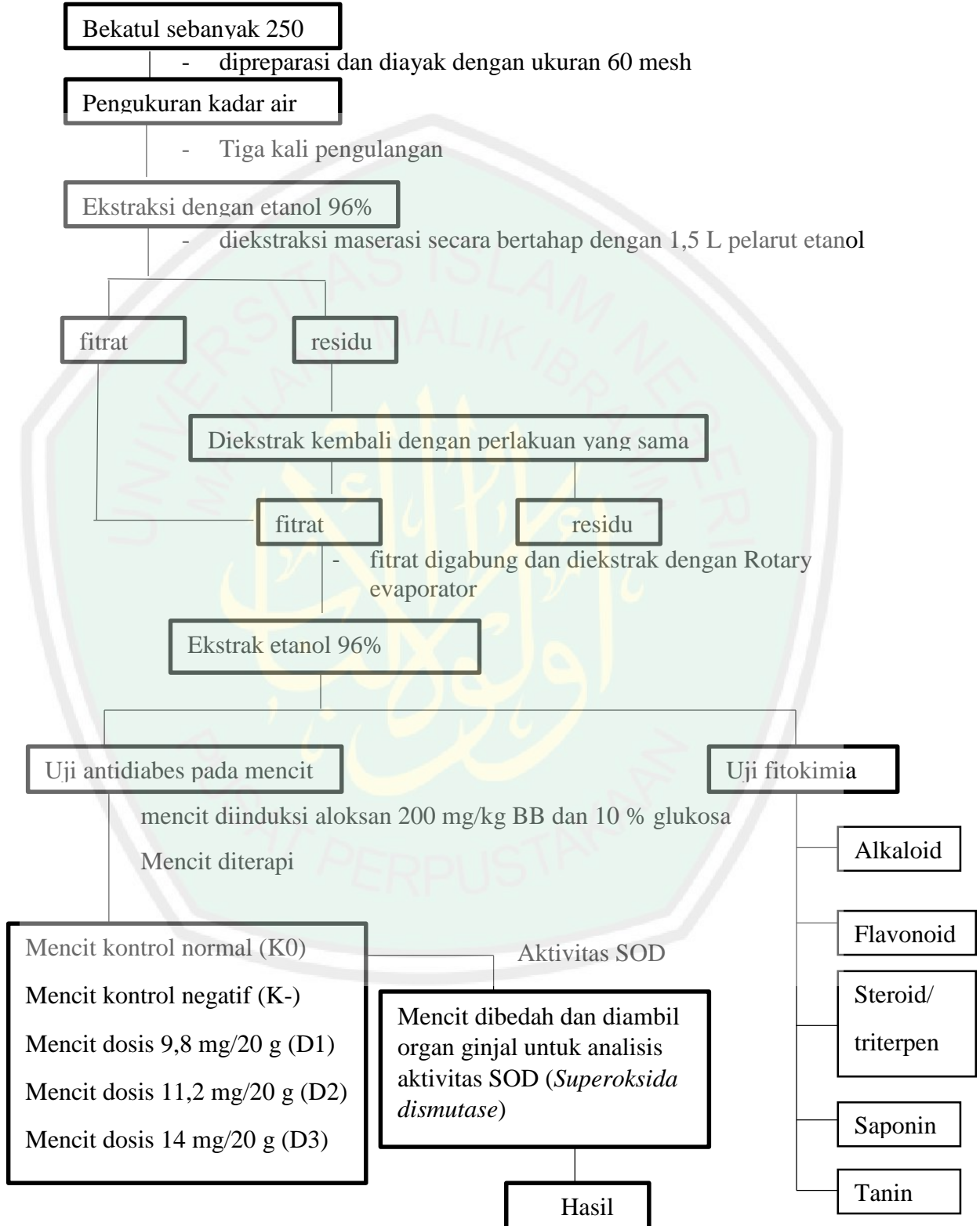
- Setiawan, B. 2005. *Stres Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Mellitus*. Fakultas Kedokteran Universitas Lampung Mangkurat: Kalimantan Selatan.
- Stahl, E. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Makroskopi*. Penj. Kosasih, P., dan Iwang, S. Bandung: ITB
- Suarsana, I. N., B.P. Priosoeryanto., M. Bintang., dan T. Wresdiyati. 2010. Profil Glukosa Darah dan Ultrastruktur Sel Beta Pankreas Tikus yang Diinduksi Senyawa Aloksan. *JITV* 15:2, 118-123
- Sudjadi, 1998. *Metode Pemisahan*. Yogyakarta: Kanisius
- Sumardjo, D. 2009. *Pengantar Kimia*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Sumbono, A. 2016. *Biokimia Pangan Dasar*. Jakarta: Deepublish
- Syafitri, S. 2016. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol dan Fraksi Bekatul dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazi. *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. IPB.
- Szkudelski, K., and Szkudelska. 2001. *Streptozotocin Induced Lipolysis in Rat Adipocytes in Vitro*. Departement of Aminal Physiology and Biochemistry. University of Agriculture, Poznan, Poland, *Physiol. Res.* 51: 255-259
- Vogel, A. I. 1990. *Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Makro dan Semimikro*. Jakarta: Kalman Media Pusaka..
- Voight, R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Diterjemahkan oleh Soedani Noerono Soewandhi, Apt. Yogyakarta: UGM Press
- Widowati dkk.,1997.*Tanaman Obat untuk Diabetes Melitus*. Jakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan Farmasi
- Wild, S., G. Roglic, A. Green, and R. Sicree. 2004. *Global Prevalence of Diabetes, Original Article Diabetes Care.* 27:5, 1047–1053
- Winarno, F. G. 2004. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Winarno, F. G., Fardias, D., Fardias, S. 1973. *Ekstraksi, Kromatografi dan Elektroforesis*. Bogor: IPB
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius
- Wiyono, P. 2003. Peranan Hiperglikemia Terhadap Terjadinya Komplikasi Kronik Diabetes Melitus. *Berkala Ilmu Kedokteran.* 35(1):55–60.

- Wresdiyati T., Astawan, M., Fithriani, D., Adyane, IKM., Hidayati, M. 2008. Pemanfaatan α tokoferol untuk Meningkatkan Profil *Superoksida Dismutase* (SOD) Ginjal Tikus di bawah Kondisi Stres. *Biota*. 13(3): 147–155
- Wresdiyati T., Astawan, M., Fithriani, D., Adyane, IKM., Hidayati., Novelina, S. Aryani, M. 2012. Pemanfaatan α tokoferol untuk Meningkatkan Profil *Superoksida Dismutase* (SOD) dan Malondialdehida pada Jaringan Hati Tikus di bawah Kondisi Stres. *Jurnal Veteriner*. Institut Pertanian Bogor
- Yosi, E. F., Sahara., Sandi, S. 2014. Analisis Sifat Fisik Bekatul dan Ekstrak Minyak Bekatul Hasil Fermentasi *Rhizopus sp.* dengan Menggunakan Inokulum Tempe. *Jurnal Peternakan Sriwijaya*. ISSN 2303 – 1093. Vol. 3, No. 1
- Zhang, M. W., Zhang, R. F., Zhang, F. X., and Liu, R. H. 2010. Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of Black Rice Bran of Different Commercially Available Varieties. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7580– 7587.



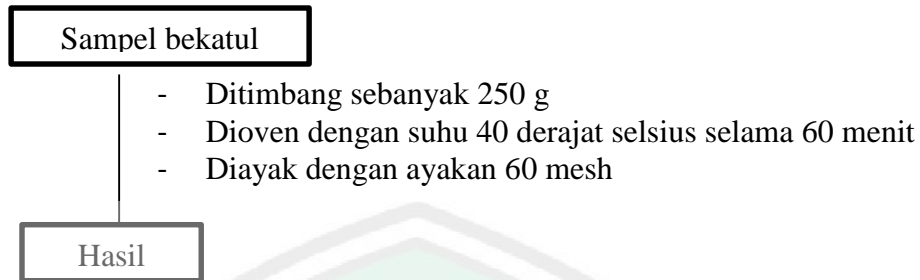
LAMPIRAN

Lampiran 1 Diagram Alir Penelitian

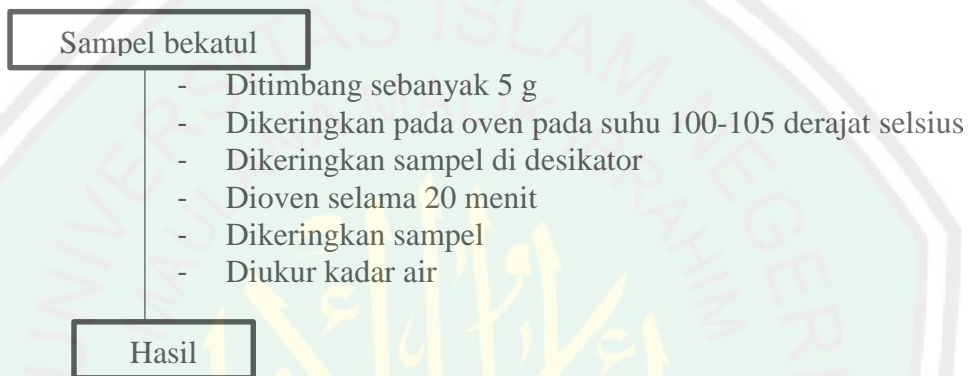


Lampiran 2 Skema Kerja

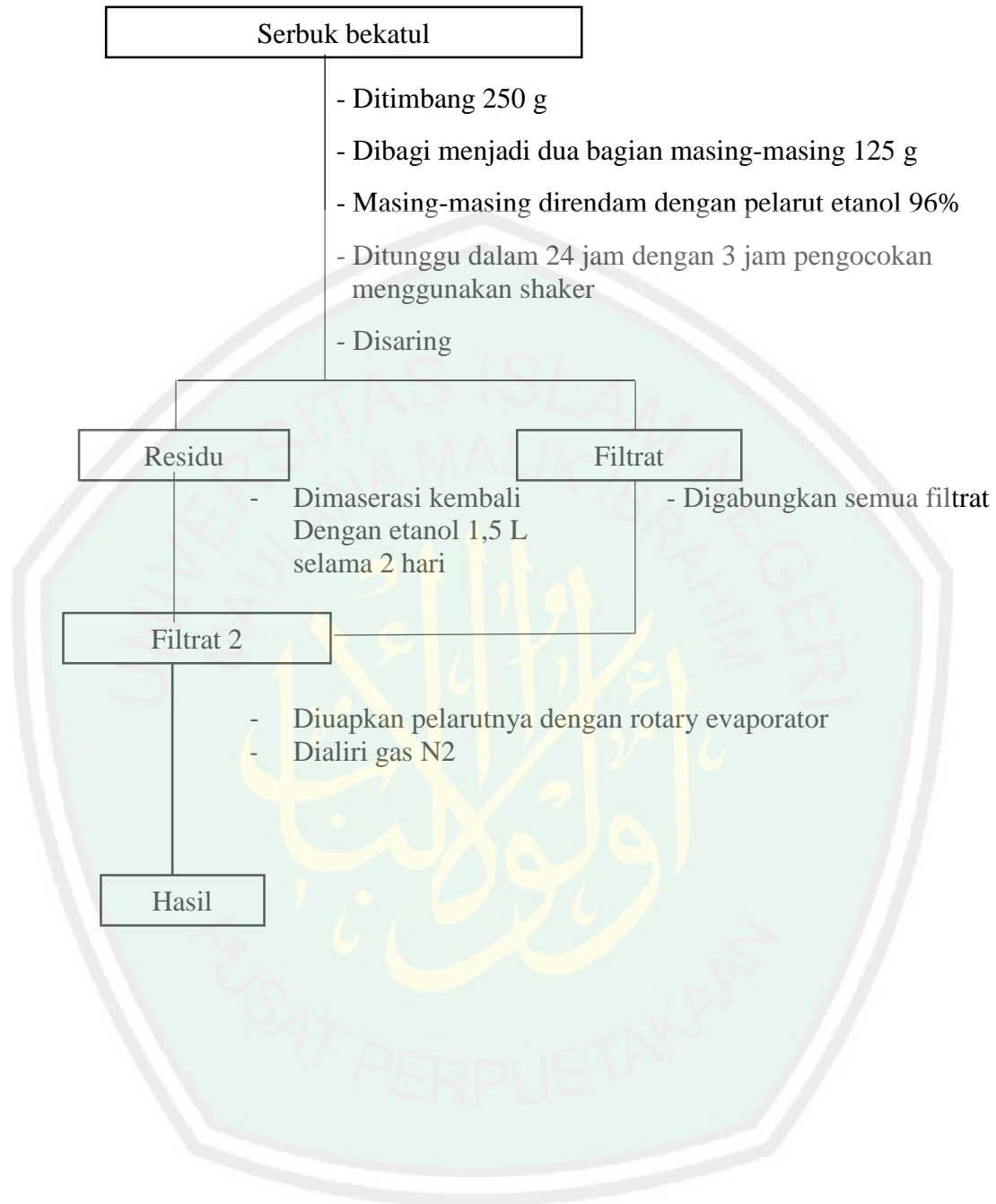
L.2.1 Preparasi Sampel



L.2.2 Penentuan Kadar Air

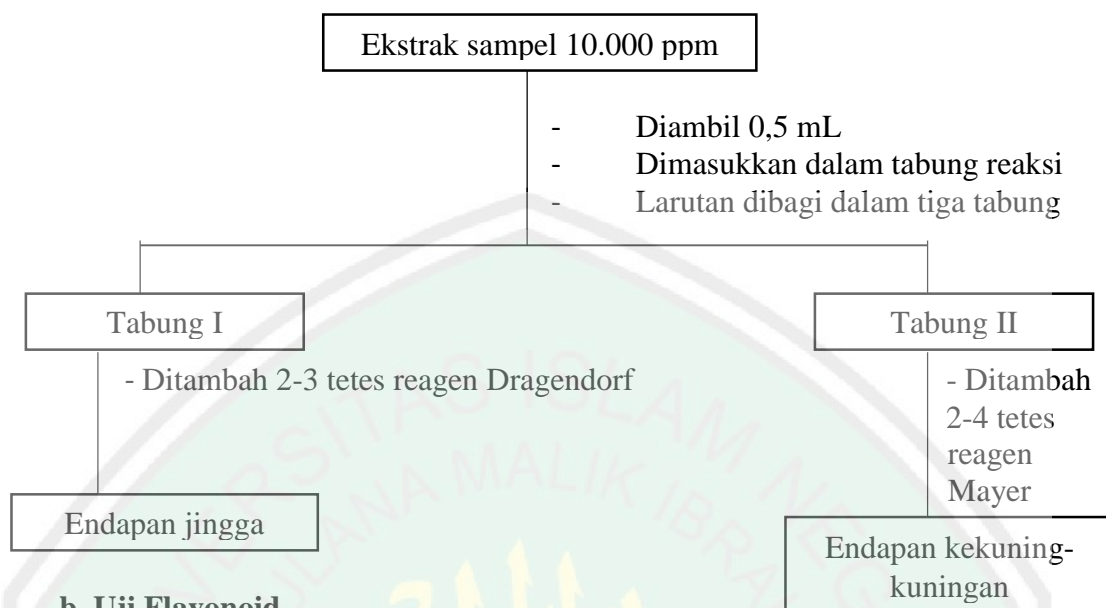


L.2.3 Ekstraksi Bekatul

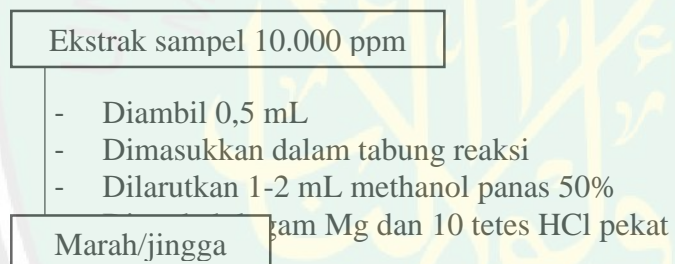


L.2.4 Uji Fitokimia

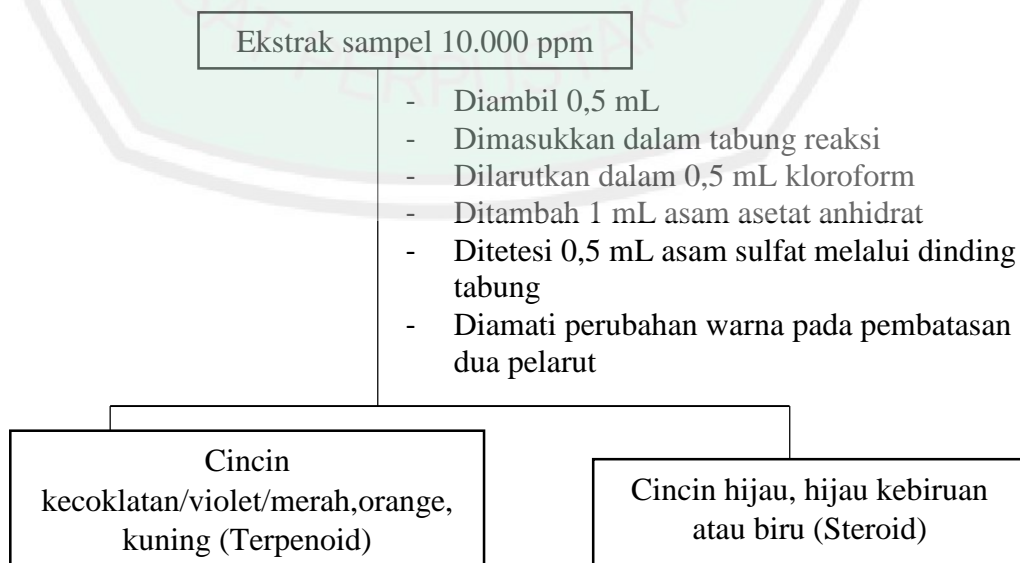
a. Uji Alkoloid



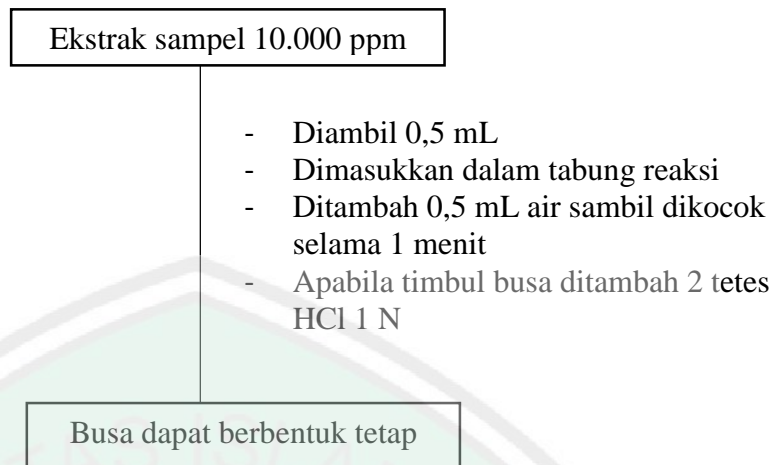
b. Uji Flavonoid



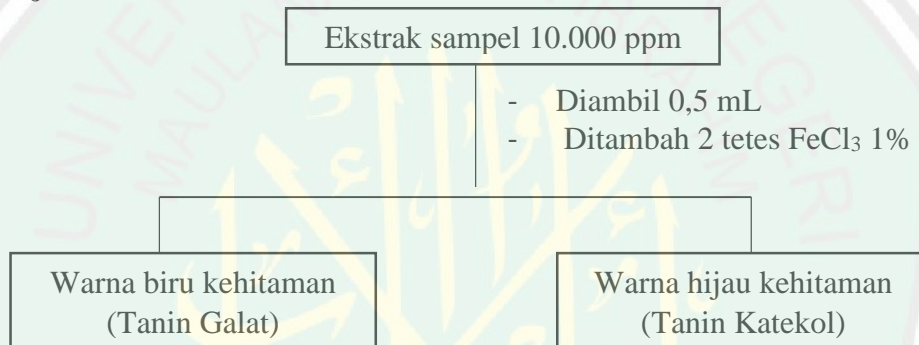
c. Uji Steroid dan Triterpenoid



d. Uji Saponin

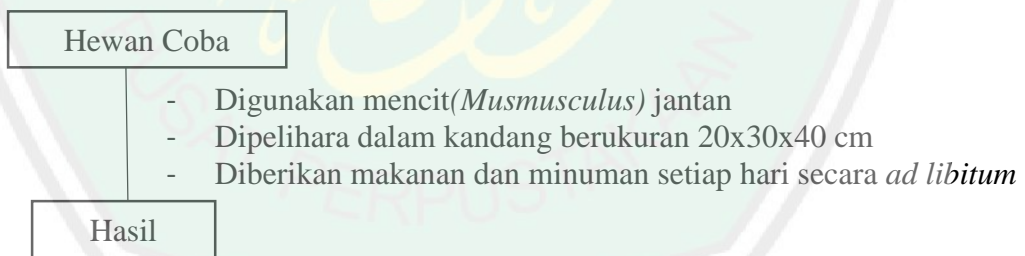


e. Uji Tanin

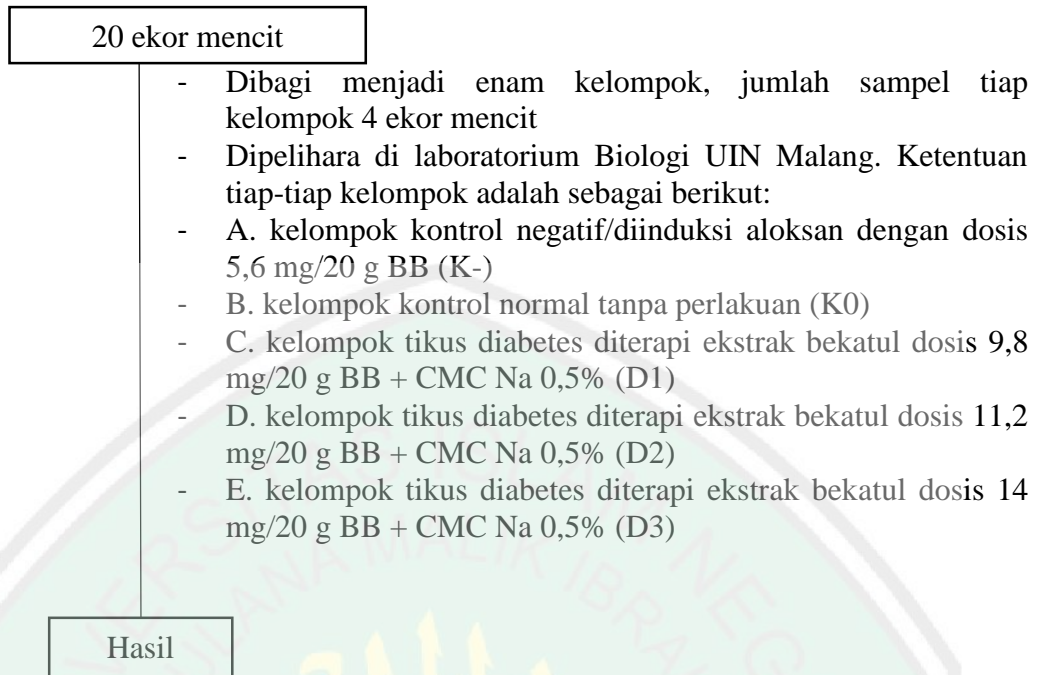


L.2.5 Uji Antidiabetes

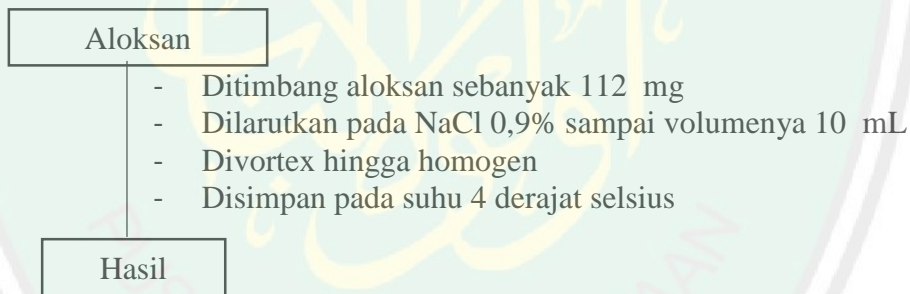
a. Penyiapan Hewan Coba



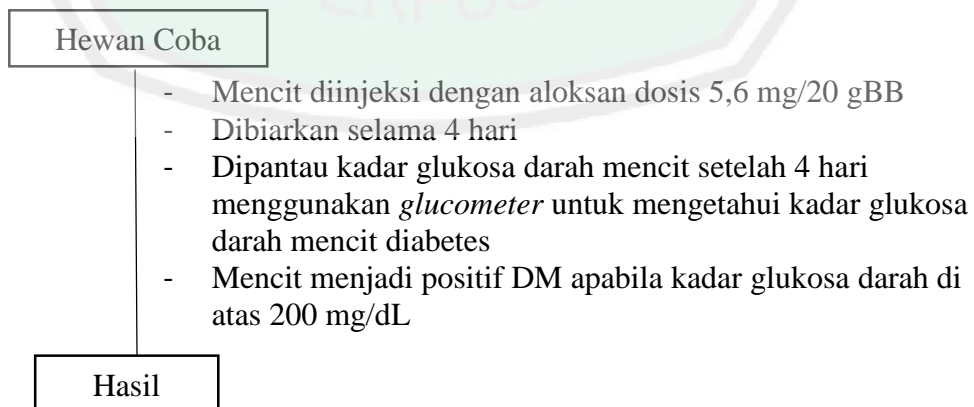
b. Perlakuan hewan Coba



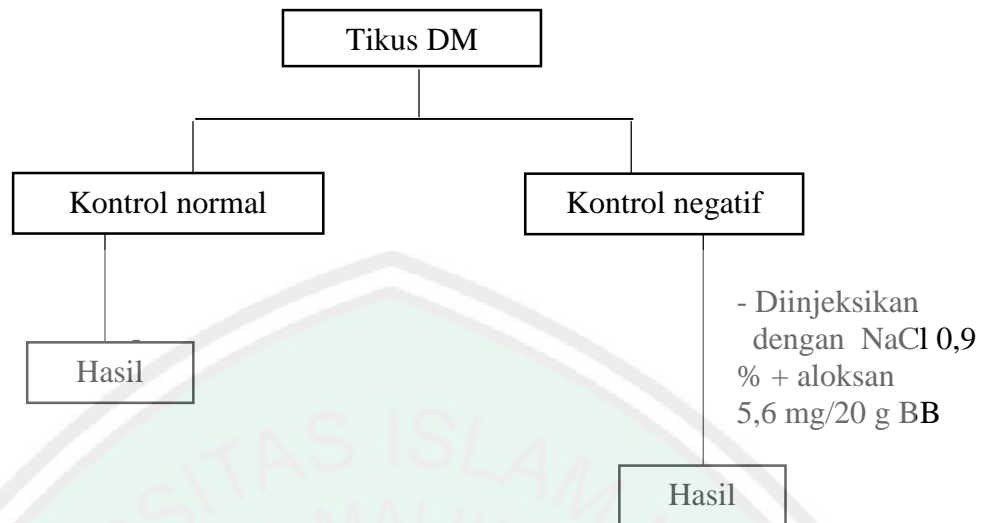
c. Pembuatan Larutan Aloksan



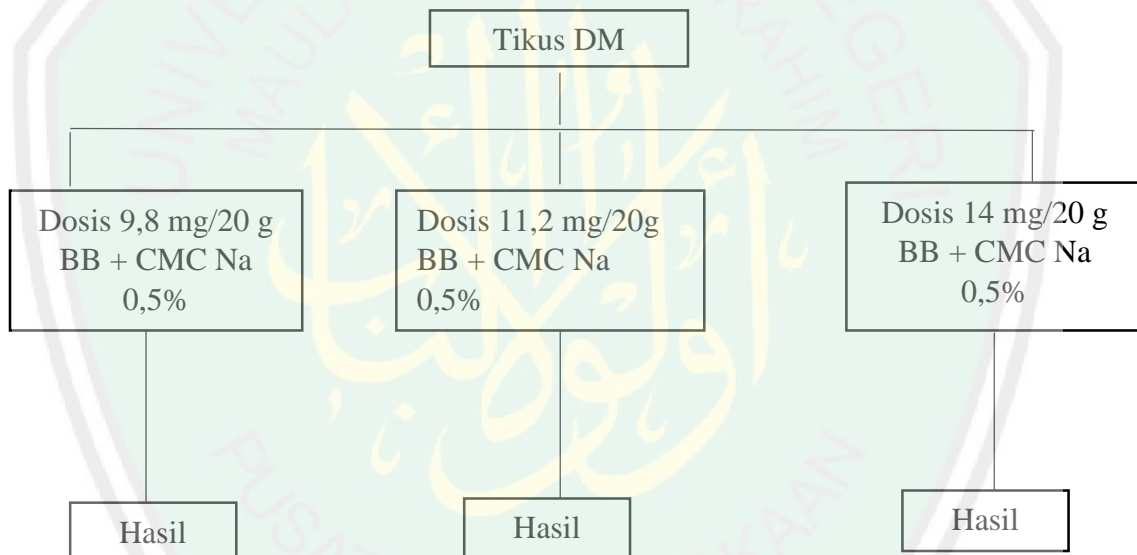
d. Pembuatan Mencit Diabetes Mellitus (DM)



e. Pembuatan Mencit Kontrol Positif dan Negatif

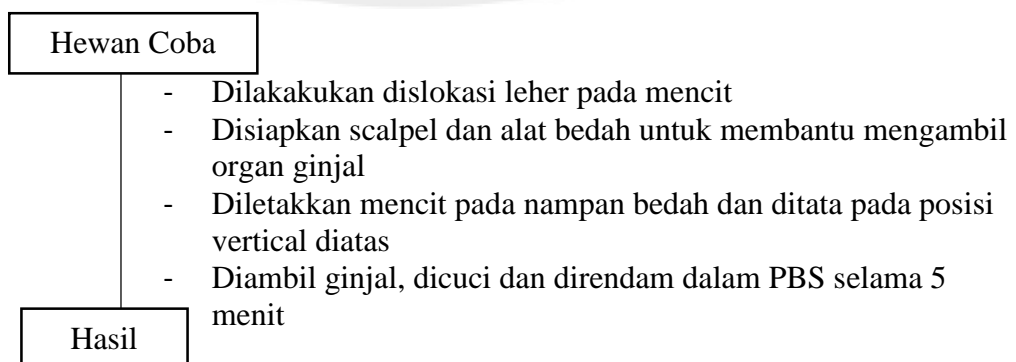


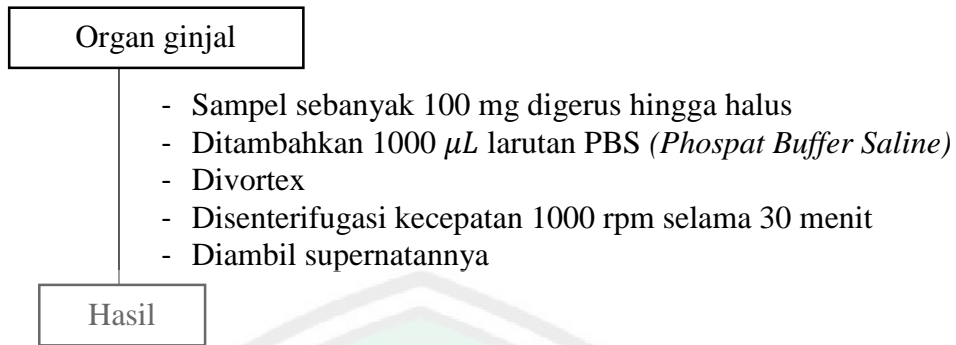
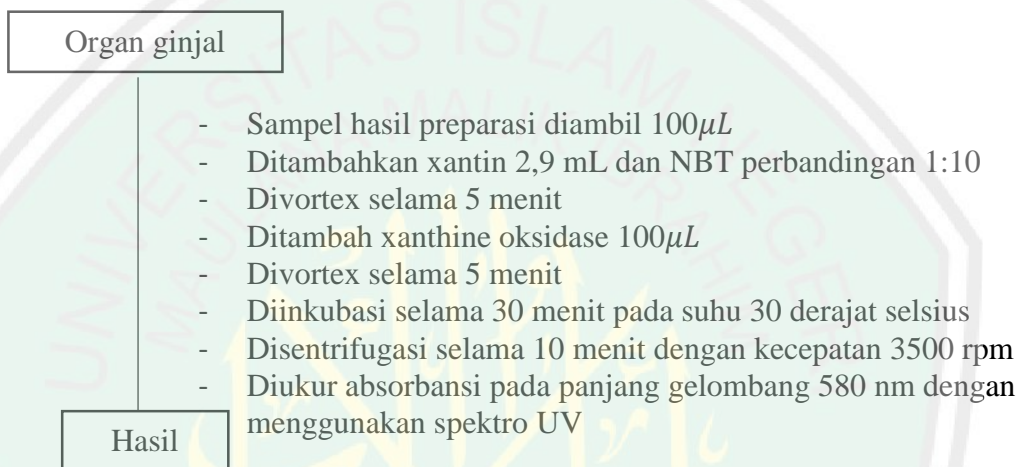
f. Terapi Tikus DM dengan Ekstrak Bekatul



L.2.6 Analisis SOD

a. Pengambilan Organ Ginjal



b. Preparasi Sampel Ginjal**c. Pengukuran SOD**

Lampiran 3 Pembuatan dan Perhitungan Larutan

L.3.1 Pembuatan Reagen Dragendroff

Pembuatan pereaksi Dragendroff dilakukan dalam 2 bagian yang berbeda. Pada larutan A sebanyak 0,85 g bismuth subnitrat dimasukkan dalam gelas beker 100 mL, dilarutkan dalam 40 mL aquades ditambah 10 mL HCl. Pada larutan B, sebanyak 8 g kalium iodida dilarutkan dalam 20 mL aquades dalam gelas beker 100 mL. Kemudian masing-masing larutan A dan B diambil sebanyak 5 mL dan dicampurkan dengan 20 mL HCL selanjutnya dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditandabatkan dengan aquades (Ditjen POM, 1989).

L.3.2 Pembuatan Reagen Mayer

Sebanyak 1,385 raksa (II) klorida dilarutkan dalam aquades hingga 60 mL. pada wadah lain dilarutkan 5 g kalium iodide dalam 10 mL aquades. Kemudian dicampurkan dan ditambahkan aquades hingga diperoleh larutan 100 mL pada labu ukur (Ditjen POM, 1978).

L.3.3 Pembuatan Reagen Liebermann-Burchard

Sebanyak 5 mL asam sulfat pekat dan 5 mL anhidrat asetat serta 5 mL metanol dengan pipet volume. Kedua larutan dicampur dan dimasukkan ke dalam gelas beker 100 mL dan didinginkan dalam lemari asam. Penggunaan reagen ini digunakan langsung setelah pembuatan reagen.

L.3.4 Pembuatan FeCl₃ 1%

$$\% \text{ konsentrasi} = \frac{g \text{ terlarut}}{g \text{ terlarut} + g \text{ pelarut}} \times 100\%$$

$$G \text{ terlarut} + g \text{ pelarut} = \frac{g \text{ terlarut}}{\% \text{ konsentrasi}} \times 100\%$$

$$1 \text{ g} + g \text{ pelarut} = \frac{1 \text{ g}}{1\%} \times 100\%$$

$$G \text{ pelarut} = 100\text{g} - 1\text{g} = 99\text{g}$$

$$\text{Volume pelarut} = \frac{g \text{ pelarut}}{BJ \text{ pelarut}} = \frac{99\%}{1 \text{ g/mL}} = 99 \text{ mL}$$

Pembuatan FeCl_3 1% adalah ditimbang sebanyak 1 g kemudian dimasukkan ke dalam gelas beker 100 mL, ditambahkan 99 mL aquades dengan pipet ukur 100 mL lalu dihomogenkan.

L.3.5 Pembuatan Metanol 50%

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$99,8\% \times V_1 = 50\% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 5 \text{ mL}$$

Pembuatan metanol 50% adalah diambil larutan metanol 99,8% sebanyak 5 mL dengan pipet volume, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL yang berisi 5 mL aquades. Selanjutnya ditandabatkan dan dihomogenkan.

L.3.6 Pembuatan HCl 1 N

$$\text{BJ HCl} = 1,19 \text{ g/mL} = 1190 \text{ g/L}$$

$$\text{Konsentrasi} = 37\%$$

$$\text{BM} = 36,42 \text{ g/mol}$$

$$n = 1 \text{ (jumlah nol ion H}^+\text{)}$$

$$\text{normalitas HCl} = n \times \text{Molaritas HCl}$$

$$= 1 \times \frac{37\% \times \text{BJ HCl}}{\text{BM HCl}}$$

$$= 1 \times \frac{37\% \times 1190 \text{ g/L}}{36,42 \text{ g/mol}}$$

$$= 12,09 \text{ N}$$

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$12,09 \text{ N} \times V_1 = 1 \text{ N} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 8,27 \text{ mL} = 8,3 \text{ mL}$$

Pembuatan HCl 1 N adalah HCl 37% diambil sebanyak 8,3 mL dengan pipet ukur 10 mL. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL yang telah

berisi aquades 15 mL, selanjutnya ditandabatskan dengan aquades dan dikocok sampai homogen.

L.3.7 Pembuatan HCl 2%

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$37\% \times V1 = 2\% \times 10 \text{ mL}$$

$$V1 = 0,54 \text{ mL}$$

Pembuatan HCl 2% yaitu diambil sebanyak 0,54 mL dengan pipet ukur 1 mL. Kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditandabataskan dengan aquades dan dikocok hingga homogen.



Lampiran 4 Penentuan dan Perhitungan Dosis

L.4.1 Tabel Konversi Perhitungan Dosis

Tabel 4.1 Konversi Dosis

	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmut 400 g	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Ma nusi a 70 kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	87,9
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmu t 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 2 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,1	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusi a 70 kg	0,0026	0,01	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

(Andrieyani dkk., 2015)

L.4.2 Dosis Ekstrak Etanol Bekatul

Penentuan dosis ekstrak etanol bekatul diberikan pada manusia dengan beberapa dosis antara lain 350 mg/kg BB, 400 mg/kg BB dan 500 mg/kg BB dengan perhitungan sebagai berikut.

Dosis 1: 350 mg/kg BB manusia

$$\begin{aligned} \text{Pada tikus } 200 \text{ g} &= 350 \text{ mg}/1000\text{g} \times 200 \text{ g} \\ &= 70 \text{ mg}/200 \text{ g BB} \end{aligned}$$

Untuk terapi mencit maka dosis dikonversi

Konversi dosis dari tikus ke mencit = 0,14

$$\begin{aligned} \text{Pada mencit } 20 \text{ g} &= 70 \text{ mg} \times 0,14 \\ &= 9,8 \text{ mg}/20 \text{ g BB} \end{aligned}$$

Dosis 2: 400 mg/kg BB manusia

$$\begin{aligned} \text{Pada tikus } 200 \text{ g} &= 400 \text{ mg}/1000 \text{ g} \times 200 \text{ g} \\ &= 80 \text{ mg}/200 \text{ g BB} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Pada mencit } 20 \text{ g} &= 80 \text{ mg} \times 0,14 \\ &= 11,2 \text{ mg}/20 \text{ g BB} \end{aligned}$$

Dosis 3: 500 mg/kg BB manusia

$$\begin{aligned} \text{Pada tikus } 200 \text{ g} &= 500\text{mg}/1000 \text{ g} \times 200 \text{ g} \\ &= 100 \text{ mg}/200 \text{ g BB} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Pada mencit } 20 \text{ g} &= 100 \text{ mg} \times 0,14 \\ &= 14 \text{ mg}/20 \text{ g BB} \end{aligned}$$

L.4.3 Perhitungan induksi aloksan

Dosis pada tikus 200 mg/kg BB

$$\begin{aligned} \text{Pada tikus } 200 \text{ g} &= 200 \text{ g}/1000 \text{ g} \times 200 \text{ mg/kg BB} \\ &= 40 \text{ mg}/ 200 \text{ g BB} \end{aligned}$$

Faktor konversi dari tikus ke mencit = 0, 14

$$\text{Pada mencit } 20 \text{ g} = 40 \text{ mg} \times 0,14 = 5,6 \text{ mg}/20 \text{ g BB}$$

L.4.4 Perhitungan Penggunaan Aloksan

Dosis aloksan yang digunakan adalah 5,6 mg/20 g BB mencit. Sehingga aloksan yang dibutuhkan adalah

Rumus Jumlah Aloksan = Dosis x Jumlah Mencit x 1 Kali Induksi

Keterangan:

Jumlah mencit = 20 ekor

$$\begin{aligned}\text{Sehingga Jumlah Aloksan} &= 5,6 \times 20 \times 1 \\ &= 112 \text{ mg}\end{aligned}$$

L.4.5 Perhitungan Dosis dan Jumlah Ekstrak Larutan Uji

Rumus: Jumlah sampel tiap perlakuan x Dosis x Jumlah hari terapi

Keterangan:

Jumlah sampel tiap perlakuan = 4 ekor

Jumlah hari terapi = 14 hari

$$\begin{aligned}\text{Dosis 1} &= 4 \times 9,8 \text{ mg} \times 14 \text{ hari} \\ &= 548,8 \text{ mg}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Dosis 2} &= 4 \times 11,2 \text{ mg} \times 14 \text{ hari} \\ &= 627,2 \text{ mg}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Dosis 3} &= 4 \times 14 \text{ mg} \times 14 \text{ hari} \\ &= 784 \text{ mg}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Dosis 4} &= 4 \times 16,8 \text{ mg} \times 14 \text{ hari} \\ &= 904,8 \text{ mg}\end{aligned}$$

Sehingga:

Jumlah total ekstrak untuk uji antidiabetes = 2,864.8 mg = 2,8648 g

Perhitungan total ekstrak uji fitokimia yaitu:

Pembuatan ekstrak bekatul 10.000 ppm:

$$10.000 \text{ ppm} = \frac{10.000 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{10.000 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} = \frac{100 \text{ mg}}{10 \text{ mL}}$$

Ekstrak pekat bekatul ditimbang sebanyak 100 mg kemudian diencerkan dengan 10 mL pelarut etanol 96%. Dihomogenkan dengan pengaduk gelas sehingga diperoleh ekstrak berkonsentrasi 10.000 ppm (ekstrak yang lebih encer mempermudah analisis kualitatif dengan reagen tertentu). Perbandingan 100 mg :

10 mL digunakan karena jika menggunakan perbandingan 10 mg : 1 mL menyebabkan error dalam proses penimbangan dengan neraca analitik dikarenakan satuan mg merupakan nilai yang sangat kecil.

Untuk uji alkaloid = 0,5 mL

Uji flavonoid = 0,5 mL

Uji Steroid dan triterpenoid = 0,5 mL

Uji Saponin = 0,5 mL

Uji Tanin = 0,5 mL

Jadi total ekstrak yang dibutuhkan adalah 100 mg

Maka diperkirakan jumlah ekstrak total yang digunakan adalah:

$$2,864.8 \text{ mg} + 100 \text{ mg} = 2,964.8 \text{ mg} = 2.96498 \text{ g}$$



Lampiran 5. Perhitungan Analisis Kadar Air dan Rendemen Ekstrak

L.5.1 Pengukuran Kadar Air

Diketahui :

$$\text{kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\%$$

a = Berat cawan kosong

b = Berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = Berat cawan + sampel sesudah dikeringkan

Ulangan	a	b	c
1	54,259	59,271	58,791
2	49,822	54,398	54,344
3	55,769	60,361	60,309

Maka masing-masing kadar air bekatul adalah sebagai berikut.

$$\begin{aligned} \text{KA1} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\% \\ &= \frac{59,271-58,791}{59,271-54,259} \times 100\% = 1,3\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KA2} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\% \\ &= \frac{54,398-54,344}{54,398-49,822} \times 100\% = 1,07\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KA3} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\% \\ &= \frac{60,361-60,309}{60,361-55,769} \times 100\% = 1,01\% \end{aligned}$$

Sehingga

$$\text{KA total} = \frac{1,3\%+1,07\%+1,01\%}{3} = 1.12 \%$$

$$\begin{aligned} \text{Faktor koreksi} &= \frac{100}{100-\% \text{ kadar air}} \\ &= \frac{100}{100-1.12\%} \\ &= 1.01\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Kadar air terkoreksi} &= \text{kadar air} - \text{faktor koreksi} \\ &= 1,12\% - 1,01\% \\ &= 0,11\%\end{aligned}$$

L.5.2 Perhitungan Rendemen

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

Diketahui

$$\text{Berat sampel awal} = 250 \text{ g}$$

$$\text{Berat botol} = 100,2694 \text{ g}$$

$$\text{Berat ekstrak} = 36,6335 \text{ g}$$

Sehingga diperoleh rendemen sebesar

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{36,6335 \text{ g}}{250 \text{ g}} \times 100\% = 14,653\%$$

Lampiran 6 Pengukuran Aktivitas SOD (*Superoksida dismutase*) Ginjal Mencit

L.6.1 Perhitungan Pembuatan Larutan Baku SOD

Larutan stok SOD 1000 U/mL

Diencerkan sebesar 10, 20,40,80 dan 100 U/mL

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Diketahui bahwa U/mL setara mmol/mL

M = mol/L atau M= mmol/mL

a. Larutan SOD 100 U/mL

$$1000 \text{ mmol} \times V_1 = 10 \text{ mmol} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 100 \text{ mmol} \cdot \text{mL} / 1000 \text{ mmol}$$

$$V_1 = 0.1 \text{ mL}$$

b. Larutan SOD 20 U/mL

$$1000 \text{ mmol} \times V_1 = 20 \text{ mmol} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 200 \text{ mmol} \cdot \text{mL} / 1000 \text{ mmol}$$

$$V_1 = 0,2 \text{ mL}$$

c. Larutan SOD 40 U/mL

$$1000 \text{ mmol} \times V_1 = 40 \text{ mmol} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 400 \text{ mmol} \cdot \text{mL} / 1000 \text{ mmol}$$

$$V_1 = 0,4 \text{ mL}$$

d. Larutan SOD 80 U/mL

$$1000 \text{ mmol} \times V_1 = 80 \text{ mmol} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 800 \text{ mmol} \cdot \text{mL} / 1000 \text{ mmol}$$

$$V_1 = 0,8 \text{ mL}$$

e. Larutan SOD 100 U/mL

$$1000 \text{ mmol} \times V_1 = 100 \text{ mmol} \times 10 \text{ mL}$$

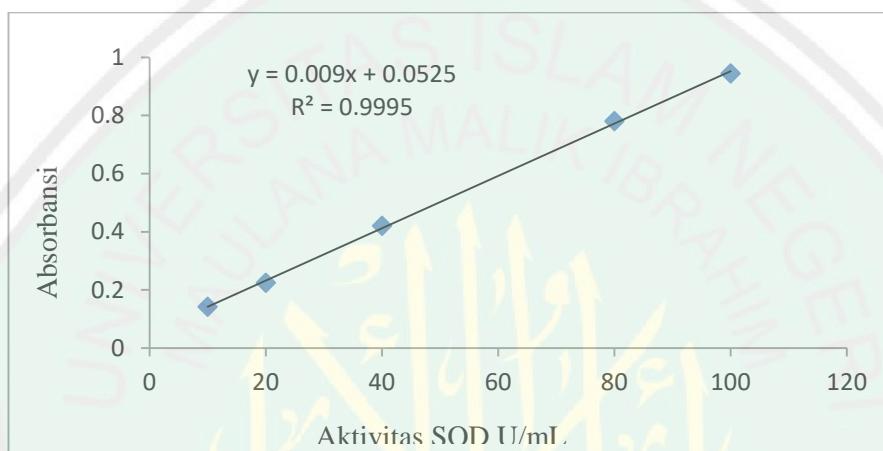
$$V_1 = 1000 \text{ mmol} \cdot \text{mL} / 1000 \text{ mmol}$$

$$V_1 = 1 \text{ mL}$$

L.6.2 Kurva Baku SOD

Tabel L.6.2 Data absorbansi aktivitas SOD dan kurva standar SOD

No	Aktivitas (U/mL)	ABS
1	10	0.142
2	20	0.225
3	40	0.420
4	80	0.780
5	100	0.944



L.6.3 Tabel Hasil Aktivitas SOD

No	Kode Perlakuan	ABS	Aktivitas (U/mL)
1	K0.1	0.143	10.111
2	K0.2	0.150	10.889
3	K0.3	0.057	0.556
4	K0.4	0.073	2.333
Rata-rata		0.105	5.972
5	K-1	0.085	3.667
6	K-2	0.072	2.222
7	K-3	0.111	6.556
8	K-4	0.099	5.222
Rata-rata		0.091	4.419
9	D1.1	0.113	6.778
10	D1.2	0.172	13.333
11	D1.3	0.134	9.111
12	D1.4	0.128	8.444
Rata-rata		0.136	9.416
13	D2.1	0.114	6.889
14	D2.2	0.089	4.111
15	D2.3	0.207	17.222
16	D2.4	0.162	12.222
Rata-rata		0.143	10.110
17	D3.1	0.112	6.667
18	D3.2	0.145	10.333
19	D3.3	0.142	10.000
20	D3.4	0.121	7.667
Rata-rata		0.13	8.666

L.6.4 Perhitungan, Tabel dan Grafik Rerata Aktivitas SOD

Diketahui $y = 0.009x + 0.0525$

$$K0 = \frac{(\text{Absorbansi} - 0.0525)}{0.009} = \frac{(0.105 - 0.0525)}{0.009} = 5.972$$

$$K- = \frac{(\text{Absorbansi} - 0.0525)}{0.009} = \frac{(0.091 - 0.0525)}{0.009} = 4.419$$

$$D1 = \frac{(\text{Absorbansi} - 0.0525)}{0.009} = \frac{(0.136 - 0.0525)}{0.009} = 9.416$$

$$D2 = \frac{(\text{Absorbansi} - 0.0525)}{0.009} = \frac{(0.143 - 0.0525)}{0.009} = 10.110$$

$$D3 = \frac{(\text{Absorbansi} - 0.0525)}{0.009} = \frac{(0.13 - 0.0525)}{0.009} = 8.666$$

No	Kode	Aktivitas (U/mL)
1	K0	5.97
2	K-	4.41
3	D1	9.41
4	D2	10.11
5	D3	8.66

L.6.5 Perhitungan Standar Deviasi Kelompok Perlakuan

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{(x1 - \bar{x})^2 + (x2 - \bar{x})^2 + (x3 - \bar{x})^2 + (x4 - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Keterangan:

x : Nilai aktivitas SOD tiap ulangan

\bar{x} : Nilai rata-rata aktivitas SOD tiap perlakuan

n : Jumlah ulangan tiap kelompok perlakuan

a. Standar Deviasi Kelompok Kontrol Normal

$$SD = \sqrt{\frac{(10.111 - 5.972)^2 + (10.889 - 5.972)^2 + (0.556 - 5.972)^2 + (2.333 - 5.972)^2}{4 - 1}}$$

$$SD = \sqrt{\frac{83.88359}{3}} = 5.287$$

$$\%RSD = \frac{5.287}{5.972} \times 100\% = 88.5\%$$

b. Standar Deviasi Kelompok Kontrol Negatif

$$SD = \sqrt{\frac{(3.667 - 4.419)^2 + (2.222 - 4.419)^2 + (6.556 - 4.419)^2 + (5.222 - 4.419)^2}{4 - 1}}$$

$$SD = \sqrt{\frac{10.60389}{3}} = 1.880$$

$$\%RSD = \frac{1.880}{4.419} \times 100\% = 42.5\%$$

c. Standar Deviasi Kelompok Dosis 1

$$SD = \sqrt{\frac{(6.778 - 9.416)^2 + (13.333 - 9.416)^2 + (9.111 - 9.416)^2 + (8.444 - 9.416)^2}{4 - 1}}$$

$$SD = \sqrt{\frac{23.33974}{3}} = 2.789$$

$$\%RSD = \frac{2.789}{9.416} \times 100\% = 30.4\%$$

d. Standar Deviasi Kelompok Dosis 2

$$SD = \sqrt{\frac{(6.889 - 10.110)^2 + (4.111 - 10.110)^2 + (17.222 - 10.110)^2 + (12.222 - 10.110)^2}{4 - 1}}$$

$$SD = \sqrt{\frac{101.4039}{3}} = 5.813$$

$$\%RSD = \frac{5.813}{10.110} \times 100\% = 57.4\%$$

e. Standar Deviasi Kelompok Dosis 3

$$SD = \sqrt{\frac{(6.667 - 8.666)^2 + (10.333 - 8.666)^2 + (10.000 - 8.666)^2 + (7.667 - 8.666)^2}{4 - 1}}$$

$$SD = \sqrt{\frac{9.552447}{3}} = 1.784$$

$$\%RSD = \frac{1.784}{8.666} \times 100\% = 20.5\%$$

NB : Apabila nilai % RSD > 2% maka hasil pengukuran memiliki ketelitian yang kurang baik

Lampiran 7 Analisis Statistik ANOVA Aktivitas SOD Ginjal Menggunakan Perhitungan Manual

Perlakuan	Ulangan				Total	Rerata
	1	2	3	4		
K0	10.111	10.889	0.556	2.333	23.889	5.972
K-	3.667	2.222	6.566	5.222	17.677	4.419
D1	6.778	13.333	9.111	8.444	37.666	9.416
D2	6.888	4.111	17.222	12.222	40.443	10.110
D3	6.667	10.333	10.000	7.667	34.667	8.666
Total σ^2					154.342	

Tujuan: Untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan pemberian variasi dosis ekstrak bekatul terhadap aktivitas SOD pada ginjal mencit diabetes

Hipotesis:

H_0 : Tidak ada pengaruh pemberian ekstrak bekatul terhadap aktivitas SOD ginjal mencit diabetes

H_1 : Ada pengaruh pemberian ekstrak bekatul terhadap aktivitas SOD ginjal mencit diabetes

Penarikan Kesimpulan:

H_0 diterima atau H_1 ditolak jika nilai sig. > 0.05 dan $F_{hitung} < F_{0.05}$

H_0 ditolak atau H_1 diterima jika nilai sig. < 0.05 dan $F_{hitung} > F_{0.05}$

Menghitung FK (Frekuensi Kuadrat)

$$FK = \frac{\sigma^2}{r \times n} = \frac{(154.342)^2}{4 \times 5} = \frac{23821,453}{20} = 1191,072$$

Menghitung JK (Jumlah Kuadrat)

$$\begin{aligned} JK \text{ total} &= \sum x^2 - FK \\ &= \{(10.111)^2 + (10.889)^2 + (0.556)^2 + \dots + (7.667)^2\} - 1191,072 \\ &= 1513,568 - 1191,072 \\ &= 322,496 \end{aligned}$$

$$JK \text{ perlakuan} = \frac{\text{Total kuadrat}}{r} - FK$$

$$= \frac{5139,325}{4} - 1191,072$$

$$= 93,759$$

$$\text{JK galat} = \text{JK total percobaan} - \text{JK Perlakuan}$$

$$= 322,496 - 93,759$$

$$= 228,737$$

Menghitung Derajat Bebas (Db)

$$\text{Db perlakuan} = t-1$$

$$= 5-1$$

$$= 4$$

$$\text{Db galat} = (rt - 1) - (t - 1)$$

$$= (4 \times 5) - (5-1)$$

$$= 20 - 4$$

$$= 16$$

$$\text{Db total} = (rt - 1)$$

$$= (4 \times 5 - 1)$$

$$= 19$$

Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

$$\text{KT perlakuan} = \text{JK perlakuan} / \text{Db perlakuan}$$

$$= 93,759 / 4$$

$$= 23,439$$

$$\text{KT galat} = \text{JK galat} / \text{Db galat}$$

$$= 228,737 / 16$$

$$= 14,296$$

Menghitung F hitung

$$\text{F hitung} = \text{KT perlakuan} / \text{KT galat}$$

$$= 23,439 / 14,296$$

$$= 1,63$$

SK	Db	JK	KT	F hitung	F 0,05
Perlakuan	4	93,759	23,439	1,639	2,17
Galat	16	228,737	14,296		
Total	19	322,496			

Berdasarkan analisis diatas bahwa nilai F hitung < F table, sehingga H_0 diterima H_1 ditolak.

Lampiran 8 Analisis Statistik ANOVA Aktivitas SOD Ginjal Menggunakan SPSS 16.00

Tabel Uji ANOVA

ANOVA					
VAR00001	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	93.829	4	23.457	1.538	.242
Within Groups	228.784	15	15.252		
Total	322.613	19			

Lampiran 9 Kadar Glukosa Mencit pada Masing-masing Perlakuan dan Berat Badan Mencit

L.9.1 Kadar Glukosa Darah Mencit Sebelum Diinduksi dan diterapi

Sebelum terapi	Perlakuan				
	Kontrol Normal	Kontrol Negatif	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3
Kadar glukosa darah	102	72	52	82	70
	100	40	52	101	115
	73	56	87	125	66
	52	68	96	74	67

L.9.2 Kadar Glukosa Darah Mencit Setelah Diinduksi dan Diterapi pada H₁ H₄ H₁₄

Hari terapi	Jenis Perlakuan				
	Kontrol Normal	Kontrol Negatif	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3
H ₁₄	100	470	476	141	120
	108	111	181	192	418
	74	261	221	217	377
	56	274	321	161	152




L.9.3 Rerata Kadar Glukosa Darah Setelah Diterapi

Perlakuan	Hari Terapi
	H-14
Kontrol normal	84.5
Kontrol negatif	279
Dosis 1	299.75
Dosis 2	177.75
Dosis 3	266.75

L.9.4 Berat Badan Mencit

Hari Terapi	Jenis Perlakuan				
	Kontrol Normal	Kontrol Negatif	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3
H0	21	20	20	20	19
	19	21	21	19	22
	20	18	19	19	20
	20	19	20	21	20
H1	21	22	22	22	19
	22	23	19	20	20
	20	20	21	20	23
	21	20	22	21	22
H4	22	21	20	21	19
	23	21	20	23	21
	22	19	21	20	20
	21	20	21	22	21
H14	24	20	20	20	19
	25	23	19	24	20
	22	21	20	20	23
	22	22	22	23	23

Lampiran 10 Sertifikat Kelaikan Etik

	<p style="text-align: center;">FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN</p> <p style="text-align: center;">Gedung Etik UMMI N 2 Jalan Gajayana No. 60, Dinoyo, Kec. Lowokwaru, Kota Malang E-mail: kepk.fkik@uin-malang.ac.id Website : http://www.kepk.fkik.uin-malang.ac.id</p>
	<p style="text-align: center;">KETERANGAN KELAHAN ETIK (ETHICAL CLEARANCE) No. 027/EC/KEPK-FKIK/2018</p>
<p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU-ILMU KESEHATAN UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG TELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN :</p>	
Judul	Identifikasi Senyawa Aktif dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 96% Bekatul (<i>Rice Bran</i>) dan Pengaruh Terapinya Terhadap Kadar Glukosa Darah dan MDA (<i>Malondialdehyde</i>) Hati, Gambaran Histologi Pankreas, dan Aktivitas SOD (<i>Superoksida Dismutase</i>) Ginjal Mencit (<i>Mus Musculus</i>)
Sub judul	Identifikasi Senyawa Aktif dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 96% Bekatul (<i>Rice Bran</i>) dan Pengaruh Terapinya Terhadap Kadar Glukosa Darah dan MDA (<i>Malondialdehyde</i>) Hati, Gambaran Histologi Pankreas, dan Aktivitas SOD (<i>Superoksida Dismutase</i>) Ginjal Mencit (<i>Mus Musculus</i>)
Peneliti	- Khalimatul Ulyah - Mar'atus Sholeha - Nafisatul Fuadah
Unit / Lembaga	Program Studi Kimia Fakultas SAINS dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
Tempat Penelitian	Laboratorium Hewan Coba Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
<p>DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN TERSEBUT TELAH MEMENUHI SYARAT ATAU LAIK ETIK.</p>	
Mengetahui, Dekan FKIK-UIN Maulana Malik Ibrahim Malang	Malang, 22 OCT 2018 Ketua 
 Prof. Dr. Ir. Bambang R. Djianto, SpB. SpBP-RE(K) NIP. 195707201101001001 Keterangan:	dr. Avin Ahur F, MBIomed NIP. 19800203 200912 2 002
<p>- Keterangan Etik ini berlaku 1 (satu) tahun sejak tanggal dikeluarkan. - Pada akhir penelitian, laporan Pelaksanaan Penelitian harus diserahkan kepada KEPK-FKIK dalam bentuk <i>soft copy</i>. - Apabila ada perubahan protokol dan/atau Perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).</p>	

Lampiran 11 Dokumentasi

L.11.1 Preparasi dan Ekstraksi Maserasi



Sampel bekatul



Pengukuran kadar air



Pelarut etanol 96%



Sebelum maserasi



Setelah maserasi 24 jam



Ketika disaring



Setelah disaring



Sampel dimaserasi



Ekstrak bekatul

L.11.2 Uji Fitokimia



Ekstrak konsentrasi 1000 ppm



Uji alkaloid (Mayer)



Uji alkaloid (Dragendorff)



Uji flavonoid



Uji saponin



Uji tanin



Uji steroid

L.11.3 Uji Antidiabetes pada Mencit



Pengondisian mencit



Pemberian makan dan minum



Larutan aloksan



Sprit untuk injeksi



Injeksi aloksan pada mencit



Glukometer



Pengukuran KGD



Larutan NaCl 0,5%



Terapi intraperitoneal

L.11.4 Analisis Aktivitas SOD



Dislokasi leher mencit



Sebelum dibedah



Setelah dibedah



Ginjal yang telah digerus



Alat sentrifugasi