

**PENGARUH NANOPARTIKEL PEGAGAN (*Centella asiatica* L)
TERSALUT KITOSAN TERHADAP KONFLUENITAS, VIABILITAS,
DAN KADAR INSULIN KULTUR SEL PANKREAS TIKUS (*Rattus
norvegicus*) YANG DIINDUKSI STREPTOZOTOCIN**

SKRIPSI

Oleh:

Muhammad Andi Fachrudin

NIM: 16620074



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**PENGARUH NANOPARTIKEL PEGAGAN (*Centella asiatica* L)
TERSALUT KITOSAN TERHADAP KONFLUENITAS, VIABILITAS, DAN
KADAR INSULIN KULTUR SEL PANKREAS TIKUS (*Rattus norvegicus*)
YANG DIINDUKSI STREPTOZOTOCIN**

SKRIPSI

**Ditujukan 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)**

**Oleh:
Muhammad Andi Fachrudin
NIM. 16620074**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

HALAMAN PERSETUJUAN

PENGARUH NANOPARTIKEL PEGAGAN (*Centella asiatica* L) TERSALUT KITOSAN TERHADAP KONFLUENITAS, VIABILITAS, DAN KADAR INSULIN KULTUR SEL PANKREAS TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI STREPTOZOTOCIN

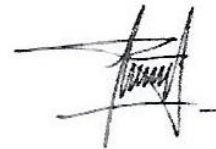
SKRIPSI

Oleh:
MUHAMMAD ANDI FACHRUDIN
NIM: 16620074

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal 9 Desember 2020

Pembimbing I,

Pembimbing II,



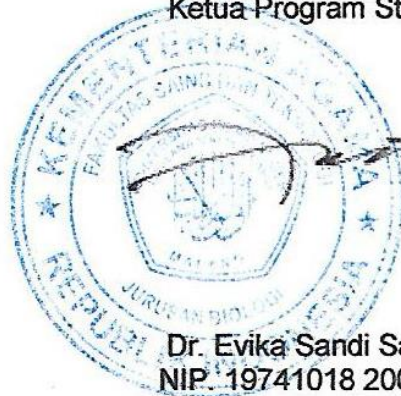
Prof. Dr. drh. Bayyinatul M., M.Si

Mujahidin Ahmad, M.Sc

NIP. 19710919 200003 2 001

NIP. 19860512 201903 1 002

Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi



Dr. Evika Sandi Savitri, M. P
NIP. 19741018 200312 2 002

HALAMAN PENGESAHAN

PENGARUH NANOPARTIKEL PEGAGAN (*Centella asiatica* L) TERSALUT KITOSAN TERHADAP KONFLUENITAS, VIABILITAS, DAN KADAR INSULIN KULTUR SEL PANKREAS TIKUS YANG DIINDUKSI STREPTOZOTOCIN

SKRIPSI

Oleh:
MUHAMMAD ANDI FACHRUDIN
NIM: 16620074

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan
Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan untuk
Memperoleh Gelar Sarjana (S.Si)
Tanggal, 18 Desember 2020

Susunan Dewan Penguji

Penguji Utama : Dr. Kiptiyah, M.Si
NIP. 19731005200212 2 003

Tanda Tangan



Ketua Penguji : Kholifah Holli, M.Si
NIP. 19751106200912 2 002



Sekretaris Penguji : Prof. Dr. drh. Bayyinatul M., M.Si
NIP. 19710919 200003 2 001



Anggota Penguji : Mujahidin Ahmad, M. Sc
NIP. 19860512 201903 1 002



Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi



Dr. Evika Sandi Savitri, M. P
NIP. 19741018 200312 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Andi Fachrudin
NIM : 16620074
Jurusan : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Pengaruh Nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica*. L) Tersalut Kitosan Terhadap Konfluenitas, Viabilitas, dan Kadar Insulin Kultur Sel Pankreas Tikus yang Diinduksi Streptozotocin

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan ataupun pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan saya 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, 7 Oktober 2020
Yang membuat pernyataan



HALAMAN PERSEMBAHAN

Assalamu'alaikum Wr. Wb,

Bismillahi rabbil 'alamin walhamdulillah rabbil 'alamin, Tidak ada kata yang dapat menggambarkan kegembiraan saya kecuali dengan rasa syukur yang saya ucapkan kehadiran Allah Subhanahu wa ta'ala atas segala rahmat dan hidayahnya sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan S1 biologi di Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Sholawat serta salam senantiasa juga saya curahkan juga kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga, sahabat, dan seluruh umatnya. Saya sampaikan rasa terimakasih kepada Ibu Prof Bayyinatul Muchtaromah yang telah berkenan membimbing saya serta mengizinkan saya ikut serta masuk dalam tim penelitian Nanopartikel. Saya ucap terimakasih juga kepada Bapak Mujahidin Ahmad, karena beliau telah memberi banyak petunjuk dan jalan kepada saya agar dapat menimba ilmu dengan seluas-luasnya, terutama mengenai ilmu kultur jaringan hewan sampai di negeri tetangga (Thailand). Saya tidak lupa menyampaikan terimakasih kepada bu Tyas Nyonita dan doa kepada Alm Bapak Romaidi, beliau berdua sudah berkenan menjadi dosen wali saya selama perkuliahan kurang lebih 9 semester dan telah banyak membantu dan memberi saran kepada saya dalam melaksanakan studi di Prodi Biologi UIN Malang. Semoga amal perbuatan beliau menjadi pemberat timbangan kebaikan di akhirat nanti. Persembahan spesial saya haturkan kepada keluarga besar saya, terutama kepada kedua orang tua saya yang telah menjadi relung hati saya sampai akhir hayat dan akhirat nanti.

Kepada seluruh civitas akademika, saya sampaikan terimakasih sebanyak-banyaknya. Berkat keterlibatan mereka perkuliahan dan penyelesaian studi saya menjadi mengasikkan, terutama dengan hadirnya kawan-kawan saya di perkuliahan, MSAA, PKPBA, KKM, PKL, Tim Nanopartikel, dan Penghuni Mushola Al-Ekologi.. Saya tidak lupa menghaturkan terimakasih kepada seluruh penghuni lab kultur jaringan hewan, terutama kepada mbk Lil Hanifah, M.Si, Mas Habibi dan MbK Nuri karena beliau telah menjadi wadah saya untuk bernaung selama melakukan penelitian tugas akhir saya.,

WASSALAMUALAIKUM WR. WB.

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Andi Fachrudin

NIM : 16620074

Jurusan : Biologi

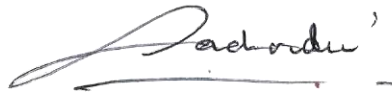
Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Pengaruh Nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica*. L) Tersalut Kitosan Terhadap Konfluenitas, Viabilitas, dan Kadar Insulin Kultur Sel Pankreas Tikus yang Diinduksi Streptozotocin

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan ataupun pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan saya 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, 7 Oktober 2020

Yang membuat pernyataan



Muhammad Andi Fachrudin

MOTTO

KUATLAH SEPerti BAPAK!!!, SABARLAH SEPerti IBU!!!

**PENGARUH NANOPARTIKEL PEGAGAN (*Centella asiatica* L)
TERSALUT KITOSAN TERHADAP KONFLUENITAS, VIABILITAS, DAN
KADAR INSULIN KULTUR SEL PANKREAS TIKUS (*Rattus norvegicus*)
YANG DIINDUKSI STREPTOZOTOCIN**

**M. Andi Fachrudin, Bayyinatul Muchtaromah, dan Mujahidin Ahmad
ABSTRAK**

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh nanopartikel pegagan tersalut kitosan terhadap konfluenitas, viabilitas, dan kadar insulin kultur sel primer pankreas tikus yang diinduksi streptozotocin (STZ). Sintesis nanopartikel pada penelitian ini menggunakan metode gelasi ionik dengan memanfaatkan sTTP dan kitosan sebagai polimer anion dan polimer hidrofilik pembentuk serta penyalut nanopartikel. Uji pengaruh nanopartikel terhadap kultur sel dilakukan selama 7 hari menggunakan DMEM (*Dulbecco modified eagle medium*), diinkubasi pada suhu 37°C dengan konsentrasi CO² 5%. Penelitian ini menggunakan beberapa konsentrasi yaitu 0 µM, 20 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM, dan 100 µM, sedangkan dosis STZ yang digunakan untuk induksi adalah sebesar 5mM. Hasil analisis varians (5%) satu jalur dilanjut DMRT (5%) menunjukkan bahwa konsentrasi nanopartikel pegagan sebesar 60 µM memiliki pengaruh yang paling tinggi terhadap peningkatan konfluenitas dan viabilitas kultur sel. Hasil pengamatan menggunakan flowsitometer secara diskriptif menunjukkan konsentrasi 40 µM menghasilkan kadar insulin terbaik.

Kata Kunci: Nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica*. L), Streptozotocin, Viabilitas sel, Konfluenitas sel, Kadar Insulin, dan Kultur sel Pankreas Tikus.

**THE EFFECT OF PEGAGAN NANOPARTICLES (*Centella asiatica* L)
COATED CHITOSAN TO CONFLUENCY, VIABILITY, AND INSULIN
LEVELS OF RAT PANCREAS CELL CULTURE (*Rattus norvegicus*)
INDUCED STREPTOZOTOCIN**

M. Andi Fachrudin, Bayyinatul Muchtaromah, dan Mujahidin Ahmad

ABSTRACT

This study was conducted to determine the effect of chitosan-coated gotu kola (*Centella asiatica*. L) nanoparticles on the confluence, viability, and insulin levels of streptozotocin-induced rat pancreatic primary cell cultures (STZ). The synthesis of nanoparticles in this study used the ionic gelation method by utilizing sTTP and chitosan as anion polymers and a hydrophilic polymer to form and coat nanoparticles. The test for the effect of nanoparticles on cell culture was carried out for 7 days using DMEM (*Dulbecco modified eagle medium*), incubated at 37°C with a concentration of 5% CO₂. This study used several concentrations were as follows: 0 µM, 20 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM, and 100 µM, while the STZ dose used for induction was 5mM. The results of one-way analysis of variance (5%) followed by DMRT (5%) showed that the concentration of gotu kola nanoparticles of 60 µM had the highest effect on the increase in confluence and viability of cell culture. The results of observations using a flowcytometry descriptively showed that the concentration of 40 µM produced the best insulin levels.

Keywords: Gotu kola nanoparticles (*Centella asiatica*. L), Streptozotocin, cell viability, cell confluence, insulin levels, and rat pancreatic cell culture.

تأثير الجسيمات النانوية غوتو كولا (*Centella asiatica. L*) كيتوزان مغطى للتضارب ، والضعف ، وحالات الأنسولين في زراعة خلايا البنكرياس الفأرية (*Rattus norvegicus*) التي يسببها الستربتوزوتوسين

أندي فخر الدين ، بباينات المخترومة ، ومجاهد أحمد

ملخص البحث

تم إجراء هذا البحث لتحديد تأثير جزيئات غوتو كولا (*Centella asiatica. L*) النانوية المغلفة بالكيتوزان على التقاء ، والبقاء ، ومستويات الأنسولين لمزارع خلايا البنكرياس الفئران (*Rattus norvegicus*) التي يسببها الستربتوزوتوسين . استخدم تخليق الجسيمات النانوية في هذه الدراسة طريقة الهلام الأيوني باستخدام sTTP والشيتوزان كبوليمرات أنيون وبوليمر محبة للماء لتشكيل وتغليف الجسيمات النانوية . تم إجراء اختبار تأثير الجسيمات النانوية على زراعة الخلايا لمدة 7 أيام باستخدام DMEM ، محتضنة عند 37 درجة مئوية بتركيز 5 ٪ من ثاني أكسيد الكربون . استخدمت هذه الدراسة عدة تراكيز وهي 0 μM ، 20 μM ، 40 μM ، 60 μM ، 80 μM ، 100 μM ، بينما كانت جرعة STZ المستخدمة للتحريض 5 mM . أظهرت نتائج تحليل التباين أحادي الاتجاه متبوعًا بـ 5% DMRT أن تركيز جزيئات غوتو كولا النانوية 60 μM كان له أكبر تأثير على زيادة التقاء واستمرارية زراعة الخلايا . أظهرت نتائج الملاحظات باستخدام مقياس التدفق الوصفي أن تركيز 40 μM أنتج أفضل مستويات الأنسولين.

الكلمات المفتاحية :النانوية غوتو كولا (*Centella asiatica. L*) ، الستربتوزوتوسين ، قابلية بقاء الخلية ، التقاء الخلايا ، مستويات الأنسولين ، ومزرعة خلايا البنكرياس الفأرية (*Rattus norvegicus*).

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb

Bismillahi rabbil 'alamin walhamdulillah rabbil 'alamin, Ucap syukur kehadiran Allah Subhanahu wa ta'ala atas segala limpahan nikmat, rahmat dan curahan hidayahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikannya di Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi ,Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, sekaligus mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica. L*) Tersalut Kitosan Terhadap Viabilitas, Konfluenitas, dan Kadar Insulin Sel Pankreas Tikus yang Diinduksi Streptozotocin Secara *In Vitro*”** dengan baik. Sholawat serta salam senantiasa tercurahkan juga kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga, sahabat, dan seluruh umatnya, karena beliau telah menjadi suri tauladan dan pembimbing yang baik bagi manusia hingga zaman dengan perkembangan ilmu pengetahuan saat ini. Dengan terselesainya skripsi ini maka penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

- 1) Prof. Dr. Abdul Haris, M. Ag, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- 2) Dr. Sri Harini, M. Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- 3) Dr. Evika Sandi Savitri, M. P selaku Ketua Program Studi Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- 4) Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si dan Mujahidin Ahmad, M.Sc selaku pembimbing skripsi yang telah berkenan meluangkan waktu untuk membimbing dan mengarahkan penulis hingga terselesainya skripsi ini.
- 5) Dr. Kiptiyah, M. Si dan Kholifah Holil, M. Si selaku penguji skripsi yang telah berkenan meluangkan waktu untuk mengarahkan dan memberi saran kepada penulis hingga terselesainya skripsi ini.

- 6) Lil Hanifah, M.Si selaku laboran Laboratorium Kultur Jaringan Hewan yang senantiasa mendampingi penulis dalam pelaksanaan penelitian.
- 7) Segenap civitas akademika Program Studi Biologi, khususnya kepada seluruh dosen, para ustad dan parah ustadzah yang telah berkenan menyampaikan ilmu, pengalaman, serta wawasannya sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
- 8) Kedua orang tua penulis, Kholil dan Sumarlik yang senantiasa memberikan do'a dan restunya, serta dukungan baik secara finansial maupun motivasi kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
- 9) kawan-kawan dan seluruh pihak lainnya yang telah memberikan dukungannya baik secara pikiran maupun tenaganya selama masa perkuliahan hingga proses penyelesaian skripsi ini.

Semoga dengan terselesainya penelitian yang ditujukan untuk skripsi ini dapat memberikan manfaat, kemaslahatan, dan menjadi wawasan bagi kita semua. Apabila terdapat kesalahan dalam proses studi maupun penyelesaian skripsi ini maka penulis memohon maaf yang sebesar-besarnya.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

DAFTAR ISI

DAFTAR JUDUL	i
HALAMAN PENGAJUAN.....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI.....	vii
MOTTO	viii
ABSTRAK.....	ix
ABSTRACT.....	x
مختصرة نبذة.....	Error! Bookmark not defined.
KATA PENGANTAR	xii
DAFTAR ISI.....	xvi
Daftar Tabel	xvii
Daftar Gambar.....	xviii
Daftar lampiran	xix
 BAB I PENDAHULUAN.....	 1
1.1 LATAR BELAKANG	1
1.2 RUMUSAN MASALAH	8
1.3 TUJUAN.....	8
1.4 HIPOTESIS	8
1.5 MANFAAT	9
1.6 BATASAN MASALAH	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1 Nanopartikel.....	10
2.1.1 Deskripsi Nanopartikel	10
2.1.2 Metode Pembuatan Nanopartikel	11
2.2 Pegagan.....	14
2.2.1 Morfologi Pegagan	14
2.2.2 Klasifikasi Pegagan	15
2.2.3 Senyawa Bioaktif Pegagan	15
2.2.4 Tambahan dan pengobatan dalam Islam	17

2.3	Pankreas Tikus.....	18
2.3.1	Anatomi dan Fisiologi Pankreas Tikus.....	18
2.3.2	Sel Islet Pankreas Tikus.....	20
2.4	Kultur Sel	21
2.5	Kultur Sel Pankrease.....	21
2.6	Induksi Streptozotocin.....	23
2.7	Poliferasi Sel Pankreas	23
2.7.1	Konfluenitas Sel.....	24
2.7.2	Viabilitas Sel.....	25
2.7.3	Faktor-faktor yang mempengaruhi poliferasi	26
2.8	Pengaruh Nanopartikel Pegagan terhadap kultur sel pankreas	28
BAB III METODE PENELITIAN		30
3.1	Rancangan Penelitian.....	30
3.2	Variabel Penelitian	30
3.3	Waktu dan Tempat	31
3.4	Alat dan Bahan	31
3.4.1	Alat	31
3.4.2	Bahan	31
3.5	Prosedur Penelitian.....	32
3.5.1	Pembuatan Ekstrak Pegagan (<i>Centella Asiatica</i> L).....	32
3.5.2	Pembuatan Nanopartikel Pegagan Tersalut Kitosan.....	32
3.5.3	Sterilisasi Alat dan Bahan.....	33
3.5.4	Sterilisasi Ruang	34
3.5.5	Pembuatan Media Stock	34
3.5.6	Pembuatan Media DMEM 10%.....	34
3.5.7	Pelaksanaan Kultur Sel Pankreas.....	35
3.5.8	Induksi Streptozotocin	36
3.5.9	Pemberian Nanopartikel Pegagan (<i>Centella asiatica</i>).....	36
3.5.10	Pengamatan Konfluenitas Sel.....	36
3.5.11	Perhitungan Viabilitas Sel	37
3.5.12	Uji Kadar Insulin	37
3.6	Analisa Data.....	38
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		40

4.1 Pengaruh Nanopartikel Pegagan (<i>Centella asiatica</i> . L) Tersalut Kitosan Terhadap Konfluenitas Sel Pankreas Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) secara <i>in vitro</i>	40
4.2 Pengaruh Nanopartikel Pegagan (<i>Centella asiatica</i> . L) Tersalut Kitosan Terhadap Viabilitas Sel Pankreas Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) secara <i>in vitro</i>	46
4.3 Pengaruh Nanopartikel Pegagan (<i>Centella asiatica</i> . L) Tersalut Kitosan Terhadap Kadar Insulin Sel Pankreas Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) secara <i>in vitro</i>	51
BAB V PENUTUP	56
5.1 KESIMPULAN	56
5.2 SARAN.....	56
DAFTAR PUSTAKA	57

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan Senyawa Bioaktif Pegagan.....	16
Tabel 4.1.1 Ringkasan <i>one way</i> Anova mengenai pengaruh nanopartikel pegagan (<i>Centella asiatica.L</i>) tersalut kitosan terhadap konfluenitas sel	42
Tabel 4.1.2 Ringkasan hasil uji lanjut Duncan dengan sig. 5% (0.05) mengenai pengaruh nanopartikel pegagan (<i>Centella asiatica.L</i>) tersalut kitosan terhadap konfluenitas sel	43
Tabel 4.2.1 Ringkasan <i>one way</i> Anova mengenai pengaruh nanopartikel pegagan (<i>Centella asiatica.L</i>) tersalut kitosan terhadap viabilitas sel	47
Tabel 4.2.2 Ringkasan hasil uji lanjut Duncan dengan sig. 5% (0.05) mengenai pengaruh nanopartikel pegagan (<i>Centella asiatica.L</i>) tersalut kitosan terhadap viabilitas sel	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi umum Pegagan; (1) Tangkai daun, (2) Bunga, (3) Ujung daun, (4) Helai daun	15
Gambar 2.2 (A) Foto, (B) gambaran morfologi pankreas Tikus	19
Gambar 2.3 Kurva pertumbuhan sel kultur (Creswell, 2010)	24
Gambar 4.1 Pengaruh nanopartikel Pegagan (<i>Centella asiatica</i> .L) tersalut kitosan terhadap konfluenitas sel pankreas tikus yang diinduksi streptozotocin	40
Gambar 4.2 Pengaruh nanopartikel Pegagan (<i>Centella asiatica</i> .L) tersalut kitosan terhadap viabilitas sel pankreas tikus yang diinduksi streptozotocin	46
Gambar 4.3.1 Profil Kadar Insulin (Id sampel: 0 mM)	51
Gambar 4.3.2 Grafik % gated FCM (<i>flowcytometry</i>)	52

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Perhitungan statistika data konfluenitas sel	64
Lampiran 2 Perhitungan statistika data viabilitas sel	67
Lampiran 3 Langkah isolasi sel pankreas tikus	70
Lampiran 4 Dokumentasi Penelitian	71
Lampiran 5 Lembar Konsultasi Skripsi Formal	72
Lampiran 6 Lembar konsultasi Skripsi Agama	73s

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Diabetes militus (DM) merupakan kelainan ketidakseimbangan tubuh dalam memproduksi insulin sehingga mengakibatkan matabolisme karbohidrat terganggu (Smeltzer and Bare, 2015). Secara klinis diabetes militus dibagi menjadi dua, yaitu DM tipe 1 (*insulin dependent diabetes militus*) dan DM tipe 2 (*non-insulin dependet diabetes militus*). DM tipe 1 meupakan kelainan metabolisme tubuh dalam memproduksi insulin yang disebabkan oleh destruksi sintesis insulin secara akut. Kelainan DM tipe 1 pada umumnya ditandai dengan ketergantungan penggunaan injeksi insulin eksternal. DM tipe 2 merupakan kelainan metabolisme tubuh dalam memproduksi insulin yang disebabkan oleh destruksi sintesis insulin secara kronis. Kelainan DM tipe 2 pada umumnya muncul akibat pola konsumsi karbohidrat dan lemak yang tinggi, sehingga muncul penyakit seperti hiperglikemia yang memicu kelainan ini (Sun *et al.*, 2020)(Smeltzer and Bare, 2015).

Kelainan metabolisme tubuh dalam memproduksi hormon insulin secara fisiologis disebabkan oleh 3 faktor utama. Faktor-faktor tersebut meliputi; 1) Densitas atau resistensi insulin, 2) sel beta pankreas kelelahan dalam sekresi insulin (*Exhaustion*), dan 3) *glucose toxicity* (Standl, 2007). Salah satu faktor ketidakseimbangan produksi insulin yang sering ditemukan kasusnya di masyarakat adalah disebabkan oleh kelelahan sel beta pankreas dalam sekresi insulin (*Exhaustion*) (Merentek, 2006).

Kondisi kelelahan sekresi insulin seringkali ditemukan pada penderita yang memiliki kelebihan berat badan, atau disebut dengan obesitas. Penderita obesitas umumnya memiliki pola konsumsi karbohidrat dan lemak yang tinggi, sehingga kebiasaan tersebut mengakibatkan sel beta pankreas memproduksi insulin lebih tinggi atau berlebih (*hiperinsulinemia*). Pada kondisi maksimum, produksi insulin tidak dapat mengimbangi konsentrasi kadar gula dalam darah. Akibatnya sekresi insulin yang dihasilkan oleh sel beta pankreas tidak dapat memberikan efek

biologis seperti pemecahan dan penyimpanan glukosa. Kondisi tersebut dikenal dengan istilah resistensi insulin (Merentek, 2006).

Resistensi insulin yang berlanjut dapat menyebabkan penumpukan kadar glukosa dalam darah meningkat dan dapat menimbulkan efek stress oksidatif pada sel beta pankreas (Merentek, 2006). Aktivitas stress oksidatif yang terjadi secara terus menerus akan menyebabkan produksi superoksida meningkat. Akibatnya, superoksida yang tinggi dalam sel beta pankreas dapat mengaktivasi ekspresi dari gen *uncoupling protein-2* (UPC-2) pada mitokondria. Gen UPC-2 yang terekspresi tersebutlah yang akan mempengaruhi kerja mitokondria dalam menghasilkan ATP/ADP (Merentek, 2006). Penurunan ATP/ADP pada mitokondria tersebut secara berkelanjutan akan memicu pengaruh yang kompleks terhadap penurunan proliferasi sel serta penurunan kadar insulin pada sel pankreas, khususnya pada sel beta pankreas (Merentek, 2006).

Penelitian mengenai Model diabetes militus dalam skala laboratorium secara umum sudah banyak dilakukan. Salah satu cara yang dilakukan untuk membentuk model penyakit diabetes militus adalah dengan menggunakan streptozotocin (STZ). STZ sendiri merupakan salah satu jenis glukosa [(glucopyranose, 2-deoxy-2-(3-methy-enitrosourido-D))] yang diekstrak dari *Streptomyces acromogenes* (Junod *et al.*, 1967) (Saini *et al.*, 1996). Lenzen *et al.* (2008) pada penelitiannya melaporkan bahwa penggunaan STZ secara *in vitro* dapat memberikan dampak yang nyata terhadap kerusakan kultur sel. Kerusakan tersebut tampak pada aktivitas apoptosis dan nekrosis yang meningkat ketika kultur sel diinduksi dengan STZ.

Nahdi, John, & Raza (2017) pada penelitiannya juga melaporkan berdasarkan pengujian pengujian MTT assay OD 550 nm diketahui bahwa STZ dengan konsentrasi 5mM yang diinduksikan pada kultur sel pankreas Rin-5F dapat mempengaruhi penurunan viabilitas hingga 60%. Secara kompleks peningkatan apoptosis dan nekrosis pada kultur sel tersebut dapat memicu turunya proliferasi sel yang berujung pada penurunan produksi insulin pada sel pankreas Rin-5F. Maka dengan adanya penurunan produksi insulin pada sel pankreas dapat

mengakibatkan homeostasis metabolisme karbohidrat terganggu, sebagaimana gejala yang timbul pada penderita diabetes militus.

Ditinjau berdasarkan dampak yang diakibatkan oleh penyakit diabetes militus tersebut, maka perlu dilakukan pencarian obat yang sesuai dengan penyakit tersebut. Pencarian obat yang sesuai untuk diabetes militus secara umum telah banyak dilakukan dan telah banyak ditemukan obatnya. Namun diantara berbagai obat yang telah ditemukan tersebut masih banyak yang belum menggunakan bahan herbal sebagai bahan obatnya. Oleh karena itu perlu dilakukan pencarian kandidat obat baru untuk penyakit diabetes militus.

Sumber daya alam (SDA) Indonesia diketahui memiliki berbagai macam tanaman yang berpotensi dijadikan sebagai kandidat obat herbal diabetes militus, salah satunya adalah Pegagan (*Centella asiatica* L). Berdasarkan pengujian HPLC (*High performance liquid chromatography*) pada Pegagan (*Centella asiatica* L) yang pernah dilakukan Hashim *et al* (2011) diketahui bahwa pegagan memiliki kandungan berupa 4 macam senyawa titerpen, senyawa-senyawa tersebut meliputi; madakassosida, asiatikosida, asam madakassik, dan asam asiatik. Hashim *et al* (2011) pada penelitiannya juga mengatakan bahwa senyawa titerpen pegagan (*Centella asiatica* L) yang memiliki potensi tinggi untuk dijadikan sebagai obat diabetes militus adalah asam asiatika.

Diketahui berdasarkan laporan penelitian terbaru dari Fizur *et al* (2018) bahwa Pegagan (*Centella asiatica* L) memiliki kemampuan sebagai promotor reseptor PPAR γ (*Peroxisome Poliferator Reseptor-Gamma*). Reseptor PPAR γ sendiri memiliki peran sebagai regulator fungsi mitokondria, meliputi metabolisme energi, poliferasi dan diferensiasi selular (Bermudez *et al.*, 2010; Setyawati, 2014). Sehingga dengan kemampuan tersebut, pegagan dapat dikatakan memiliki potensi tinggi untuk mengembalikan regenerasi serta fungsi sel pankreas.

Fizur *et al* (2018) juga melaporkan bahwa Pegagan (*Centella asiatica* L) memiliki kemampuan untuk meningkatkan poliferasi sel melalui ekspresi dan aktivasi protein GLUT4 (*glucose-transporter 4*). Protein GLUT4 sendiri

merupakan protein yang berperan penting dalam mengatur transportasi glukosa ekstraseluler menuju membran-membran sel (Alam & Gan, 2016). Glukosa yang dibawa oleh protein GLUT4 tersebut selanjutnya diproses untuk kepentingan metabolisme sel (Kurniasari *et al*, 2015). Semakin banyak GLUT4 yang terekspresi dan teraktivasi, maka metabolisme sel yang berjalan akan semakin optimal. Metabolisme sel yang optimal pada akhirnya akan memicu proliferasi dan pembelahan sel lebih cepat.

Proliferasi dan regenerasi fungsi sel pankreas yang meningkat secara fisiologis juga akan berdampak terhadap peningkatan sekresi insulin pada sel beta pankreas. Efek stres oksidatif yang ditimbulkan oleh diabetes militus juga akan berangsur berkurang seiring dengan kembalinya fungsi mitokondria dalam mengatur metabolisme dalam sel. Sehingga dengan semakin meningkatnya sekresi insulin pada sel beta pankreas, maka fungsi biologis insulin dalam mengkompensasi kadar glukosa akan kembali menjadi normal juga (Wang & Wang, 2017).

Berdasarkan laporan yang diuraikan oleh Fizur *et al* (2018) tersebut maka dapat diketahui bahwa pegagan memiliki potensi yang tinggi untuk dijadikan kandidat obat diabetes militus. Kemampuan pegagan dalam meningkatkan fungsi mitokondria dan penyerapan glukosa ekstraseluler juga diketahui sangat dibutuhkan untuk penyembuhan penyakit diabetes militus. Namun kemampuan yang dimiliki pegagan tersebut belum cukup optimal untuk dijadikan kandidat obat diabetes militus. Hal tersebut dikarenakan oleh penetrasi beberapa senyawa titerpenoid Pegagan (*Centella asiatica*) melalui glikoprotein (PGP⁺) yang kurang optimal. Sehingga dengan kurang optimalnya penetrasi beberapa senyawa titerpenoid pegagan tersebut maka dapat mengakibatkan pemberian senyawa yang dilakukan menjadi kurang efektif (Daina dan Vincent, 2016).

Sun *et al* (2020) melaporkan pada penelitiannya bahwasanya senyawa titerpenoid saponin asam asiatika dan turunannya memiliki bioavailabilitas (BA) yang rendah, sehingga perlu dilakukan modifikasi senyawa untuk mengoptimalkan bioavailabilitasnya (BA). Memodifikasi senyawa menjadi bentuk nanopartikel merupakan salah satu cara yang dapat dilakukan untuk

mengoptimalkan bioavailabilitas (BA) suatu obat. Sebagaimana yang diuraikan oleh Rao & Geckeler (2011) bahwasanya memodifikasi suatu senyawa dalam bentuk nanopartikel dapat meningkatkan penyerapan senyawa kedalam ruang-ruang antar sel. Hal tersebut diakibatkan oleh terbentuknya karakter koloid ketika senyawa dimodifikasi menjadi bentuk nanopartikel, sehingga proses difusi maupun opsinifikasi nanopartikel lebih tinggi untuk menembus dinding sel.

Selain dengan memodifikasi senyawa menjadi bentuk nanopartikel, cara lainya yang dapat digunakan untuk meningkatkan bioavailabilitas (BA) pegagan adalah dengan menggunakan nanopartikel kitosan. Nanopartikel kitosan sendiri dikenal sebagai bahan penghantar obat yang efektif untuk digunakan. Menurut Tiyaboonchai (2003), Prashanth & Tharanathan (2007), Kumar *et al* (2012), Shanmukha *et al* (2012), Jayakumar (2010), dan Zhu & Zhang (2014), nanopartikel kitosan memiliki biokompatibilitas dan biodegradabilitas yang baik serta tidak memberikan efek toksik bagi sel, sehingga cocok digunakan untuk penghantaran suatu senyawa atau obat tertentu. Pada penelitian lainya disebutkan juga bahwasanya penggunaan nanopartikel kitosan secara *in-vitro* mampu meningkatkan permeabilitas membran, sehingga senyawa atau obat yang dibawa dapat dengan mudah diserap oleh sel . (Dodane *et al*, 1999).

Pemilihan Pegagan (*Centella asiatica* L) sebagai bahan kandidat untuk obat diabetes meilitus pada penelitian ini secara umum dilandasi oleh kajian islam yang menjelaskan tentang pengobatan. Salah satu kajian islam tersebut bersumber dari firman Allah SWT dalam Al-Qur'an surat As-Syu'ara ayat 7-8, bahwasanya;

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً وَمَا كَانَ أَكْثَرُهُمْ مُؤْمِنِينَ ﴿٨﴾ (الشعراء/26: 7-8)

“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan (tumbuh-tumbuhan) yang baik?. Sungguh, pada yang demikian itu terdapat tanda (kebesaran Allah), tetapi kebanyakan mereka tidak beriman”. (Asy-Syu'ara/26:7-8)

Menurut Al-Qurthubi (2009) Q.S Asyu'ara ayat 7-8 tersebut memiliki makna bahwa Allah SWT telah menciptakan berbagai macam tumbuhan dengan kebaikan atau manfaatnya masing-masing. Kebaikan dan manfaat tersebutlah yang perlu diperhatikan oleh manusia agar mendapat hikmah dari tumbuhan-tumbuhan tersebut. Salah satu tumbuhan yang perlu diperhatikan manusia adalah pegagan.

Pegagan diketahui memiliki potensi untuk dijadikan kandidat obat diabetes militus. Berdasarkan beberapa penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya mengenai kemampuan senyawa bioaktif titerpen pada pegagan, diketahui bahwa pegagan memiliki kesesuaian untuk dijadikan alternatif obat diabetes militus. Konsep kesesuaian obat terhadap penyakit dalam kajian sains selaras dengan sabda Nabi Muhammad SAW dalam H.R Muslim nomor 4084. Nabi Muhammad SAW bersabda bahwa:

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

“Setiap penyakit pasti ada obatnya, apabila penyakit tersebut telah bertemu dengan obatnya maka penyakit itu akan sembuh dengan seizin Allah, tuhan yang maha perkasa lagi maha agung” (H.R Muslim nomor 4084).

Menurut Abdurrahman Ali Bassam (2002) bahwa hikmah yang dapat diambil berdasarkan sabda Nabi Muhammad SAW dalam H.R Bukhori nomor 4084 tersebut adalah manusia perlu mengupayakan pencarian obat sebagai perantara kesembuhan dari penyakit yang dideritanya. Sebab setiap keberadaan suatu penyakit telah terdapat penawar atau obatnya juga, seperti halnya penyakit diabetes militus. Hal tersebut sebagaimana juga pernah disabdakan oleh Nabi Muhammad SAW dalam H.R Bukhori nomor 5678. Sabda Nabi Muhammad SAW dalam H.R Bukhori nomor 5678 adalah sebagai berikut:

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

“Tidaklah Allah menurunkan penyakit kecuali dia turunkan untuk penyakit itu obatnya” (H.R Bukhori nomor 5678).

Secara *in-vitro* penelitian tentang pengaruh nanopartikel pegagan (*Centella asiatica* L) tersalut kitosan terhadap konfluenitas, viabilitas, dan kadar insulin kultur sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi streptozotocin belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, Penetapan konsentrasi nanopartikel pegagan (*Centella asiatica* L) tersalut kitosan yang digunakan sebagai kandidat obat pada penelitian ini merujuk pada penelitian serupa. Salah satu penelitian yang serupa adalah tentang pemanfaatan nanopartikel *curcumin* milik Ganugula *et al* (2017). Ganugula *et al* (2017) melaporkan bahwa konsentrasi nanopartikel herbal yang dapat digunakan secara optimal untuk pengobatan diabetes militus pada sel pankreas Rin-m5f (5×10^4 /well) secara *in vitro* adalah sekitar 20 μ M. Maka konsentrasi tersebutlah yang akan dijadikan acuan sebagai dosis obat diabetes militus pada penelitian ini.

Berlandaskan latarbelakang yang telah diuraikan tersebut, maka penelitian perlu dilakukan penelitian mengenai pencarian kandidat obat diabetes militus. Selain itu, perlu dilakukan optimalisasi terhadap manfaat dari tumbuh-tumbuhan yang telah diciptakan oleh Allah SWT, seperti halnya tumbuhan Pegagan (*Centella asiatica* L). Maka, merujuk pada urgensi tersebut penelitian tentang pengaruh nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica* L) tersalut kitosan terhadap konfluenitas, viabilitas, dan kadar insulin pada kultur sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Streptozotocin ini penting dilakukan.

1.2 RUMUSAN MASALAH

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Apakah ada pengaruh nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica* L) tersalut kitosan terhadap konfluenitas kultur sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Streptozotocin?
2. Apakah ada pengaruh nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica* L) tersalut kitosan terhadap viabilitas kultur sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Streptozotocin?
3. Apakah ada pengaruh nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica* L) tersalut kitosan terhadap kadar insulin kultur sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Streptozotocin?

1.3 TUJUAN

Tujuan dilakukanya penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui pengaruh nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica* L) tersalut kitosan terhadap konfluenitas kultur sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Streptozotocin.
2. Untuk mengetahui pengaruh nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica* L) tersalut kitosan terhadap viabilitas kultur sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Streptozotocin.
3. Untuk mengetahui pengaruh nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica* L) tersalut kitosan terhadap kadar insulin kultur sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Streptozotocin.

1.4 HIPOTESIS

Hipotesis dari penelitian ini:

1. Ada pengaruh dari pemberian nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica* L) tersalut kitosan terhadap konfluenitas pada kultur sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Streptozotocin.
2. Ada pengaruh dari pemberian nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica* L) tersalut kitosan terhadap viabilitas pada kultur sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Streptozotocin.

3. Ada pengaruh dari pemberian nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica* L) tersulut kitosan terhadap kadar insulin pada kultur sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Streptozotocin.

1.5 MANFAAT

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Penelitian ini dapat memberikan informasi tentang pengaruh nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica* L) tersulut kitosan terhadap konfluenitas, viabilitas, dan kadar insulin pada kultur sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Streptozotocin.
2. Penelitian ini dapat memberikan informasi tentang manfaat pegagan (*Centella asiatica* L) tersulut kitosan untuk diabetes militus yang dapat digunakan acuan dan pembanding untuk penelitian *in vivo* dan *in silico* kedepanya.

1.6 BATASAN MASALAH

Batasan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Konsentrasi nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica* L) tersulut kitosan yang digunakan pada penelitian ini adalah sebesar 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M, dan 100 μ M dengan pelarut yang digunakan berupa media DMEM 0%.
2. Sel pankreas tikus yang digunakan adalah berupa sel pankreas yang diambil dari fetus tikus berumur 2-3 hari, dikultur pada media DMEM 10%, dan diinkubasi dengan suhu 37°C, CO₂ 5%, selama 7 hari.
3. Pemberian perlakuan nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica* L) tersulut kitosan pada penelitian ini dilakukan 24 jam setelah induksi streptozotocin.
4. Parameter yang digunakan pada penelitian ini adalah konfluenitas, viabilitas, dan kadar insulin sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*).

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Nanopartikel

2.1.1 Deskripsi Nanopartikel

Nanopartikel didefinisikan sebagai partikel padatan atau partikulat yang terdispersi dengan ukuran berkisar 10 – 100 nm (Mohanraj & Chen, 2006). Nanopartikel memiliki sifat fisika dan kimia yang berbeda dari partikel sejenis dalam ukuran yang besar (*bulk*). Ada dua karakter utama yang membedakan antara nanopartikel dengan material sejenis dalam ukuran partikel besar (*bulk*) yaitu: (1) ukurannya yang kecil sekitar (10 – 100 nm) mengakibatkan nanopartikel memiliki nilai perbandingan luas permukaan dan volume yang lebih besar dari partikel *bulk*. Hal tersebut membuat nanopartikel bersifat lebih reaktif. Reaktivitas tersebut disebabkan oleh atom-atom permukaan yang saling bersentuhan langsung dengan atom sejenis ataupun dengan material lain; dan (2) ketika partikel mencapai ukuran (orde) nanometer, maka hukum fisika yang berlaku lebih didominasi oleh hukum-hukum fisika kuantum (Mohanraj & Chen, 2006).

Beberapa kelebihan lain dari nanopartikel adalah; (1) nanopartikel memiliki kemampuan untuk menembus ruang-ruang antar sel. Hal tersebut disebabkan oleh adanya karakter partikel koloid pada nanopartikel, akibatnya proses difusi maupun opsinifikasi nanopartikel lebih tinggi untuk menembus dinding sel, dan (2) nanopartikel memiliki fleksibilitas tinggi untuk dikombinasi dengan berbagai teknologi. Sehingga dengan kemampuan itu, nanopartikel banyak dikembangkan untuk macam-macam target dan keperluan (Rao & Geckeler, 2011)

Nanopartikel memiliki beberapa kekurangan yang sering timbul pada saat pembuatannya, seperti; keseragaman ukuran partikel yang tidak merata, dan sering terjadinya agregasi yang cepat pada proses dispersinya. Sehingga nanopartikel memiliki stabilitas yang sulit dikontrol. Kekurangan tersebut dapat diidentifikasi dan diminimalisir dengan cara melakukan karakterisasi secara menyeluruh pada nanopartikel yang dihasilkan. Karakterisasi nanopartikel dapat

dilakukan dengan menggunakan FTIR (*fourier transform infra red*), SEM (*scanning electron microscopy*), maupun dengan menggunakan XRD (*xray diffractometry*) (Mohanraj & Chen, 2006).

Partikel yang memiliki ukuran mencapai nanometer (nm) atau sangat kecil dalam kajian islam dianalogikan dengan dzarroh (ذَرَّةٌ). Menurut Hamka (1993) kata dzarroh (ذَرَّةٌ) dalam Al Quran banyak ditemukan, salah satunya dapat ditemukan dalam Q.S Saba' ayat 3. Allah SWT berfirman dalam Q.S Saba' ayat 3 bahwa:

لَا يَغْرُبُ عَنْهُ مِثْقَالُ ذَرَّةٍ فِي السَّمُوتِ وَلَا فِي الْأَرْضِ وَلَا أَصْغَرُ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرُ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ ﴿٣٤﴾ (سبأ/34: 3)

“Tidak ada tersembunyi daripada-Nya sebesar zarrahpun yang ada di langit dan yang ada di bumi dan tidak ada (pula) yang lebih kecil dari itu dan yang lebih besar, melainkan tersebut dalam Kitab yang nyata (Lauh Mahfuzh)” (Q.S Saba' ayat 3).

Hamka (1993) dalam kitab tafsir Al Azhar menjelaskan bahwa dzarroh (ذَرَّةٌ) secara terminologi didefinisikan sebagai benda atau partikel yang tidak dapat dibagi lagi. Keberadaan dzarroh (ذَرَّةٌ) secara umum masih belum banyak diketahui oleh manusia. Sebagaimana Nanopartikel yang memiliki ukuran yang sangat kecil dan tidak dapat dibagi lagi. Keberadaan nanopartikel dapat diibaratkan sebagai partikel dzarroh (ذَرَّةٌ), dan keberadaanya belum banyak diketahui dan dimanfaatkan secara optimal bagi kemaslahatan manusia. Maka perlu dilakukan pemanfaatan dan pengoptimalan terhadap nanopartikel tersebut. Salah satu yang perlu dimanfaatkan dan dioptimalkan dari keberadaan partikel nano bagi manusia adalah dalam aspek kesehatan.

2.1.2 Metode Pembuatan Nanopartikel

Pemilihan teknik pembuatan nanopartikel umumnya bergantung berdasarkan karakter fisikokimia dari polimer dan obat yang akan dimasukkan. Secara umum teknik pembuatan nanopartikel berdasarkan karakter fisikokimia dari polimer

dibagi menjadi tiga, yaitu; (1) Dispersi Polimer, (2) Polimerasi Monomer, dan (3) Gelasi Ionik dan Konservat. Langkah-langkah pembuatan nanopartikel berdasarkan teknik-teknik tersebut adalah sebagai berikut;

1. Dispersi Polimer.

Dispersi polimer umumnya merupakan teknik yang digunakan untuk membuat nanopartikel polimer biodegradable dari *poly lactic acid* (PLA), *poly lactide glicolide* (PLG), *poly lactic-co-glycolide* (PLGA), dan *poly cyanoacrylate* (PCA) (Ravi *et al*, 2004) (Li *et al*, 2001) (Kwon *et al*, 2001). Teknik dispersi polimer dapat dilakukan dengan berbagai metode, diantaranya adalah sebagai berikut:

- A. Metode evaporasi pelarut; pada metode ini, polimer dilarutkan dengan menggunakan larutan organik seperti diklorometana, kloroform dan etil asetat. Larutan organik tersebut digunakan juga untuk melarutkan obat hidrofobik. Polimer dan obat hidrofobik yang telah larut dalam larutan organik tersebut dicampur. Campuran dari polimer dan larutan obat kemudian diemulsifikasikan dalam larutan air yang mengandung surfaktan (agen pengemulsi) untuk membentuk emulsi minyak dalam air. Setelah terbentuk emulsi yang stabil, pelarut organik dievaporasi dengan menurunkan tekanan atau dengan pengadukan secara berkala. Ukuran nanopartikel yang dihasilkan dari metode ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, meliputi; tipe dan konsentrasi dari stabilizer, kecepatan homogenizer dan konsentrasi polimer. Sehingga untuk memproduksi ukuran partikel yang kecil, perlu dilakukan homogenasi ataupun ultrasonifikasi secara menyeluruh (Zambaux *et al.*, 1998).
- B. Metode emulsifikasi spontan atau difusi pelarut: metode ini merupakan metode modifikasi dari metode evaporasi pelarut (Niwa *et al*, 1994). Pada metode ini terdapat 2 pelarut yang digunakan untuk melarutkan polimer dan obat hidrofobik. Penggunaan dua pelarut pada metode ini digunakan untuk mempercepat proses difusi pelarut ke dalam campuran emulsi polimer dan obat hidrofobik. Sehingga Difusi spontan

pada metode ini mengakibatkan penurunan ukuran partikel dapat dicapai dengan stabil, dan cepat (Soppimath *et al*, 2001).

2. Polimerasi Monomer

Metode ini umumnya digunakan untuk membuat nanopartikel berbahan dasar monomer *polybutylcyanoacrylate* atau *polyalkylcyanoacrylate*. Metode ini dilakukan untuk membentuk medium polimer yang terbentuk dari proses polimerasi monomer. Medium polimer yang terbentuk kemudian dicampur dengan obat dalam bentuk suspensi. Campuran dalam bentuk suspensi tersebut selanjutnya dimurnikan dengan teknik ultrasentrifugasi untuk menghilangkan sisa surfaktan dan sisa stabilizernya (Soppimath *et al*, 2001).

Nanopartikel yang terbentuk dari metode ini memiliki ukuran sekitar 10-300 nm (Nicolas & Couvreur, 2009 ; Yordanov *et al*, 2015) . Pembentukan ukuran partikel bergantung pada konsentrasi surfaktan maupun stabilizer yang digunakan (Puglisi *et al.*, 1995). Beberapa surfaktan maupun stabilizer yang dapat digunakan adalah sebagai berikut: dextran, PE/F68, PVA, polysorbate 80, poloxamer 188, pluronic F-68, span 20, pluronic F-127, tween-20, tween-80, dan triton X-100 (Puglisi *et al.*, 1995 ; Fanun, 2010) (Rao & Geckeler, 2011).

3. Gelasi Ionik dan Koaservat

Gelasi ionik dan koaservat merupakan metode yang dikembangkan oleh Calvo *et al* (1997). Metode ini dikembangkan untuk memanfaatkan kitosin, alginat, dan natrium alginat sebagai polimer hidrofilik biodegradibel pembentuk nanopartikel. Polimer nanopartikel pada metode ini dibentuk dari 2 suspensi yang berbeda. Suspensi pertama berupa polimer kitosan yang di-*block* dengan co-polymer ethylene oxide atau polypropylene oxide dan polimer kedua berupa polianion natrium triphosphate. Campuran antara 2 suspensi tersebut menimbulkan adanya interaksi elektrostatis antara gugus asam amino kitosan dengan triphosphate. Hasil interaksi elektrostatis tersebut menghasilkan produk berupa koaservat dan gelasi ionik. Koaservat yang dihasilkan memiliki bentuk suspensi dalam fase air, sedangkan gelasi ionik memiliki bentuk material yang

mengalami transisi dari fase air (cairan) menjadi bentuk gel (Mohanraj & Chen, 2006) (Vauthier *et al.*, 2003).

2.2 Pegagan

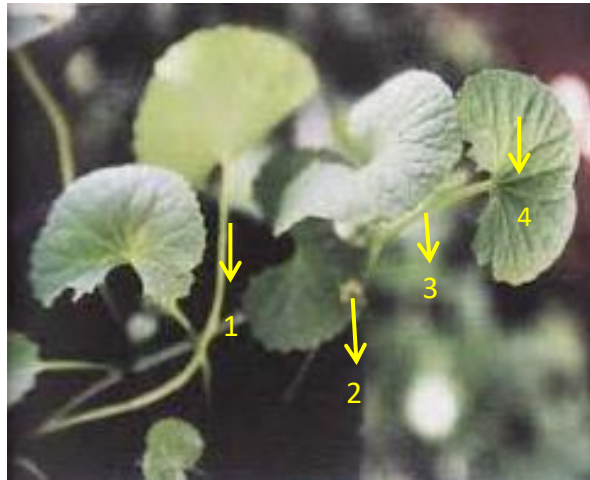
2.2.1 Morfologi Pegagan

Pegagan *Centella asiatica* (L) urban merupakan tanaman herba tahunan yang memiliki tinggi antara 10-15 cm, merayap, dan tidak memiliki batang sejati. Pegagan memiliki helaian daun yang tersusun secara roset akar dengan jumlah mencapai 2-10 helai daun. Daun memiliki warna hijau, berbentuk seperti kipas, dan permukaan daun licin. Daun pegagan memiliki tepi agak melengkung keatas, bergerigi, tulang terpusat, di pangkal, dan memiliki diameter sekitar 1-7 cm (Winarto & Surbakti, 2003., Noverita *et al*, 2012).

Tangkai daun pegagan berbentuk meyerupai pelepah, dan memiliki panjang sekitar 5-15 cm. Pada pangkal daun pegagan terdapat daun sisik yang berukuran pendek, memiliki tekstur licin, tidak berbulu, dan berpadu dengan tangkai daun. Pegagan memiliki bunga berwarna merah muda dan putih yang tersusun dalam karangan berbentuk payung. Pada ujung daun pegagan umumnya terdapat geragih yang mengelilingi sampai pangkal daun. Geragih tersebut juga memiliki ukuran dan keruncingan yang berbeda-beda setiap masing-masing varietas pegagan (Winarto & Surbakti, 2003., Noverita *et al*, 2012).

Pegagan memiliki bunga berbentuk bulat lonjong, panjang sekitar 3-4 mm, dan memiliki mahkota berwarna merah. Pegagan juga memiliki buah berbentuk lonjong, pipih, berbau harum, dan memiliki rasa pahit. Panjang buah yang dimiliki pegagan sekitar 2-2 mm, berkulit keras, berlekuk dua, dan berwarna kuning (Winarto & Surbakti, 2003., Noverita *et al*, 2012).

Pegagan memiliki akar rimpang yang pendek dan bergeragih (Savitri, 2006., Noverita *et al*, 2012). Geragih tersebut berkembang dari sisi fragmen-fragmen akar rimpang Pegagan. Pada akar pegagan juga terdapat stolon yang dapat berkembang menjadi individu baru. Secara umum, penampakan morfologi dari pegagan adalah sebagai berikut: (Winarto & Surbakti, 2003).



Gambar 2.1 Morfologi umum Pegagan; (1) Tangkai daun, (2) Bunga, (3) Ujung daun, (4) Helai daun.

2.2.2 Klasifikasi Pegagan

USDA (2020) memaparkan klasifikasi Pegagan (*Centella asiatica*) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
 Division : Spermatophyta
 Subdivision : Magnoliophyta
 Class : Magnoliopsida (Dicotyledone)
 SubClass : Rosidae
 Ordo : Umbilales (Apiales)
 Family : Umbiliferae (Apiaceae)
 Genus : *Centella*
 Spesies : *Centella asiatica* (L) urban.

2.2.3 Senyawa Bioaktif Pegagan

Pegagan *Centella asiatica* (L) urban menurut Winarto & Surbakti (2003) memiliki senyawa bioaktif seperti; titerpenoid saponin, titerpenoid genin, minyak essensial, flavonoid, fitosterol, dan senyawa bioaktif lainnya. Kandungann senyawa bioaktif dalam pegagan secara lengkap disajikan pada tabel berikut (Calapai, 2012).

Tabel 2.1 Kandungan Senyawa Bioaktif Pegagan

Jenis senyawa	Komponen
Minyak essensial	Terpen Asetat Germacrane Caryophyllene P-Cymol Pinene
Turunan Flavon	Quercetin glycoside Glycoside free astragalin Keemprefol
Sesquiterpenes	Caryophyllene Bicycolelemene Trans-farnesene Ermacrene
Steroid Titerpen	Stigmasterol Sitosterol
Asam titerpen	Asam Asiatik 6-hydroxy aciatic acid Asam Madekasik Asam Madasiatik Asam Betulinic Asam Thankunik Asam Isothankunik
Titerpen Saponin	Asiatikosida Asiatikosida A Asiatikosida B Mdekassosida Braminosida Brahmosida Brahminosida Thankunisida Isothankunisida

Calapai (2012) pada penelitiannya melaporkan bahwa salah satu senyawa bioaktif yang banyak ditemukan pada pegagan adalah asam titerpen dan titerpen saponin (Tabel 2.1). Asam titerpen dan titerpen saponin pada pegagan secara spesifik terdiri dari kandungan asam asiatik, asam madekasik, madekosida, dan

asiatikosida. Menurut Fizur *et al* (2018) asam titerpen dan titerpen saponin pegagan (*Centella asiatica*) memiliki banyak manfaat, sehingga seringkali senyawa tersebut digunakan untuk kepentingan kesehatan. Beberapa manfaat asam titerpen dan titerpen saponin pegagan (*Centella asiatica*) yang diketahui berdasarkan penelitiannya (Fizur *et al*, 2018) meliputi antimikroba, antiperadangan, agen imunomodulator, antidepresi, antikanker dan antidiabetes

Berdasarkan penelitian Hasim *et al* (2011) pegagan memiliki aktivitas antioksidan sebesar 84%. Aktivitas antioksidan tersebut diketahui lebih tinggi daripada aktivitas antioksidan yang dimiliki anggur, yaitu sebesar 83%. Aktivitas antioksidan yang dimiliki Pegagan (*Centella asiatica* L) dilaporkan memiliki peran penting dalam mereduksi efek oksidatif dari ROS (*reactive oxygen spesies*) dalam tubuh. Selain itu antioksidan Pegagan (*Centella asiatica* L) juga dilaporkan memiliki kemampuan untuk melindungi kerusakan saraf (*neuropotective*) dari kerusakan yang diakibatkan oleh aktivitas oksidatif ROS.

Senyawa bioaktif Pegagan (*Centella asiatica*) juga dilaporkan memiliki potensi sebagai kandidat obat diabetes militus. Hal tersebut diketahui dari hasil penelitian yang didapatkan oleh Wilson *et al* (2015) bahwasanya asam asiatik Pegagan (*Centella asiatika*) memiliki kemampuan menghambat enzim α -amylase. Kemampuan inhibisi enzim α -amylase secara fisiologis sangat diperlukan untuk mengurangi kadar glukosa dalam plasma. Sehingga dengan berkurangnya kadar glukosa tersebut diharapkan insulin dapat mengkompensasi kadar glukosa yang ada dalam darah. Oleh karena itu berdasarkan manfaat dan kemampuan tersebut Pegagan (*Centella asiatica*) sering dimanfaatkan untuk kepentingan kesehatan.

2.2.4 Tambuhan dan pengobatan dalam Islam

Pemanfaatan tumbuhan sebagai pengobatan telah dikenal sejak lama dalam Islam. Pemanfaatan tumbuhan sebagai pengobatan dalam islam umumnya dilandasi dari firman Allah SWT dan sunnah yang pernah dicontohkan oleh Nabi Muhammad SAW. Menurut Ar-Rumaikhon (2008), salah satu firman Allah SWT yang digunakan sebagai landasan dalam memanfaatkan tumbuhan sebagai

pengobatan terdapat pada Q.S As-Syu'ara ayat 7-8. Allah SWT berfirman dalam Q.S As-Syu'ara ayat 7-8, sebagai berikut:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً وَمَا كَانَ أَكْثَرُهُمْ مُؤْمِنِينَ ﴿٨﴾ (الشعراء/26:7-8)

“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan (tumbuh-tumbuhan) yang baik?. Sungguh, pada yang demikian itu terdapat tanda (kebesaran Allah), tetapi kebanyakan mereka tidak beriman”. (Asy-Syu'ara/26:7-8)

Al-Qurthubi (2009) dalam tafsirnya menjelaskan bahwa Q.S As-Syu'ara ayat 7-8 memiliki makna bahwasanya Allah SWT telah menciptakan berbagai macam tumbuhan dengan kebaikan atau manfaatnya masing-masing. Kebaikan tersebutlah yang perlu diperhatikan, supaya manusia mendapat kemanfaatan dari tumbuhan-tumbuhan tersebut. Khususnya kebaikan atau manfaat tumbuhan untuk pengobatan penyakit bagi manusia.

Menurut Ar-Rumaikhon (2008) bahwasanya Nabi Muhammad SAW juga pernah mencontohkan penggunaan tumbuhan sebagai media pengobatannya. Beberapa tumbuhan tersebut diantaranya adalah jinten hitam, Jahe, Zaitun, Kurma dan Delima. Maka hikmah yang dapat diambil dari metode pengobatan yang dicontohkan oleh Nabi Muhammad SAW adalah manusia perlu memanfaatkan secara bijak dan optimal tumbuhan-tumbuhan yang telah diciptakan oleh Allah SWT. Khususnya pemanfaatan tumbuhan untuk pengobatan dan kesehatan bagi manusia.

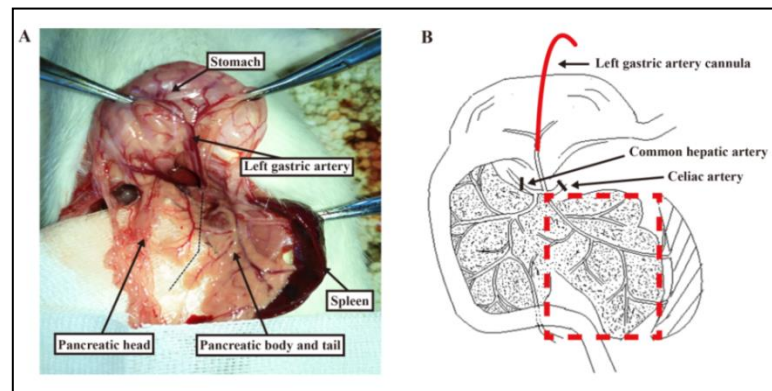
2.3 Pankreas Tikus

2.3.1 Anatomi dan Fisiologi Pankreas Tikus

Pankreas merupakan suatu kelenjar yang tergolong ke dalam kelenjar eksokrin dan endokrin (Mashudi, 2011). Pankreas memiliki morfologi permukaan organ yang berbentuk lobulasi berwarna merah keabuan dan terdapat jaringan ikat tipis (Frandsen, 1992) (Pearch, 2000). Jaringan ikat tipis tersebut membatasi antara pankreas bagian kelenjar, dan pankreas bagian lobulus. Pankreas memiliki struktur serupa seperti kelenjar parotis. Khususnya pada hewan jenis rodentia,

pankras memiliki struktur seperti kumpulan sel yang berbentuk bola (*spheroid*) dengan sel-sel beta di tengah-tengahnya. Sedangkan sekeililing sel beta terdapat sel-sel alfa pankreas, dan juga terdapat sel delta pankreas yang tersebar dan mengelilingi antara sel beta dan sel alfa (Mashudi, 2011)

Menurut Pearch (2000) menyatakan bahwa letak pankreas tikus terdapat di mesoduodenum. Pankreas yang terdiri atas lobus kanan dan lobus kiri, lobus kanan memiliki luas sampai ke ligamentum duodenum, sedangkan lobus kiri memiliki luas sampai ke arah limfa. Morfologi pankreas tikus menurut Huajun *et al* (2018) adalah sebagai berikut:



Gambar 2.2 (A) Foto, (B) gambaran morfologi pankreas Tikus (Huajun *et al*, 2018)

Fungsi pankreas secara umum ada dua, yaitu sebagai kelenjar eksokrin dan kelenjar endokrin. Pankreas yang memiliki fungsi sebagai kelenjar eksokrin hampir meliputi 99% volume pankreas, sedangkan pankreas yang memiliki fungsi sebagai kelenjar endokrin bagian kecil volume pankreas yang disebut dengan pankreas accini. Feron kelenjar pankreas sebagai kelenjar pankreas adalah untuk mensekresikan sebagian hormon pencernaan menuju duodenum. Fungsi tersebut diperankan oleh hampir seluruh bagian pankreas (Martini, 2008). Sedangkan fungsi pankreas sebagai kelenjar endokrin berhubungan dengan ekspresi beberapa hormon untuk menjaga tingkat nutrisi dalam darah dan pada penyimpanan seluler (Jo *et al.*, 2007). Fungsi pankreas sebagai kelenjar endokrin tersebut diperankan oleh pulau langrehans (Leslie., 2012).

2.3.2 Sel Islet Pankreas Tikus

Sel islet pankreas atau biasanya disebut dengan pulau langerhans secara umum terdiri atas 4 sel yang menyusunnya. Sel yang menyusun pulau langerhan tersebut tersebut adalah; sel α , sel β , sel δ , dan Sel F (Mescher, 2012). Komplek pulau langerhan tersebut secara keseluruhan berperan sebagai kelenjar endokrin pada pankreas. Secara fisiologis masing-masing sel tersebut memiliki fungsi sebagai berikut:

1. Sel α , merupakan bagian sel islet pankreas yang berperan dalam memproduksi glukagon. Glukagon tersebut memiliki fungsi untuk mengubah glukosa menjadi glikogen. Pada saat tubuh kelebihan glukosa maka glukagon yang akan mengubah glukosa menjadi glikogen kemudian disimpan dalam sel hati dan otot (Ganong, 2008).
2. Sel β , merupakan bagian sel islet pankreas yang berperan dalam memproduksi insulin. Insulin tersebut memiliki fungsi untuk regulasi glukosa dalam darah. Pada saat keadaan normal, rangsangan pada sel beta akan menyebabkan insulin disintesis dan kemudian disekresikan ke dalam darah sesuai dengan kebutuhan tubuh untuk keperluan regulasi glukosa darah (Ganong, 2008).
3. Sel δ , merupakan bagian sel islet pankreas yang berperan dalam memproduksi hormon somastatin. Hormon somastatin merupakan hormon polipeptida yang berfungsi untuk mengendalikan sistem endokrin dan pengaruh terhadap transmisi sinyal syaraf dan perkembangan tubuh. Secara umum somastatin memiliki dua bentuk preproprotein dengan susunan 14 asam amino dan preproprotein dengan 28 asam amino (Costoff, 2008).
4. Sel F, merupakan bagian sel islet pankreas yang berperan dalam memproduksi hormon polipeptida pankreas. Hormon polipeptida pankreas merupakan yang berfungsi untuk mengendalikan sistem ekskresi kelenjar endokrin dan eksokrin secara umum. Hormon ini juga berperan terhadap regulasi ekspresi hormon insulin pada sel beta pankreas (Costoff, 2008).

Ditinjau dari beberapa penelitian yang pernah dilakukan, khususnya secara *in vitro* dapat diketahui bahwa sel beta pankreas sering kali dipilih dan digunakan untuk kepentingan penelitian terkait penyakit diabetes militus (Almaça, 2020; Javidi et al., 2019; Lytrivi, Anne-laure, Poitout, & Cnop, 2019). Hal tersebut disebabkan oleh adanya keterkaitan antara fungsi sel beta pankreas dengan fisiologis penyakit diabetes militus tersebut. Namun beberapa penelitian yang pernah dilakukan terkait diabetes militus juga menyebutkan bahwa keterkaitan fisiologis yang terjadi pada penyakit diabetes militus tidak hanya terjadi pada sel beta pankreas. Secara luas seluruh sel pankreas yang menyusun pulau langerhans juga memiliki peran dan keterkaitan satu sama lain terhadap timbulnya maupun terjadinya penyakit diabetes militus (Berbudi, Rahmadika, Tjahjadi, & Ruslami, 2020; Lehmann, Andersen, Damodaran, & Vermette, 2018; Marshall & Marshall, 2020).

2.4 Kultur Sel

Kultur sel merupakan suatu metode yang mengembangkan sel dalam suatu lingkungan yang terkontrol. Teknik kultur sel secara luas digunakan untuk memudahkan pengamatan sampel penelitian dalam tingkat seluler. Secara umum teknik kultur sel menggunakan dua macam sel, yaitu sel primer dan sel sel line (sel lestari). Sel primer merupakan sampel sel yang dikultur dan diisolasi dari jaringan ataupun organ secara langsung (Khumairoh & Puspitasari, 2016) (Ma'at, 2011). Sedangkan sel line merupakan sel yang dikultur dan diisolasi dari sel yang telah dikembangkan sebelumnya (Lee *et al.*, 2010) (Skelin & Rupnik, 2010).

2.5 Kultur Sel Pankreas

Menurut Kaiser *et al* (2016) sel pankreas secara umum dikultur atau dikembangkan untuk mengetahui fisiologis dari sel tersebut. Umumnya penelitian mengenai kultur sel pankreas selalu menggunakan fetus atau janin untuk mendapatkan sel primer yang akan dikultur. Pemilihan fetus dilakukan sebab proses isolasi sel pankreas lebih mudah, dan kondisis sel pankreas belum terpengaruhi cecaran atau penyakit yang diderita hewan coba. Selain itu menurut

(Sumbayak (2014) alasan pemilihan sel primer dari organisme fetus adalah sebagai berikut:

1. Sel fetus memiliki kemampuan poliferasi atau membelah secara terus menerus mengikuti siklus pembelahan sel mitosisnya,
2. Sel fetus memiliki kemampuan replikasi yang stabil dan cepat dan mempunyai kemampuan menyusun kembali jaringan asalnya,
3. Sel fetus belum banyak dicemari oleh bahan-bahan aktif maupun penyakit.

Menurut (Amoli *et al.*, 2005) menyatakan bahwa isolasi sel dari pankreas tidaklah mudah, sebab organ pankreas memiliki karakter yang sulit dihancurkan. Oleh karena itu, seringkali isolasi sel dari pankreas dilakukan dengan bantuan enzim kolagenase. Penggunaan enzim kolagenase dapat membantu menghancurkan kolagen yang terdapat pada pankreas. Namun, penggunaan kolagenase menurut Wolters *et al* (1995) akan dapat menyebabkan efek pada perkembangan sel pankreas, selain itu juga penggunaan kolagenase akan menyebabkan sel isolat yang didapatkan tidak murni dan konsentrasi sel isolat yang didapatkan lebih sedikit.

Kultur sel pankreas tikus menurut Prasetyaningtyas *et al* (2016) pada umumnya dilakukan pada media DMEM (*Dulbecco modified eagle medium*). Media DMEM umumnya juga ditambahi dengan beberapa nutrisi sel seperti FBA (Fetal bovine albumin) untuk menyediakan lingkungan yang optimal untuk pertumbuhan sel. Selain itu, menurut Apte *et al* (1998) kultur sel pankreas biasanya diinkubasi pada suhu 37°C dengan konsentrasi CO₂ sebesar 5%, dan membutuhkan waktu inkubasi selama 7 hari. Selain itu kultur sel pankreas juga dapat dikultur dengan media lain, diantaranya adalah RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), Hams-F12'K Medium, dan DMEM/F12 (Syahidah & Hadisaputri, 2012.; Velasco, Larqué, Díaz-garcía, Sanchez-soto, & Hiriart, 2018).

Penggunaan DMEM sebagai media kultur sel pankreas tikus, terutama sel primer diketahui cocok untuk dilakukan. Hal tersebut dikarenakan oleh adanya kandungan yang tinggi seperti vitamin, dan asam amino pada media. Selain itu

Media DMEM diketahui memiliki kandungan glukosa 2 – 4 kali lipat lebih tinggi dari media lainnya, sehingga untuk kepentingan penelitian diabetes militus akan mendukung terhadap munculnya penyakit tersebut. Adapun komposisi glukosa pada media DMEM secara umum berkisar 4500 mg/L dan 1000mg/L (Syahidah & Hadisaputri, 2012.; Rohanova et al, 2014)

2.6 Induksi Streptozotocin

Streptozotocin secara umum memiliki komposisi berupa glukosa [(glucopyranose, 2-deoxy-2-(3-methy-enitrosourido-D)] yang dihasilkan dari ekstrak *Streptomyces acromogenes* (Junod *et al.*, 1967) (Saini *et al*, 1996). Streptozotocin dilaporkan sering digunakan untuk membentuk kondisi diabetes militus dalam skala laboratorium. Kemampuan streptozotocin secara klinis diketahui dapat memberikan kerusakan secara langsung kepada sel pankreas, terutama ke sel beta pankreas. Nahdi *et al* (2017) pada penelitiannya menyebutkan bahwa secara *in vitro* dosis streptozotocin sebesar 5mM dapat menyebabkan penurunan viabilitas sel hingga 60%.

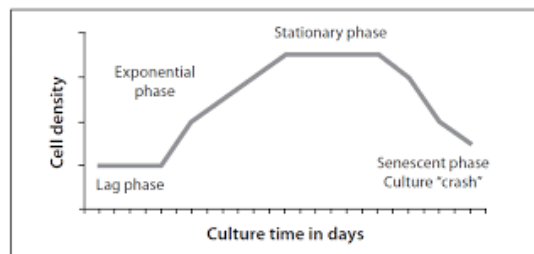
Streptozotocin yang digunakan untuk menginduksi diabetes militus dalam skala laboratorium diketahui dapat memberikan efek stres oksidatif kepada sel pankreas. Saini *et al* (1996) dan Lenzen (2008) menambahkan bahwa efek streptozotocin tersebut akan mempengaruhi langsung terhadap penurunan kadar NAD^+ pada intraseluler sel. Sehingga dengan menurunnya kadar NAD^+ tersebut akan memicu kegagalan proses sintesis proinsulin pada sel pankreas. Kegagalan sintesis insulin secara berkepanjangan tersebutlah yang akan memicu penurunan sekresi insulin pada sel beta pankreas, sehingga akan memunculkan penyakit defisiensi insulin atau yang sering dikenal dengan nama insulinopenia.

2.7 Poliferasi Sel Pankreas

Menurut Cooper and Hausman (2002) Poliferasi sel merupakan proses pertumbuhan dan perkembangan sel untuk memperbanyak dirinya melalui pembelahan sel secara aktif. Poliferasi sel berperan dalam meregulasi aktivitas pertumbuhan, diferensiasi, dan apoptosis pada sel. Selain itu menurut Albert and

Bray (1994) bahwa poliferasi dibutuhkan untuk proses embriogenesis, penyembuhan luka, dan pergantian sel yang telah rusak.

Secara umum, menurut Djuwita (2002) (Butler, 2004) aktivitas pertumbuhan dan perkembangan sel dibagi menjadi tiga fase. Fase pertama adalah fase *lag* atau fase keadaan sel melakukan adaptasi terhadap lingkungan hidupnya. Fase kedua adalah fase *log (exponential)* atau fase keadaan sel melakukan pertumbuhan dan perkembangannya dengan keadaan yang optimal. Fase ketiga adalah fase stasioner (*stationary*), pada fase ini kematian sel mulai muncul. Fase stasioner ditandai dengan pertumbuhan dan kematian sel yang seimbang. Fase keempat adalah fase Pleateu (*senescent*) seringkali dikenal sebagai fase kematian sel. Fase kematian sel tersebut merupakan fase kondisi sel melakukan konfluitas yang sangat tinggi, sehingga lingkungan hidup sel tidak dapat menopang kehidupan sel, dan akhirnya sel mengalami kematian. Adapun pertumbuhan dan perkembangan digambarkan dalam bentuk kurva sebagai berikut: (Creswell, 2010)



Gambar 2.3 Kurva pertumbuhan sel kultur (Creswell, 2010)

2.7.1 Konfluenitas Sel

Konfluenitas sel merupakan suatu kondisi sel yang tumbuh pada substrat media secara merata. Umumnya konfluenitas sel akan membentuk pola persebaran monolayer (Doyle *et al*, 1998). Parameter sel bisa disebut konfluen apabila sel sudah memenuhi seluruh permukaan substrat (Djati, 2006). Konfluen sel juga dapat diketahui hasilnya dengan mengetahui lama waktu yang dibutuhkan sel kultur primer untuk menggandakan jumlahnya dari jumlah awal, atau biasanya dikenal dengan PDT (*population doubling time*) (Juwita, 2005)

Rumus nilai PDT (*population doubling time*) menurut Marjan *et al* (2016) dituliskan sebagai berikut:

$$\text{PDT (Hari)} = \frac{1}{\frac{(\log \text{ jumlah sel akhir} - \log \text{ jumlah sel awal}) \times 3.32}{\text{waktu (hari)}}}$$

Menurut Kaiin dan Djuwita (2016) menyatakan bahwa tingkat konfluenitas/poliferasi sel yang tinggi ditandai dengan nilai PDT yang rendah. Nilai PDT yang rendah tersebut menunjukkan bahwa sel mengalami pertumbuhan yang optimal. Perhitungan PDT (*population doubling time*) pada penelitian umumnya dilakukan pada awal dan akhir pengambilan data.

2.7.2 Viabilitas Sel

Viabilitas sel merupakan suatu kemampuan sel untuk hidup dalam suatu lingkungan (Butler, 2004). Viabilitas sel juga sering diartikan sebagai perbandingan sel hidup dengan jumlah sel yang mati. Umumnya, untuk mengetahui perbandingan sel yang hidup (*viable*) dan sel yang mati (*non-viable*) perlu dilakukan pewarnaan. Pewarnaan terhadap sel dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa pewarna, diantaranya adalah Tripkan Biru 0,4 % atau dengan menggunakan pewarna Flouresin. Berdasarkan pewarnaan yang dilakukan, sel yang mati (*non-viable*) akan tampak lebih gelap dari pada sel yang hidup (*viable*). Hal tersebut diakibatkan oleh membran pada sel mati (*non-viable*) dapat dengan mudah ditembus oleh pewarna yang digunakan. Sedangkan pada sel hidup (*non-viable*), membran selnya tidak mudah ditembus atau dimasuki oleh pewarna (Trenggono, 2009) (Freshney, 1992).

Menurut Freshney (1992) dan Kalanjati (2006) bahwa secara kuantitatif viabilitas sel dihitung melalui rumus sebagai berikut:

$$\text{Viabilitas} = \frac{\text{Total sel hidup}}{\text{Total keseluruhan sel}} \times 100\%$$

Takeuchi (2014) menyatakan bahwa viabilitas pada sel dapat dipengaruhi oleh beberapa factor. Salah satu factor tersebut adalah berupa pertumbuhan dan

perkembangan pada sel. Faktor tersebut juga akan mempengaruhi terhadap kemampuan konfluensi dan poliferasi sel. Sehingga viabilitas, konfluenitas, dan poliferasi sel memiliki keterkaitan satu sama lain.

2.7.3 Faktor-faktor yang mempengaruhi poliferasi

Menurut Trenggono (2009) bahwa poliferasi sel dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor-faktor tersebut diantaranya adalah:

1. Substrat

Substrat atau media pertumbuhan sel merupakan salah satu yang penting dalam menopang kehidupan sel. Khususnya menopang dalam keadaan lingkungan terkontrol (*in vitro*). Pemenuhan kebutuhan nutrisi substrat untuk sel umumnya meliputi aspek nutrisi karbohidrat, asam amino, mineral, dan vitamin. Selain itu juga aspek osmolaritas, PH, dan sterilitas media perlu diperhatikan dalam substrat kultur sel (Trenggono, 2009).

2. Oksigen

Komponen oksigen dalam kultur sel juga dibutuhkan untuk pertumbuhan dan perkembangan sel. Oksigen dibutuhkan untuk memberikan akomodasi dan tekanan oksigen yang sama dengan keadaan lingkungannya sebenarnya. Peran oksigen dalam kehidupan sel juga sangat penting, sehingga kebutuhan esensial oksigen tidak dapat dihilangkan (Trenggono, 2009).

3. Suhu

Komponen suhu dalam kultur sel dibutuhkan untuk menyediakan kondisi yang sesuai bagi pertumbuhan dan perkembangan sel. Umumnya suhu pada kultur sel disesuaikan dengan keadaan suhu lingkungan asli sel tersebut. Kisaran suhu yang dibutuhkan untuk sel untuk hidup adalah sekitar 36°-38°C (Trenggono, 2009).

Menurut Ma'at (2011) menyatakan bahwa komponen – komponen seperti substrat, oksigen, dan suhu tersebut harus memenuhi takaran yang sesuai agar poliferasi sel kultur nya optimal. Komponen-komponen yang tidak sesuai takaran akan menyebabkan pertumbuhan sel kultur terhambat bahkan bisa menjadi racun

atau agen toksik bagi sel kulturenya. Sehingga komponen-komponen tersebut harus diperhatikan secara teliti.

Syauqi (2000) menyatakan bahwa komponen-komponen seperti substrat, oksigen, dan suhu dalam prespektif kesehatan islam dianalogikan seperti makan-makanan yang dikonsumsi manusia. Prespektif islam sangat menganjurkan kepada umatnya agar memperhatikan takaran dan pola makanan yang dikonsumsi. Anjuran tersebut sebagaimana ada dalam Q.S 'Abasa ayat 24. Allah SWT berfirman dalam Q.S 'Abasa ayat 24, bahasanya:

فَلْيَنْظُرِ الْإِنْسَانُ إِلَى طَعَامِهِ ﴿٢٤﴾ (عبس/80:24)

"Maka hendaklah manusia itu memperhatikan makanannya " ('Abasa/80:24)

Hamka (1993) dalam tafsirnya menjelaskan bahwa Q.S 'Abasa ayat 24 tersebut hendaklah dijadikan acuan bagi manusia khususnya umat islam dalam mengatur kesehatan tubuh melalui makanan yang dikonsumsi. Makanan yang berlebihan dalam tinjauan kesehatan akan dapat menimbulkan berbagai masalah atau penyakit pada tubuh. Selain penyakit pada tubuh, kebiasaan mengkonsumsi makanan yang berlebihan akan menyebabkan seseorang memiliki sifat rakus atau tamak dalam dirinya. Sesungguhnya sesuatu yang teratur dan sesuai porsiya itu lebih baik bagi manusia.

Menurut Suriani (2012) bahwa kelainan yang sering timbul akibat mengkonsumsi makanan yang berlebihan adalah kelainan metabolisme tubuh. Secara bertahap kelainan metabolisme tubuh tersebut akan menyebabkan berbagai penyakit kronis lainnya. Salah satu penyakit yang timbul akibat kelainan metabolisme tubuh secara akut adalah diabetes melitus tipe 2. Sehingga manusia perlu memperhatikan takaran dan pola makanan yang dikonsumsi. Sedangkan bagi manusia yang telah memiliki kelainan metabolisme tubuh akut seperti diabetes melitus tipe 2, maka langkah yang perlu dilakukan adalah dengan mengobatinya.

2.8 Pengaruh Nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica* L) terhadap kultur sel pankreas

Pegagan (*Centella asiatica* L) urban secara umum telah banyak dikenal dan dimanfaatkan sebagai obat alami. Berdasarkan laporan Fizur *et al* (2018) diketahui Pegagan (*Centella asiatica* L) memiliki kemampuan sebagai promotor reseptor PPAR γ (*Peroxisome Poliferator Reseptor-Gamma*). Reseptor PPAR γ sendiri memiliki peran sebagai regulator fungsi mitokondria, meliputi metabolisme energi, proliferasi dan diferensiasi seluler (Bermudez *et al.*, 2010; Setyawati, 2014). Sehingga dengan kemampuan tersebut, pegagan dapat dikatakan memiliki potensi tinggi untuk mengembalikan regenerasi serta fungsi sel pankreas.

Fizur *et al* (2018) juga melaporkan pada penelitiannya bahwa Pegagan (*Centella asiatica* L) memiliki kemampuan untuk meningkatkan proliferasi sel melalui ekspresi dan aktivasi protein GLUT4 (*glucose-transporter 4*). Protein GLUT4 sendiri merupakan protein yang berperan penting dalam mengatur transportasi glukosa ekstraseluler menuju membran-membran sel (Alam & Gan, 2016). Glukosa yang dibawa oleh protein GLUT4 tersebut selanjutnya diproses untuk kepentingan metabolisme sel (Kurniasari *et al*, 2015). Semakin banyak GLUT4 yang terekspresi dan teraktivasi, maka metabolisme sel yang berjalan akan semakin optimal. Metabolisme sel yang optimal pada akhirnya akan memicu proliferasi dan pembelahan sel lebih cepat.

Proliferasi dan regenerasi fungsi sel pankreas yang meningkat secara fisiologis juga akan berdampak terhadap peningkatan sekresi insulin pada sel beta pankreas. Efek stres oksidatif yang ditimbulkan oleh DM tipe 2 juga akan berangsur berkurang seiring dengan kembalinya fungsi mitokondria dalam mengatur metabolisme dalam sel. Sehingga dengan semakin meningkatnya sekresi insulin pada sel beta pankreas, maka fungsi biologis insulin dalam mengkompensasi kadar glukosa akan kembali menjadi normal juga (Wang & Wang, 2017).

Modifikasi senyawa Pegagan (*Centella asiatica* L) menjadi bentuk nanopartikel dilaporkan juga akan mampu meningkatkan potensinya sebagai

kandidat obat diabetes militus. Hal tersebut dikarenakan oleh kemampuan bioavailabilitas (BA) senyawa titerpen saponin asam asiatika Pegagan (*Centella asiatica* L) yang rendah (Sun *et al*, 2020). Sehingga modifikasi menjadi bentuk nanopartikel akan menunjang Pegagan (*Centella asiatica* L) dalam proses difusi dan opsinifikasi melewati membran-membran sel. Selain itu kombinasi nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica* L) dengan nanopartikel kitosan juga akan membantu untuk penghantaran senyawa bioaktif pegagan (Tiyaboonchai, 2003), (Prashanth & Tharanathan, 2007), (Kumar *et al*, 2012), (Shanmukha *et al*, 2012), (Jayakumar, 2010), dan (Zhu & Zhang, 2014).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dengan judul “pengaruh nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica* L) tersalur kitosan terhadap konfluenitas, viabilitas, dan kadar insulin pada kultur sel pankreas tikus yang diinduksi streptozotocin” ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan rancangan berupa rancangan acak lengkap (RAL) dengan menggunakan 6 perlakuan dan 4 ulangan. Adapun bentuk rancangan perlakuan yang dibuat pada penelitian ini adalah sebagai berikut;

1. Perlakuan 1 = Media DMEM dengan FBS 10% + induksi Streptozotocin, tanpa pemberian nanopartikel pegagan (kontrol negatif).
2. Perlakuan 2 = Media DMEM dengan FBS 10% + induksi Streptozotocin + nanopartikel pegagan 20 μ M.
3. Perlakuan 3 = Media DMEM dengan FBS 10% + induksi Streptozotocin + nanopartikel pegagan 40 μ M.
4. Perlakuan 4 = Media DMEM dengan FBS 10% + induksi Streptozotocin + nanopartikel pegagan 60 μ M.
5. Perlakuan 5 = Media DMEM dengan FBS 10% + induksi Streptozotocin + nanopartikel pegagan 80 μ M.
6. Perlakuan 6 = Media DMEM dengan FBS 10% + induksi Streptozotocin + nanopartikel pegagan 100 μ M.

3.2 Variabel Penelitian

Variabel penelitian pada penelitian ini adalah sebagai berikut;

1. Variabel bebas penelitian ini berupa konsentrasi nanopartikel Pegagan (*Centella Asiatica* L).
2. Variabel terikat penelitian ini berupa viabilitas, konfluenitas, dan ekspresi insulin sel pankreas.
3. Variabel kontrol penelitian ini berupa alat dan bahan yang digunakan, suhu, konsentrasi streptozotocin dan kadar CO₂ pada saat inkubasi.

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian dengan judul “pengaruh nanopartikel pegagan (*Centella Asiatica* L) tersalur kitosan terhadap konfluenitas, viabilitas, dan kadar insulin sel pankreas tikus (*Rattus Norvegicus*) yang diinduksi streptozotocin” ini dilaksanakan pada Bulan Agustus tahun 2019 - November 2020, di Laboratorium Kultur Jaringan Hewan Prodi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang, Laboratorium Riset Farmasi Fakultas Kesehatan dan Ilmu Kedokteran Universitas Islam Negeri Malang, Laboratorium Farmasetika Universitas Ma-Chung Malang, dan Laboratorium Biosains Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi; *laminar air flow* (LAF) (*Vertical Air Flow* AlabTech, Korea), *flowcytometry* (BD FACS Calibur Biosciences, USA) sentrifus (Labatuge 200 Thermoscientific, Jepang), inkubator (HERA Cell 150, Thermoscientific, Jepang), *rotary evaporator*, vortex (Thermoscientific, Jepang), neraca analitik (Sartorius, Finlandia), sonifikator (Cole Pamer, US), mikroskop *inverted* (Nikon Eclipse, Jepang), autoklaf (Daihan Labtech Biomedic, Korea), oven (Heraeus Thermoscientific, Jepang), kulkas (Claso Thosiba, Jepang) mikropipet 0.5-10 µl (Thermoscientific, Jepang), mikropipet 20-200 µl (Thermoscientific, Jepang), mikropipet 1000 µl (Thermoscientific, Jepang), *white tip*, *yellow tip*, *blue tip*, rak tabung reaksi, tabung reaksi, petri dish, TC dish, petri dish, gelas beaker 1000ml, gelas ukur 20ml, erlenmeyer 100ml, spuilt 10ml, filter *miliphore* 0,22 µl (AMQAF1000 Thermofisher, US), pinset, gunting bedah, spatula, bunsen, korek api, sprayer, botol schot 100nl, tutup botol schot, botol selai 100ml, tube sentrifuge 15 ml, cawan porselen 75ml, kertas label, masker, dan sarung tangan.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi; neonatus tikus berumur 2-3 hari, DMEM (dulbecco's modified eagle *medium*) (Gibco,USA),

HEPES (Promega,USA), NaHCO_3 (Himedia), *sterillized water*, akuades, serum FBS (*fetal bovine serum*) 10%, HBSS (*hank's-buffered saline solution*), PBS (*phosphat buffer saline*), kitosan, Pegagan (*Centella asiatica* L), sodium tripolifosfat (STPP), formaldehida 0,4%, alkohol 95%, alkohol 70%, asam sitrat, trisodium sitrat, streptozotocin, NaCl 0,9%, penicilin (Meiji, Indonesia), streptomisin (Meiji, Indonesia), tripsin-EDTA 0,25%, *triplan blue*, DMSO (*dimethyl sulfoxide*), *Mouse monoclonal insulin antibody*, asam asetat glasial (AAG), Tween 80, formaldehida 10% , plastik wrap dan Alumunium foils.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pembuatan Ekstrak Pegagan (*Centella Asiatica* L)

Simplisia kering Pegagan (*Centella Asiatica* L) seberat 100 gram didapatkan dari UPT Materia Medica Malang. 100 gram Simplisia yang didapat kemudian diekstraksi dengan alkohol 70% menggunakan metode meserasi. Proses meserasi dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan dengan setiap pengulangan menggunakan alkohol 70% sebanyak 400ml. Meserat yang didapatkan selanjutnya dievaporasi dengan menggunakan *Rotary vacuum evaporator* selama 1 jam.

3.5.2 Pembuatan Nanopartikel Pegagan (*Centella Asiatica* L) Tersalut Kitosan

Ekstrak Pegagan yang didapatkan dari proses ekstraksi kemudian dicampur dengan 20 ml sodium tripolifosfat (STTP), dan kitosan 0,5% yang telah dilarutkan dalam 100 ml asam asetat glasial (AAG). Ekstrak tersebut kemudian dihomogenisasi menggunakan stirer dengan kecepatan 1000 rpm selama 30 menit. Homogenat yang dihasilkan selanjutnya ditambah dengan 1ml Tween 80, dan dihomogenisasi menggunakan Homogenizer dengan kecepatan 4000 rpm selama 60 menit.

Homogenat yang didapat selanjutnya disonifikasi selama 120 menit dengan menggunakan frekuensi sebesar 20 kHz, dan amplitudo sebesar 90%. Setelah itu suspensi disimpan di deep freezer selama 12 jam (semalam). Suspensi kemudian disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Pelet yang didapatkan kemudian digerus dengan menggunakan mortar, dan disaring

menggunakan ayakan 30 mesh. Nanopartikel yang didapatkan selanjutnya dilarutkan dengan menggunakan pelarut DMSO (*dimethyl sulfoxide*) konsentrasi 1% dan dihomogenkan. Suspensi nanopartikel yang telah terbentuk kemudian disterilisasi dengan menggunakan *filter milipore* 0,22 µl dan hasil yang didapat digunakan untuk kepentingan pada penelitian ini. (Pakki *et al*, 2016., Muchtaromah dkk, 2020)

3.5.3 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan pada penelitian ini disterilisasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Proses sterilisasi alat dan bahan pada penelitian ini meliputi sterilisasi kimiawi, fisik, dan mekanik. Proses sterilisasi kimiawi dan fisik dilakukan untuk alat-alat laboratorium yang digunakan, sedangkan proses sterilisasi fisik dan mekanik digunakan untuk bahan-bahan yang digunakan pada penelitian.

Proses sterilisasi kimiawi dan fisik pada penelitian ini dilakukan dengan cara merendam alat-alat penelitian berupa alat bedah, *glass ware*, dan alat-alat kultur sel lainnya ke dalam air yang sudah ditambahkan larutan teepol. Perendaman dengan menggunakan teepol dilakukan selama 24 jam. Alat-alat tersebut kemudian dibilas dengan menggunakan air mengalir sebanyak 20 kali, dan 1 bilasan terakhir dilakukan dengan menggunakan aquades. Alat-alat yang telah dibilas kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven dengan suhu 60°C selama 60 menit. Alat-alat tersebut kemudian dibungkus dengan menggunakan aluminium foil, dan dioven kembali dengan menggunakan suhu 121°C selama 3 jam. Namun untuk alat-alat berupa tip mikropipet, tutup botol schott, dan tube sentrifuge tidak dioven dengan menggunakan suhu 121°C selama 24 jam, melainkan dilakukan proses sterilisasi metode panas basah dengan menggunakan *autoclave*. Proses sterilisasi metode panas basah pada penelitian ini dilakukan selama 1 jam dengan menggunakan suhu 121°C dalam tekanan 1 atm.

Proses sterilisasi fisik dan mekanik pada penelitian ini dilakukan dengan cara mencuci sample organ pankreas ke dalam aquades sampai bersih dari darah dan jaringan ikat lainnya. Setelah itu organ pankreas dicuci ulang dengan

menggunakan NaCl 0.9% selama 1 kali. Selain itu proses sterilisasi bahan juga dilakukan dengan menggunakan *autoclave*. Proses sterilisasi *autoclave* dilakukan untuk mensterilisasi buffer PBS (phosphat buffered saline) , dan buffer HBSS (*Hank's balanced salt solution*) yang digunakan pada penelitian ini.

3.5.4 Sterilisasi Ruang

Proses sterilisasi ruang pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan radiasi sinar ultraviolet (UV-Vis). Proses sterilisasi menggunakan UV-Vis pada penelitian ini dilakukan dua kali. Sterilisasi UV-Vis pertama dilakukan pada waktu 30 menit sebelum penelitian dilakukan. Sedangkan proses kedua dilakukan selama 24 jam setelah penelitian dilakukan. Selain metode sterilisasi ruang yang dilakukan dengan menggunakan radiasi sinar ultraviolet (UV-Vis), sterilisasi ruang juga dilakukan dengan mengepel lantai ruang kerja penelitian dengan menggunakan larutan aseptik wipol yang telah dilarutkan dengan air. Pengepelan dilakukan sebanyak 3 kali, namun pada pengepelan lantai terakhir dilakukan dengan larutan aseptik wipol tanpa dilarutkan dengan air.

3.5.5 Pembuatan Media Stock

Pembuatan media stock pada penelitian ini dilakukan setelah proses sterilisasi alat, bahan, dan ruang selesai. Langkah awal pada saat pembuatan media stock adalah mempersiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan. Alat dan bahan yang dibutuhkan pada pembuatan media stock adalah botol schott 100 ml, tabung erlenmeyer, spuit 10 ml, filter milipore 0,22 μ l, gelas ukur 100ml, 1.35g DMEM, 0,238g Hepes, 0,006g penicillin, 0,37g NaHCO₃ dan 0,01 gram streptomycin. Bahan yang telah disiapkan kemudian diletakkan ke dalam erlenmeyer, dilarutkan serta dihomogenkan dengan DI water (dionized water) sebanyak 100 ml. Setelah itu media tersebut disterilisasi menggunakan filter milipore ukuran 0,22 μ l. Media yang sudah difilter selanjutnya dimasukkan ke dalam botol schott steril, dan kemudian disimpan di lemari es dengan suhu -4 °C.

3.5.6 Pembuatan Media DMEM 10%

Media DMEM stock yang telah dibuat selanjutnya ditambahkan dengan FBS (*fetal bovine serum*) untuk keperluan kultur sel pada penelitian ini. Langkah

pertama yang dilakukan adalah mengambil DMEM stock sebanyak 10 ml, kemudian Media dimasukkan ke tube sentrifuge steril ukuran 15 ml. Setelah itu ditambahkan FBS sebanyak 1 ml dan dihomogenkan. Media DMEM 10% yang telah homogen kemudian digunakan untuk kepentingan kultur sel pada penelitian ini.

3.5.7 Pelaksanaan Kultur Sel Pankreas

Pelaksanaan kultur sel pankreas pada penelitian ini dilakukan melalui 3 tahap utama; yaitu pembedahan, isolasi organ, dan pemurnian. Langkah tersebut dilakukan berdasarkan protocol yang sebelumnya telah dilakukan Dong *et al* (2009) dengan beberapa modifikasi (lampiran 3). Proses pembedahan yang dilakukan adalah: pertama, alat dan bahan yang dibutuhkan dimasukkan ke dalam LAF (laminar air flow) untuk disterilisasi terlebih dahulu selama 30 menit. Alat dan bahan yang dibutuhkan meliputi gunting bedah, pinset, spray, alumunium foils, petri dish, gelas beker 100 ml, spuilit 10 ml, mikropipet 20-200 μ l, sentrifuge, tube sentrifuge, bunsen, dan korek api.

Langkah selanjutnya adalah mempersiapkan alas bedah berupa alumunium foil pada LAF (*laminar air flow*), setelah itu fetus tikus umur 2-3 hari diambil, kemudian disemprot seluruh tubuh fetus tikus dengan spray yang telah berisi alkohol 70%. Setelah itu fetus didislokasi dan dibedah menggunakan gunting bedah. Pembedahan dilakukan secara ventral pada tubuh fetus, kemudian diambil organ pankreas tikus dan diletakkan di petri dish yang telah berisi NaCl 0,9% dan antibiotik.

Pankreas yang telah diletakkan di petri dish tersebut kemudian dicuci sebanyak 3 kali. Setelah itu pankreas dimasukkan ke dalam gelas beaker 100 ml dan dicacah menggunakan gunting. Pankreas yang telah berbentuk suspensi kasar tersebut kemudian dihaluskan kembali menggunakan spuilit ukuran 5 ml hingga menjadi suspensi halus. Suspensi halus kemudian dimasukkan ke dalam tube ukuran 15 ml dan ditambahkan dengan HBSS sebanyak 3 ml. Setelah itu sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 10 menit. Hasil sentrifugasi

tersebut kemudian dibuang supernatannya, dan diresentrifugasi dengan menambahkan HBSS sebanyak 3 ml.

Pelet hasil dari proses resentrifugasi selanjutnya dicuci (washing) dengan 2 ml media DMEM 0%, dan disentrifugasi dengan menggunakan kecepatan 3.500 rpm selama 10 menit. Setelah itu pelet dipisahkan dengan supernatnya dan pellet dicampur dengan media DMEM 0% sebanyak 1 ml. Suspensi sel yang telah terbentuk kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Suspensi sel yang telah homogen selanjutnya dihitung konsentrasinya menggunakan heamocytometer. Konsentrasi sel pankreas yang digunakan untuk kepentingan penelitian ini adalah sebesar 2×10^6 sel/mL.

3.5.8 Induksi Streptozotocin

Sel pankreas dengan konsentrasi 2×10^6 sel/mL diinokulasikan ke dalam masing-masing TC dish yang telah berisi media (DMEM 10%). Kultur sel kemudian diinduksi dengan streptozotocin sebesar 5 mM, streptozotocin yang diinduksikan sebelumnya telah dilarutkan dalam buffer sitrat (asam sitrat 0.1 M dan trisodium sitrat 0.1M dengan pH 4.5) (Ganugula *et al*, 2017). Kultur sel yang telah diinduksi streptozotocin selanjutnya diinkubasi dengan menggunakan suhu 37 °C, dan kadar CO₂ sebesar 5% selama 24 jam (Nahdi *et al*, 2020).

3.5.9 Pemberian Nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica*)

Kultur sel yang telah diinkubasi dengan streptozotocin selama 24 jam selanjutnya diberi nanopartikel pegagan tersalut kitosan dengan berbagai dosis (20 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM, dan 100 µM). Nanopartikel pegagan yang diberikan ke kultur sel sebelumnya telah disuspensikan dengan menggunakan DMSO (*dimethyl sulfoxide*) 1%. Kultur sel yang telah diberi nanopartikel pegagan kemudian diinkubasi dengan menggunakan suhu 37 °C, dan kadar CO₂ 5%.

3.5.10 Pengamatan Konfluenitas Sel

Pengamatan konfluenitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan mikroskop *inverted* (Nikon Eclipse, Jepang). Pengamatan dilakukan setiap 3 hari sekali selama 1 minggu. Data konfluenitas berupa persebaran sel pada

permukaan substrat media kemudian difoto, dan dianalisis persentase persebarannya. Perhitungan persebaran sel (konfluenitas) pada penelitian ini dilakukan secara langsung dengan menggunakan pengamatan di bawah mikroskop inverted perbesaran 200 $\times$. Data konfluenitas yang didapat kemudian dicatat, dan dianalisis lanjut dengan menggunakan aplikasi SPSS versi 25.

3.5.11 Perhitungan Viabilitas Sel

Perhitungan viabilitas sel pankreas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan *automatic cell count* (countes). Perhitungan viabilitas sel pada penelitian ini dilakukan pada hari ke 7 (hari terakhir). Adapun langkah perhitungan viabilitas sel pada penelitian ini dilaksanakan berdasarkan protokol yang telah dimodifikasi dari Lojk *et al* (2014) dan Larson *et al* (2014). Langkah pertama yang dilakukan dalam perhitungan viabilitas sel adalah mengisolasi sel dari media substrat pertumbuhannya. Proses isolasi atau pemisahan sel dari substrat dilakukan dengan menggunakan tripsin-EDTA 0,25%. Sampel kultur sel terlebih dahulu dicuci (washing) dengan menggunakan 1ml HBSS sebanyak 1 kali. Setelah itu kultur sel diinkubasi dengan tripsin-EDTA 0,25% selama 5 menit pada suhu 37 °C dengan konsentrasi CO₂ sebesar 5%. Kemudian, tripsin-EDTA dibuang dan ditambahkan 1 ml DMEM 10% ke dalam sampel kultur sel untuk menonaktifkan tripsin-EDTA yang tersisa. Selanjutnya, diambil 10 μ l sampel kultur sel untuk dihomogenkan dengan 10 μ l *trypan blue* 0,4%. Proses homogenasi sampel kultur dengan *trypan blue* dilakukan dengan menggunakan teknik pipeting manual. Sampel kultur sel yang telah dihomogenkan selanjutnya dimasukkan ke dalam *hemocytometer single use* dan setelah itu dilakukan perhitungan viabilitas secara otomatis menggunakan *automatic cell count* (tipe). Data yang didapatkan berupa perbandingan persentase (%) sel hidup dan sel yang mati kemudian dicatat dan dianalisis lanjut dengan menggunakan aplikasi SPSS versi 25.

3.5.12 Uji Kadar Insulin

Langkah pengujian kadar insulin pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode *peridinin-chlorophyll protein complex* (PerCP) – *Flow*

cytometry, berdasarkan langkah kerja yang dikutip dan dimodifikasi dari Goertz *et al* (2016). Langkah pertama yang dilakukan adalah mengisolasi sel dari media pertumbuhannya. Proses isolasi sel yang dilakukan pada tahapan ini serupa dengan proses isolasi sel yang dilakukan untuk kepentingan pengambilan data viabilitas sel. Kultur sel yang telah dicuci (*washing*) dan telah ditripsinasi selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Pelet hasil sentrifugasi selanjutnya dicuci (*washing*) dengan menggunakan 1 ml HBSS (*Hank's buffer salt solution*) sebanyak 2 kali.

Pelet yang telah dicuci (*washing*) selanjutnya diinkubasi dengan menggunakan 50 µl antibodi (*Mouse monoclonal insulin antibody*). Proses inkubasi antibodi dilakukan dengan suhu 4°C selama 20 menit. Selesai inkubasi pellet dicuci (*washing*) dengan menggunakan 400µl PBS (*phosphate buffer saline*). Setelah itu, pelet difiksasi dengan 50 µl larutan fixatif Biolegend (cat#420801). Proses inkubasi larutan fixatif dilakukan dengan suhu 4°C selama 20 menit. Setelah difiksasi, pelet kemudian dicampur dengan larutan permeabilitas (*intracellular staining permeability buffer*) dan disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit pada suhu 10 °C.

Pelet yang didapatkan selanjutnya diinkubasi dengan menggunakan 50 µl antibodi (*Fluorescent conjugated antibody*) selama 20 menit pada suhu 4°C. Setelah diinkubasi, pelet kemudian dianalisis dengan menggunakan alat *flowcytometry* (BD FACSCalibur Biosciences, USA). Data kadar insulin yang didapat selanjutnya diinput melalui *computer-device* dan *output* data yang dihasilkan berupa diagram kuantitatif kadar insulin.

3.6 Analisis Data

Data konfluenitas, dan viabilitas kultur sel pankreas pada penelitian ini masing-masing dianalisis menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan signifikansi sebesar 5%, sedangkan data kadar insulin kultur sel pankreas dianalisis secara deskriptif kualitatif. Langkah-langkah dalam analisa uji ANOVA (*Analysis of Variance*) pada penelitian ini adalah; pertama dengan menguji normalitas data, kedua dengan menguji homogenitas data, dan ketiga

dengan melakukan uji lanjut. Penentuan uji lanjut pada penelitian ini dilihat dari nilai KK (koefisien keragaman) hasil uji ANOVA (*Analysis of Variance*) yang didapatkan, serta penentuan uji lanjutnya dari KK (koefisien keragaman) dilakukan berdasarkan asumsi Hanafia (2016).

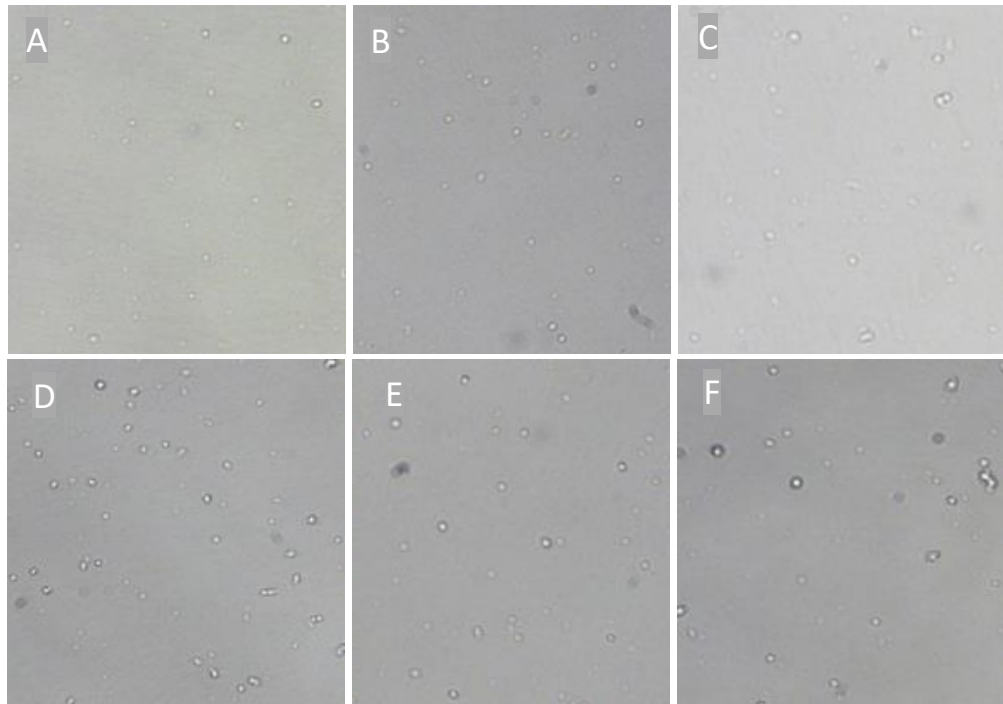
Menurut Hanafiah (2016) menyatakan bahawa apabila nilai KK (pada data homogen lebih besar dari 10%, serta pada data heterogen lebih besar dari 20%) maka uji lanjut yang digunakan adalah DMRT (*duncan's multiple range test*). Apabila nilai KK (pada data homogen sebesar 5-10%, serta pada data heterogen lebih besar dari 10-20%) maka uji lanjut yang digunakan adalah BNT (Beda Nyata Terkecil). Apabila nilai KK (pada data homogen lebih kecil dari 5%, serta pada data heterogen lebih kecil dari 10%) maka uji lanjut yang digunakan adalah BNJ (Beda Nyata Jujur).

Analisis deskriptif kualitatif data kadar insulin dilakukan dengan menggambarkan kadar insulin kultur sel kultur pada tabel histogram FCM (*flowcytometry*). Tabel FCM tersebut selanjutnya diringkas dan dibuat menjadi grafik secara keseluruhan. Fungsi grafik sendiri digunakan untuk memudahkan pembaca untuk mengetahui data yang disajikan (winartha, 2010).

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica. L*) Tersalut Kitosan Terhadap Konfluenitas Sel Pankreas Tikus (*Rattus norvegicus*) Secara In Vitro

Data konfluenitas kultur sel pankreas tikus pada penelitian ini diambil pada hari ke 7 setelah proses penanaman sel primer ke media DMEM. Tujuan diambilnya data tentang konfluenitas pada penelitian ini adalah untuk mengetahui perkembangan dan pertumbuhan sel dalam media DMEM. Konfluenitas kultur sel ditandai dengan menempel atau melekatnya sel pada medianya (Freshney, 2000). Persentase penempelan sel pada media tersebutlah yang selanjutnya diambil dan digunakan pada penelitian ini. Adapun gambaran konfluenitas kultur sel yang didapatkan dari hasil pengamatan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 4.1 Pengaruh nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica.L*) tersalut kitosan terhadap konfluenitas sel pankreas tikus yang diinduksi streptozotocin pada hari ke 7 dengan perbesaran mikroskop 200×; (A) konsentrasi nanopartikel 0μM, (B) konsentrasi nanopartikel 20μM, (C) konsentrasi nanopartikel 40μM, (D) konsentrasi nanopartikel 60μM, (E) konsentrasi nanopartikel 80μM, (F) konsentrasi nanopartikel 100μM

Hasil pengamatan konfluenitas pada gambar 4.1 menunjukkan bahwa kultur sel pankreas tikus memiliki konfluenitas yang berbeda-beda dan belum sepenuhnya menempel pada seluruh area substrat medianya. Hal tersebut dipengaruhi oleh streptozotocin yang diinduksikan ke kultur sel pankreas pada penelitian ini. Menurut Nahdi *et al* (2017) dan Lenzen (2008) dikatakan bahwa streptozotocin yang diinduksikan ke dalam kultur sel pankreas akan mempengaruhi kemampuan pertumbuhan dan perkembangan sel tersebut. Hal tersebut disebabkan oleh adanya efek stress oksidatif yang ditimbulkan akibat dari induksi streptozotocin. Selain itu menurut Saini *et al* (1996) dikatakan bahwa induksi streptozotocin pada kultur sel pankreas dapat memicu kegagalan dan kerusakan pada sintesis proinsulin, sehingga kerusakan tersebut dapat menimbulkan kondisi malfungsi produksi insulin pada sel pankreas khususnya pada sel beta pankreas.

Malfungsi atau kegagalan proses produksi insulin tersebutlah yang berpengaruh besar terhadap timbulnya penyakit diabetes militus, dan salah satu paramater yang menandakan timbulnya penyakit diabetes militus pada kultur sel pankreas adalah penurunan konfluenitas selnya. Pada penelitian ini terlihat bahwa hasil konfluenitas yang didapatkan sesuai dengan konsep permodelan penyakit diabetes militus secara *in vitro*. Permodelan penyakit diabetes militus pada kultur sel pankreas pada penelitian ini merujuk kepada penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya oleh Nahdi *et al* (2017).

Pemberian nanopartikel pegagan (*Centella asiatica*.L) tersalut kitosan pada penelitian ini juga terlihat berpengaruh terhadap peningkatan konfluenitas pada kultur sel pankreas. Hal tersebut sebagaimana terlihat pada ringkasan *one way* Anova tabel 4.1 bahwasanya nilai F hitung yang didapatkan adalah sebesar 48,4536 dan lebih besar dari nilai F tabel 5% (2,63999). Berdasarkan perhitungan *one way* Anova dapat diketahui bahwa H_0 ditolak dan H_1 diterima sehingga dapat diartikan pemberian nanopartikel pegagan (*Centella asiatica*.L) tersalut kitosan berpengaruh terhadap konfluenitas sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi streptozotocin. Selain itu, berdasarkan uji

normalitas dan homogenitas yang dilakukan sebelumnya dengan nilai sig. 5% (0,05) didapatkan bahwa data konfluenitas pada penelitian ini memiliki distribusi yang normal dan homogen. Adapun nilai normalitas dan homogenitas data konfluenitas yang didapatkan berturut-turut adalah sebesar 0,11 dan 0,426 (lampiran 1). Maka dengan nilai tersebut terpenuhi syarat analisis *One Way Anova* untuk data konfluenitas pada penelitian ini.

Tabel 4.1.1 Ringkasan Anova mengenai pengaruh nanopartikel pegagan (*Centella asiatica.L*) tersalut kitosan terhadap konfluenitas sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi streptozotocin.

SK	Db	JK	KT	F Hitung	F Tabel
Perlakuan	5	1310,21	217,37	48,4536	2,63999
Galat	18	80,75	4,49		
Total	23	1390,96			

Penentuan uji lanjut (*post hoc test*) dari data konfluenitas sel merujuk kepada nilai KK (koefisien keragaman) yang didapatkan dari perhitungan statistik (lampiran 1). Adapun nilai KK yang didapatkan dari perhitungan statistik adalah sebesar 31,901%. Maka berdasarkan nilai KK tersebut uji lanjut yang sesuai untuk data konfluenitas adalah Duncan. Hal tersebut sesuai sebagaimana yang diuraikan oleh Hanafiah (2016) bahwasanya apabila nilai perhitungan KK besar, maka uji lanjut yang sesuai dilakukan adalah duncan.

Hasil uji lanjut Duncan (lampiran 1) menunjukkan bahwa pemberian nanopartikel pegagan (*Centella asiatica.L*) tersalut kitosan dengan berbagai konsentrasi pada kultur sel pankreas berdampak secara nyata terhadap peningkatan konfluenitas kultur selnya. Hal tersebut tampak pada perbandingan nilai rata-rata perlakuan (P2, P3, P4, P5, dan P6) dengan nilai rata-rata perlakuan kontrol yang diberikan (P1) (tabel 4.1.2). Hal ini dapat diartikan bahwa pemberian nanopartikel pegagan (*Centella asiatica.L*) tersalut kitosan dengan berbagai konsentrasi dapat memicu konfluenitas kultur sel pankreas dalam penelitian ini.

Perlakuan dengan konsentrasi 80 μM (P5) dan 60 μM (P4) pada penelitian ini berturut-turut menduduki tingkat tertinggi dalam mempengaruhi konfluenitas kultur sel pankreas, adapun nilai rata-rata konfluenitas dari perlakuan tersebut berturut-turut adalah sebesar 27,50% dan 31,25%. Selain perlakuan P5 (80 μM) dan P4 (60 μM), terdapat juga perlakuan P2 (20 μM), P3 (40 μM), dan P6 (100 μM) yang berdampak nyata terhadap konfluenitas kultur sel pankreas. Namun perlakuan P2 (20 μM) memiliki nilai konfluenitas yang rendah, sedangkan perlakuan P3 (40 μM) dan P6 (100 μM) memiliki nilai konfluenitas yang hampir sama. Sehingga dapat diartikan bahwa pemberian nanopartikel yang paling berdampak terhadap peningkatan konfluenitas kultur sel pankreas pada penelitian ini berturut-turut adalah perlakuan P5 (80 μM) dan P4 (60 μM)

Tabel 4.1.2 Ringkasan hasil uji lanjut Duncan dengan sig. 5% (0.05) mengenai pengaruh nanopartikel pegagan (*Centella asiatica.L*) tersalut kitosan terhadap konfluenitas sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi streptozotocin.

Perlakuan	Rata-Rata (%)	Notasi (5 %)
P1 (0 μM)	9,75	a
P2 (20 μM)	17,50	b
P6 (100 μM)	21,17	c
P3 (40 μM)	23,75	c
P5 (80 μM)	27,50	d
P4 (60 μM)	31,25	e

Keterangan: Huruf yang sama menandakan tidak berbeda nyata pada taraf sig. 5% (0,05)

Ditinjau berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa nanopartikel pegagan (*Centella asiatica L*) tersalut kitosan mampu meningkatkan konfluenitas kultur sel pankreas tikus yang telah diinduksi streptozotocin. Kemampuan yang dimiliki nanopartikel pegagan tersebut tidak terlepas dari senyawa yang terkandung dalamnya. Winarto & Surbakti (2003) pernah melaporkan bahwa pegagan (*Centella asiatica. L*) memiliki beberapa senyawa

bioaktif seperti terpenoid saponin, flavonoid, dan terpenoid genin. Senyawa-senyawa tersebut secara luas memiliki banyak manfaat diantaranya adalah sebagai antioksidan dan memperbaiki kerusakan selular. Selain itu Liu et al (2018) dan Oyenih, Ahiente *et al* (2020) juga melaporkan bahwa senyawa terpen pegagan (*Centella asiatica*. L) dapat mengerungi efek stres oksidatif yang diakibatkan oleh streptozotocin dengan cara menekan produksi superoksida pada mitokondria.

Kandungan terpenoid saponin pegagan (*Centella asiatica*. L) diketahui juga memiliki kemampuan sebagai promotor ekspresi dan aktivasi potein GLUT4 (*glucose transporter 4*) (Fizur *et al*, 2018). GLUT4 sendiri merupakan protein yang berperan penting dalam mengatur transportasi glukosa ekstraseluler menuju membran-membran sel (Alam & Gan, 2016). Semakin banyak GLUT4 yang terekspresi dan teraktivasi, maka metabolisme sel yang berjalan akan semakin optimal. Metabolisme sel yang berjalan optimal tersebutlah yang akhirnya dapat memicu proliferasi dan pembelahan sel lebih cepat (Kurniasari *et al*, 2015). Indikator kultur sel yang telah berproliferasi secara umum dapat diketahui dari penjurannya (*spreading*) pada substrat media pertumbuhan. Penjururan (*spreading*) sel pada substrat media pertumbuhan tersebut seringkali dikenal dengan konfluenitas sel (Khumairoh & Puspitasari, 2016). Oleh karena itu dengan pemberian nanopartikel pegagan (*Centella asiatica*. L) tersalut kitosan pada kultur sel pankreas mampu memicu konfluenitas selnya.

Nanopartikel kitosan yang menyalut nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica*. L) pada penelitian ini diketahui juga berperan dalam meningkatkan konfluenitas kultur sel pankreas. Hal tersebut sebagaimana dilaporkan oleh Tiyafoonchai (2003) bahwasanya kitosan memiliki peran yang penting untuk penghantaran obat atau suatu senyawa bioaktif. Selain itu kitosan diketahui memiliki kemampuan biokompatibilitas dan biodegradabilitas yang baik, sehingga dengan kemampuan tersebut kitosan dapat dikatakan sesuai untuk digunakan sebagai penyalut nanopartikel pegagan pada penelitian ini.

Kemampuan nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica*. L) tersalur kitosan dalam meningkatkan konfluenitas kultur sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) pada penelitian ini dapat dikatakan sesuai sebagaimana konsep pengobatan yang dibutuhkan untuk penyakit diabetes militus. Pada dasarnya timbulnya penyakit diabetes militus secara klinis dipicu oleh adanya destruksi pada sel pankreas, terutama pada sel beta pankreas (Smeltzer & Bare, 2015). Berdasarkan kemampuan nanopartikel yang telah diuraikan maka sel pankreas dapat dipulihkan dan dikembalikan fungsi kerjanya. Konsep kesesuaian Konsep kesesuaian obat terhadap penyakit dalam kaidah sains selaras dengan sabda Nabi Muhammad SAW dalam H.R Muslim nomor 4084. Nabi Muhammad SAW bersabda bahwa:

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

“Setiap penyakit pasti ada obatnya, apabila penyakit tersebut telah bertemu dengan obatnya maka penyakit itu akan sembuh dengan seizin Allah, tuhan yang maha perkasa lagi maha agung” (H.R Muslim nomor 4084).

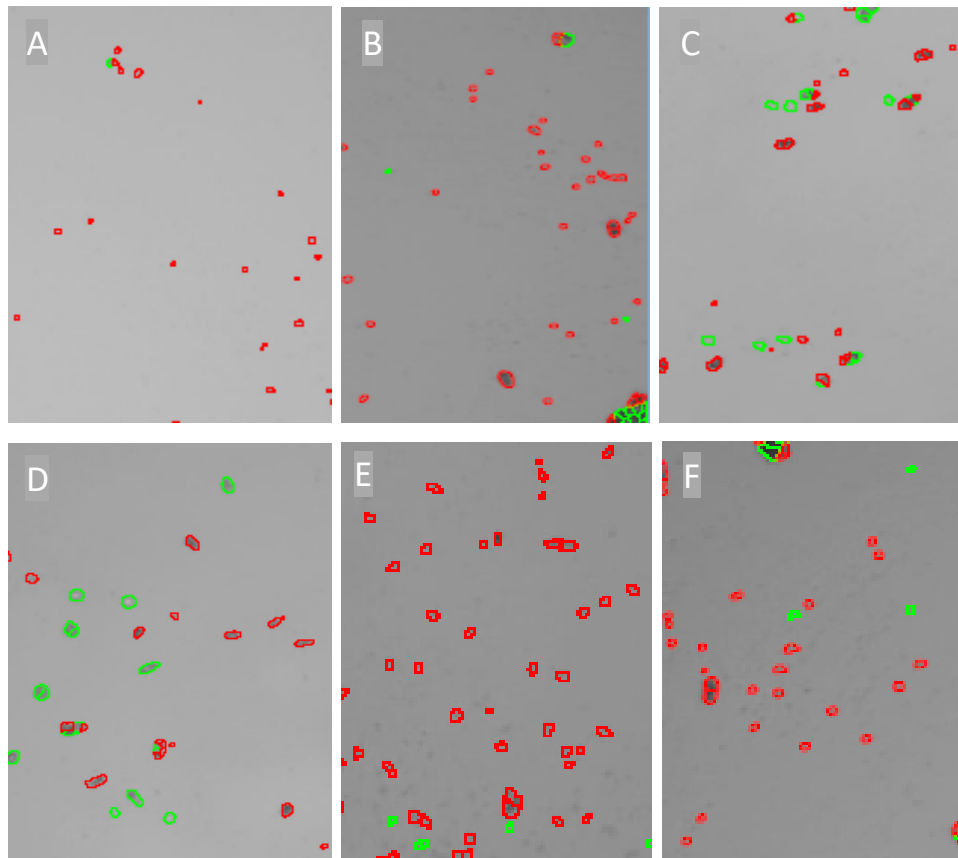
Menurut Abdurrahman Ali Bassam (2002) bahwa hikmah yang dapat diambil berdasarkan sabda Nabi Muhammad SAW dalam H.R Bukhori nomor 4084 tersebut adalah manusia perlu mengupayakan pencarian obat sebagai perantara kesembuhan dari penyakit yang dideritanya. Sebab setiap keberadaan suatu penyakit telah terdapat penawar atau obatnya juga, seperti halnya penyakit diabetes militus. Hal tersebut sebagaimana disabdakan oleh Nabi Muhammad SAW dalam H.R Bukhori nomor 5678. Sabda Nabi Muhammad SAW dalam H.R Bukhori nomor 5678 adalah sebagai berikut:

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

“Tidaklah Allah menurunkan penyakit kecuali dia turunkan untuk penyakit itu obatnya” (H.R Bukhori nomor 5678)

4.2 Pengaruh Nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica. L*) Tersalut Kitosan Terhadap Viabilitas Sel Pankreas Tikus (*Rattus norvegicus*) Secara In Vitro

Data viabilitas kultur sel pankreas tikus pada penelitian ini diambil pada hari ke 7 setelah proses penanaman sel primer ke media DMEM. Viabilitas sel sendiri merupakan salah satu indikator yang dapat digunakan untuk mengetahui kemampuan sel dalam bertahan hidup secara *in vitro* (Shokrzadeh and Mona, 2017). Maka dilakukannya uji viabilitas sel pada penelitian ini adalah untuk mengetahui presentase sel pankreas yang bertahan hidup (viable) setelah pemberian perlakuan induksi streptozotocin dan nanopartikel pegagan secara *in vitro*.



Gambar 4.2 Pengaruh nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica.L*) tersalut kitosan terhadap viabilitas sel pankreas tikus yang diinduksi streptozotocin pada hari ke 7 dihitung dengan *Countess*; (A) konsentrasi nanopartikel 0µM, (B) konsentrasi nanopartikel 20µM, (C) konsentrasi nanopartikel 40µM, (D) konsentrasi nanopartikel 60µM, (E) konsentrasi nanopartikel 80µM, (F) konsentrasi nanopartikel 100µM.

Data viabilitas pada penelitian ini dihitung secara otomatis dengan menggunakan *Cell Counter (Countess)*. Adapun sel yang hidup pada gambar 4.2 tersebut ditandai dengan warna hijau, sedangkan sel yang tidak hidup (mati) ditandai dengan warna merah. Untuk mengetahui pengaruh nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica. L*) yang telah diberikan ke kultur sel, maka data viabilitas sel yang didapat terlebih dahulu diuji normalitas dan homogenitasnya agar dapat menentukan jenis analisis yang akan dilakukan

Hasil uji normalitas dan homogenitas dari data viabilitas sel pada penelitian ini menunjukkan bahwa data viabilitas sel yang didapat memiliki distribusi yang normal dan homogen. Hal tersebut diketahui dari nilai normalitas dan homogenitas yang didapat dengan sig 5% (0,05), adapun nilai yang didapat berturut-turut sebesar 0,176 dan 0,05 (lampiran 2). Maka berdasarkan nilai tersebut, data viabilitas sel pada penelitian ini memenuhi syarat untuk dianalisis dengan menggunakan *One Way Anova*.

Berdasarkan analisis *One Way Anova* dari data viabilitas pada tabel 4.2.2 diketahui bahwa F hitung (46,73) yang didapat memiliki nilai lebih besar dari pada F tabelnya (2,64). Maka dari hasil yang didapat dapat ditarik asumsi bahwa H_0 pada penelitian ini ditolak, sedangkan H_1 diterima. Sehingga asumsi tersebut dapat diartikan bahwa pemberian nanopartikel pegagan (*Centella asiatica.L*) tersulut kitosan berpengaruh terhadap konfluenitas sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi streptozotocin.

Tabel 4.2.1 Ringkasan Anova mengenai pengaruh nanopartikel pegagan (*Centella asiatica.L*) tersulut kitosan terhadap viabilitas sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi streptozotocin.

SK	Db	JK	KT	F Hitung	F Tabel
Perlakuan	5	3300,3	549,06	46,72813	2,63999
Galat	18	211,5	11,75		
Total	23	3511,83			

Ditinjau dari hasil analisis Anova maka dapat diketahui bahwa uji lanjut (*post hoc test*) data viabilitas pada penelitian ini perlu dilakukan. Penentuan

jenis uji lanjut dari data viabilitas sel pada penelitian ini merujuk kepada nilai KK (koefisien keragaman) yang telah didapat dari perhitungan statistik(lampiran 2). Adapun nilai KK yang didapatkan adalah sebesar 30,213%, maka berdasarkan nilai KK tersebut uji lanjut yang sesuai untuk data konfluenitas adalah uji lanjut Duncan. Hal tersebut sesuai sebagaimana yang diuraikan oleh Hanafiah (2016) bahwasanya apabila nilai perhitungan KK besar, maka uji lanjut yang sesuai dilakukan adalah duncan.

Hasil uji lanjut Duncan (lampiran 2) menunjukkan bahwa pemberian nanopartikel pegagan (*Centella asiatica.L*) tersalut kitosan dengan berbagai konsentrasi pada kultur sel pankreas berdampak secara nyata terhadap peningkatan viabilitas kultur selnya. Hal tersebut tampak pada perbandingan nilai rata-rata perlakuan (P2, P3, P4, P5, dan P6) dengan nilai rata-rata perlakuan kontrol yang diberikan (P1) (tabel 4.2.2). Hal ini dapat diartikan bahwa pemberian nanopartikel pegagan (*Centella asiatica.L*) tersalut kitosan dengan berbagai konsentrasi dapat meningkatkan kemampuan viabilitas pada kultur sel pankreas.

Tabel 4.2.2 Ringkasan hasil uji lanjut Duncan dengan sig. 5% (0.05) mengenai pengaruh nanopartikel pegagan (*Centella asiatica.L*) tersalut kitosan terhadap viabilitas sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi streptozotocin.

Perlakuan	Rata-Rata (%)	Notasi (5 %)
P1 (0 μ M)	5,25	a
P6 (100 μ M)	12,5	b
P5 (80 μ M)	15,5	c
P2 (20 μ M)	18,25	c
P3 (40 μ M)	33	d
P4 (60 μ M)	39	e

Keterangan: Huruf yang sama menandakan tidak berbeda nyata pada taraf sig. 5% (0,05)

Secara ringkas hasil uji Duncan tampak pada tabel 4.2.2, pada tabel tersebut dapat diketahui bahwa perlakuan 60 μ M (P3) dan 80 μ M (P4) memiliki pengaruh paling tinggi terhadap viabilitas kultur sel pankreas. Adapun nilai rata-rata viabilitas dari perlakuan 60 μ M (P3) dan 80 μ M (P4) tersebut

berturut-turut sebesar 33% dan 39%. Sedangkan perlakuan yang mempengaruhi viabilitas sel paling rendah adalah perlakuan 100 μ M (P6), adapun nilai viabilitasnya adalah sebesar 12,5%. Selain itu juga terdapat perlakuan 80 μ M (P5) dan 40 μ M (P2) yang memiliki pengaruh serupa (tidak beda nyata) terhadap viabilitas kultur sel pankreas, sehingga kedua perlakuan tersebut memiliki notasi yang sama pada tabel ringkasan uji Duncan (tabel 4.2.2). Adapun nilai viabilitas sel dari perlakuan 80 μ M (P5) dan 40 μ M (P2) berturut-turut adalah sebesar 15,5% dan 18,25%.

Kehidupan dan kematian sel secara fisiologis disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya adalah faktor media pertumbuhan dan perlakuan yang diberikan. Media pertumbuhan kultur sel merupakan salah satu faktor penting dalam menunjang kehidupan kultur sel. Adapun media pertumbuhan yang digunakan pada penelitian ini adalah berupa DMEM (dulbecco's modified eagle *medium*). Diketahui menurut laporan yang disampaikan oleh Gaglione *et al* (2016) bahwasanya DMEM sesuai digunakan untuk kultur sel pankreas.

Perlakuan induksi STZ (streptozotocin) pada kultur sel pankreas diketahui juga dapat mempengaruhi viabilitas kultur selnya. Hal tersebut terlihat dari data viabilitas sel penelitian ini rata-rata menunjukkan nilai yang rendah. Nahdi *et al* (2017) dan Lenzen (2008) melaporkan bahwa penggunaan STZ secara *in vitro* dapat memberikan dampak yang nyata terhadap kerusakan sel kultur. Kerusakan sel kultur tersebut tampak pada aktivitas apoptosis dan nekrosis yang meningkat ketika sel kultur diinduksi dengan STZ. Kemampuan STZ dalam meningkatkan aktivitas apoptosis dan nekrosis sel tersebutlah yang kemudian menjadi penyebab turunnya nilai viabilitas kultur sel pankreas pada penelitian ini.

Pemberian nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica*. L) tersalur kitosan kepada kultur sel pankreas diketahui juga mampu memberikan pengaruh terhadap viabilitas kultur selnya. Berdasarkan laporan Fizur *et al* (2018) diketahui bahwa Pegagan (*Centella asiatica*. L) memiliki kemampuan sebagai promotor reseptor PPAR $_{\gamma}$ (*Peroxisome Poliferator Resceptor-Gamma*).

Reseptor PPAR γ sendiri memiliki peran sebagai regulator fungsi mitokondria, meliputi metabolisme energi, poliferasi dan diferensiasi selular (Bermudez et al., 2010; Setyawati, 2014). Sehingga dengan kemampuan tersebut, pegagan dapat dikatakan memiliki potensi tinggi untuk mengembalikan regenerasi serta fungsi sel pankreas. Regenerasi serta fungsi sel pankreas yang kembali normal tersebutlah yang kemudian menunjang kultur sel pankreas untuk hidup (*viable*)

Pemanfaatan nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica*. L) tersalur kitosan untuk pengobatan diabetes militus pada penelitian ini secara tersirat dilandasi oleh firman Allah SWT dan sunnah yang pernah dicontohkan oleh Nabi Muhammad. Pemanfaatan tumbuhan untuk pengobatan juga telah lama dikenal dalam islam. Menurut Ar-Rumaikhon (2008) Beberapa tumbuhan yang pernah digunakan oleh Nabi Muhammad SAW sebagai media pengobatannya diantaranya adalah jinten hitam, Jahe, Zaitun, Kurma dan Delima. Maka hikmah yang dapat diambil dari metode pengobatan yang dicontohkan oleh Nabi Muhammad SAW adalah manusia perlu memanfaatkan secara bijak dan optimal tumbuhan-tumbuhan yang telah diciptakan oleh Allah SWT. Khususnya pemanfaatan tumbuhan untuk pengobatan dan kesehatan bagi manusia.

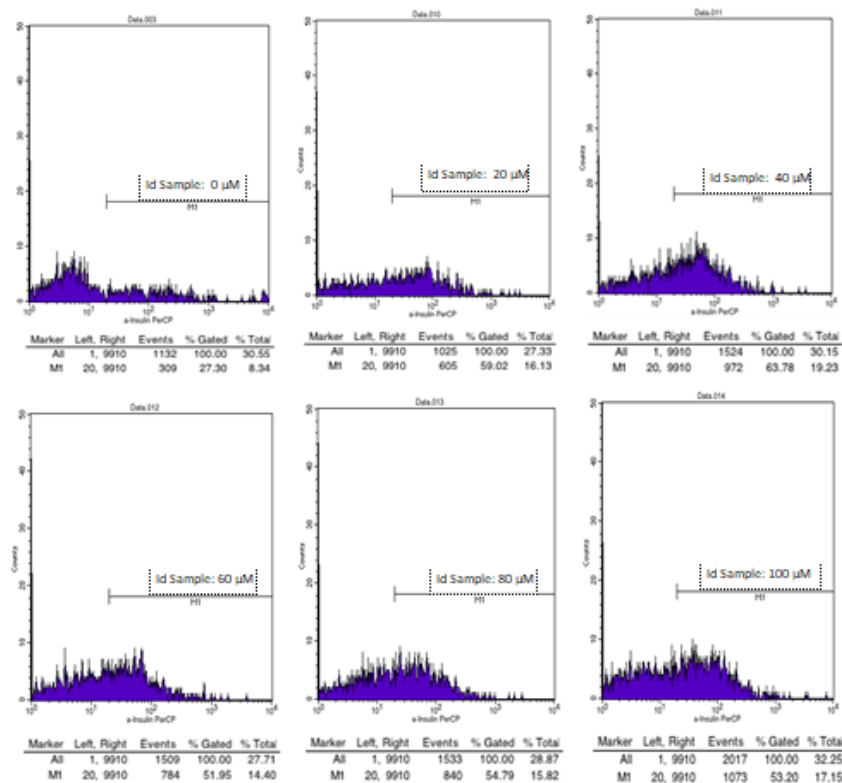
Allah SWT secara tersirat dalam beberapa Surat Al-Qur'an juga telah banyak berfirman mengenai tumbuh-tumbuhan yang memiliki manfaat baik bagi manusia dan dapat dimanfaatkan oleh manusia (Ar-Rumaikhon, 2008). Salah satunya ada dalam Q. S An-Nahl ayat 11, adapun firman Allah SWT dalam Q. S An-Nahl ayat 11 adalah sebagai berikut:

يُنْثَبُ لَكُمْ بِهِ الرِّزْقَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِنْ كُلِّ الشَّجَرِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ
يَتَفَكَّرُونَ ﴿١١﴾ (النحل / 11:16)

“Dengan (air hujan) itu Dia menumbuhkan untuk kamu tanam-tanaman, zaitun, kurma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sungguh, pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berpikir” (النحل / 11:16).

4.3 Pengaruh Nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica. L*) Tersalut Kitosan Terhadap Kadar Insulin Sel Pankreas Tikus (*Rattus norvegicus*) Secara In Vitro

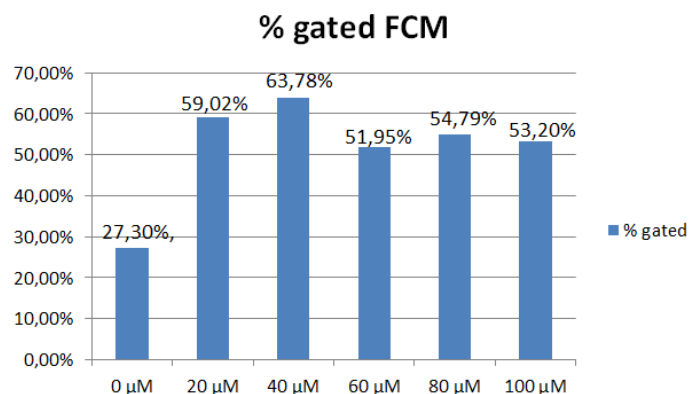
Data kadar insulin kultur sel pankreas tikus pada penelitian ini diambil pada hari ke 7 setelah proses penanaman sel primer ke media DMEM. Tujuan diambilnya data tentang kadar insulin pada penelitian ini adalah untuk mengevaluasi pengaruh pemberian nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica. L*) tersalut kitosan terhadap kadar insulin kultur sel pankreas tikus (*Rattus norvegicus*). Hani, Z, & Sarsaifi (2016) pada penelitiannya melaporkan bahwa evaluasi kadar insulin pada sel pankreas merupakan salah satu hal yang penting untuk dilakukan. Sebab kadar insulin sendiri merupakan salah satu indikator untuk mengetahui aktivitas metabolisme yang terjadi pada kultur sel pankreas. Adapun hasil kadar insulin kultur sel pankreas tikus yang didapatkan pada penelitian ini ditampilkan pada gambar berikut:



Gambar 4.3.1 Profil Kadar Insulin Kultur Sel Pankreas Tikus Id sampel; 0 μM , 20 μM , 40 μM , 60 μM , 80 μM , dan 100 μM yang dievaluasi dengan menggunakan uji

flowcytometry (FCM). Kadar insulin sampel ditunjukkan pada %gated M1 tabel relatifitas histogram a-insulin PerCP. Secara berturut-turut kadar insulin sampel yang didapatkan adalah sebagai berikut; 27.30%, 59.02%, 63.78%, 51.95%, 54.79%, dan 53.20%.

Ditinjau dari hasil uji FCM dapat diketahui bahwa perlakuan pemberian nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica*. L) tersalut kitosan berdampak nyata terhadap peningkatan kadar insulin kultur sel pankreas tikus yang diinduksi STZ (streptozotocin). Hal tersebut dapat diketahui dari perbandingan antara nilai gated M1 sampel kontrol (0 μ M) dengan nilai gated M1 sampel berbagai konsentrasi (20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M, dan 100 μ M). Adapun nilai gate M1 yang didapat dari sampel kontrol, sampel 20 μ M, sampel 40 μ M, sampel 60 μ M, sampel 80 μ M, dan sampel 100 μ M berturut-turut adalah sebesar 27,30%, 59,02%, 63,78%, 51,95%, 54,79%, dan 53,20% (Gambar 4.3.7) . Menurut Bio-Rad (2020) diketahui bahwa nilai gate M1 tersebut merupakan interpretasi dari insulin yang terdeteksi pada saat pengujian sampel sel.



Gambar 4.3.2 Grafik tabulasi data kadar insulin dari pengujian FCM (*flowcytometry*) ditunjukkan pada % gated FCM.

Hasil uji FCM yang memiliki nilai gate terendah pada penelitian ini diketahui didapatkan dari pengujian sampel 0 μ M, sedangkan nilai gate yang tertinggi diketahui didapatkan dari pengujian sampel 40 μ M. Berdasarkan hasil tersebut maka dapat diartikan bahwa perlakuan induksi STZ berdampak terhadap penurunan kadar insulin pada kultur sel pankreas tikus, sedangkan perlakuan pemberian nanopartikel pegagan (*Centella asiatica*. L) tersalut kitosan yang

paling berpengaruh terhadap peningkatan kultur sel pankreas tikus yang diinduksi STZ pada penelitian ini adalah perlakuan sample 40 mM.

Secara *in vitro*, menurut Nahdi *et al* (2017) penggunaan STZ untuk menginduksi diabetes militus pada sel pankreas dapat mempengaruhi langsung terhadap penurunan kadar NAD^+ pada intraseluler sel. Menurut laporan Elhassan *et al* (2017) NAD^+ sendiri dikenal sebagai kofaktor enzim oxidoreductase dan dehidrogenase yang memiliki peran penting terhadap proses metabolisme seluler dan produksi energi. Adanya penurunan NAD^+ tersebut yang kemudian memicu timbulnya gangguan metabolisme pada sel pankreas. Terutama memicu gangguan metabolisme seluler berupa kegagalan sintesis proinsulin pada sel beta pankreas. Kegagalan sintesis proinsulin secara berkepanjangan tersebutlah yang selanjutnya mengakibatkan penurunan kadar insulin pada sel pankreas.

Berdasarkan laporan lain yang disebutkan oleh Lenzen (2008) diketahui bahwasanya STZ mampu memberikan kerusakan kepada sel pankreas. Kerusakan tersebut dipicu oleh adanya efek stres oksidatif yang timbul akibat induksi STZ pada sel pankreas. Hal tersebut terbukti oleh adanya peningkatan aktivitas apoptosis dan nekrosis yang meningkat pada kultur sel pankreas ketika diinduksi dengan STZ (Nahdi *et al*, 2017), sehingga dengan adanya peningkatan apoptosis dan nekrosis tersebutlah yang akan mengakibatkan sel beta pankreas tidak mampu lagi untuk melakukan sintesis insulin. Ketidakmampuan sel beta pankreas dalam mensintesis insulin tersebut yang kemudian akan berujung dengan penurunan kadar insulin.

Pada penelitian ini nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica*. L) tersalut kitosan diketahui memiliki kemampuan untuk meningkatkan kadar insulin kultur sel pankreas tikus (*Rattus norvagicus*) yang diinduksi STZ. Kemampuan tersebut diketahui tidak terlepas dari peran senyawa bioaktif yang dimiliki oleh pegagan. Berdasarkan laporan Fizur *et al* (2018) senyawa bioaktif Pegagan (*Centella asiatica*. L) diketahui memiliki kemampuan sebagai promotor reseptor PPAR_γ (*Peroxisome Poliferator Resceptor-Gamma*). Reseptor PPAR_γ sendiri diketahui memiliki peran penting sebagai regulator fungsi mitokondria yang meliputi

metabolisme energi, poliferasi dan diferensiasi selular (Bermudez *et al.*, 2010; Setyawati, 2014).

Kandungan titerpenoid saponin dari pegagan (*Centella asiatica*. L) diketahui juga memiliki kemampuan sebagai promotor ekspresi dan aktivasi protein GLUT4 (*glucose transporter 4*) (Fizur *et al*, 2018). GLUT4 sendiri merupakan protein yang berperan penting dalam mengatur transportasi glukosa ekstraseluler menuju membran-membran sel (Fahmida *et al*, 2016). Semakin banyak GLUT4 yang terekspresi dan teraktivasi, maka metabolisme sel yang berjalan akan semakin optimal. Metabolisme sel yang berjalan optimal tersebutlah yang akhirnya dapat memicu poliferasi dan pembelahan sel lebih cepat (Kurniasari *et al*, 2015).

Poliferasi dan regenerasi fungsi sel pankreas yang meningkat tersebut secara fisiologis akan berdampak terhadap peningkatan sintesis insulin pada sel beta pankreas. Efek stres oksidatif yang ditimbulkan oleh diabetes militus juga akan berangsur berkurang seiring dengan kembalinya fungsi mitokondria dalam mengatur metabolisme dalam sel (Wang & Wang, 2017). Fungsi mitokondria yang kembali pulih tersebutlah yang kemudian juga akan berdampak pada peningkatan sintesis insulin pada sel beta pankreas.

Berdasarkan hasil yang didapatkan dari uji FCM maka dapat disimpulkan bahwa nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica*. L) tersalur kitosan dapat dimanfaatkan sebagai kandidat obat penyakit diabetes militus. Secara tersirat pemanfaatan tumbuhan sebagai pengobatan telah banyak dicontohkan oleh Nabi Muhammad SAW dalam sunnahnya (*at-thibbun nabawi*). Hal tersebut sebagaimana disabdakan oleh Nabi Muhammad SAW dalam Hadis riwayat Abu Hurairah R.A nomor 5687, bahwasanya:

إِنَّ هَذِهِ الْحَبَّةَ السَّوْدَاءَ شِفَاءٌ مِنْ كُلِّ دَاءٍ، إِلَّا مِنَ السَّامِ

“*Sesungguhnya pada habbatussauda’ terdapat obat untuk segala macam penyakit, kecuali kematian*”.

Menurut Ar-Rumaikhon (2008) melaporkan bahwasanya Nabi Muhammad SAW juga pernah menggunakan tumbuhan lain untuk pengobatan. Selain jinten hitam, tumbuhan-tumbuhan yang pernah digunakan Nabi sebagai obat

diantaranya adalah Jahe, Zaitun, Kurma dan Delima. Maka hikmah yang dapat diambil dari sunnah Nabi Muhammad SAW tersebut adalah manusia perlu memanfaatkan secara bijak dan optimal tumbuhan-tumbuhan yang telah diciptakan oleh Allah SWT.

Keterangan mengenai banyaknya macam-macam tumbuhan yang memiliki manfaat dan kebaikan secara tersurat juga pernah difirmankan oleh Allah SWT dalam Q.S As-Syu'ara ayat 7-8. Allah SWT berfirman dalam Q.S As-Syu'ara ayat 7-8, sebagai berikut:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً وَمَا كَانَ أَكْثَرُهُمْ مُؤْمِنِينَ ﴿٨﴾ (الشعراء/26:7-8)

“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan (tumbuh-tumbuhan) yang baik?. Sungguh, pada yang demikian itu terdapat tanda (kebesaran Allah), tetapi kebanyakan mereka tidak beriman”. (Asy-Syu'ara'/26:7-8)

Menurut penjelsan Al-Qurthubi (2009) dalam tafsirnya Q.S As-Syu'ara ayat 7-8 memiliki makna bahwasanya Allah SWT telah menciptakan berbagai macam tumbuhan dengan kebaikan atau manfaatnya masing-masing. Kebaikan dan manfaat tumbuh-tumbuhan tersebutlah yang perlu diperhatikan oleh manusia. Adapun salah satu tumbuhan yang perlu diperhatikan kebaikan dan manfaatnya adalah Pegagan (*Centella asiatica*. L)

BAB V PENUTUP

5.1 KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

1. Ada pengaruh dari pemberian nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica*. L) tersalut kitosan tersalut terhadap konfluenitas kultur sel pankreas tikus yang diinduksi dengan STZ.
2. Ada pengaruh dari pemberian nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica*. L) tersalut kitosan tersalut terhadap viabilitas kultur sel pankreas tikus yang diinduksi dengan STZ.
3. Ada pengaruh dari pemberian nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica*. L) tersalut kitosan tersalut terhadap kadar insulin kultur sel pankreas tikus yang diinduksi dengan STZ.

5.2 SARAN

Saran dari penelitian ini adalah:

1. Perlu dilakukan penelitian mengenai konfirmasi senyawa bioaktif yang terdapat pada nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica*. L) tersalut kitosan.
2. Perlu dilakukan penelitian mengenai konfirmasi karakter fisikokimia dari senyawa bioaktif yang terdapat pada nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica*. L) tersalut kitosan.
3. Perlu dilakukan penelitian yang lebih spesifik mengenai dosis STZ yang optimal untuk memicu diabetes militus pada sel pankreas tikus secara *in vivo*.
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica*. L) tersalut kitosan terhadap toksisitasnya bagi sel pankreas tikus dan parametes lainnya.
5. Perlu dilakukan pengembangan penelitian lebih lanjut mengenai nanopartikel Pegagan (*Centella asiatica*. L) tersalut kitosan sebagai kandidat obat diabetes militus.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdurrahman Ali Bassam, A. 2002. *Syarah Hadits Pilihan Bukhari Muslim*. Jakarta: PT Darul Falah.
- Al-Qurthubi, I. 2009. *Tafsir Al-Qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azzam.
<https://doi.org/10.1111/bph.13816>
- Alam, F., & Gan, S. H. 2016. Metabolic Control of Type 2 Diabetes by Targeting the GLUT4 Glucose Transporter: Intervention Approaches. *Current Pharmaceutical Design*, 22, 3034–3049.
- Almaça, J. 2020. Beta cell dysfunction in diabetes : the islet microenvironment as an unusual suspect. *Diabetologia*, 63, 2076–2085.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00125-020-05186-5>
- Amoli, M. M., Moosavizadeh, R., & Larijani, B. 2005. Optimizing Conditions for Rat Pancreatic Islets Isolation Optimizing conditions for rat pancreatic islets isolation. *Cytotechnology*, 48(July), 75–78. <https://doi.org/10.1007/s10616-005-3586-5>
- Apte, M. V, Haber, P. S., Applegate, T. L., Norton, I. D., Mccaughan, G. W., Korsten, M. A., ... Wilson, J. S. 1998. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas : identification , isolation , and culture. *Gut*, 43, 128–133.
- Ar-Rumaikhon, A. bin S. 2008. *Al-ahkam wa al Fatawa asy-Syar'iyah li Kastir mina al-Masili ath-Thibbiyah*. (Al-Qowam, Ed.). Solo: Al-Qowam.
- Berbudi, A., Rahmadika, N., Tjahjadi, A. I., & Ruslami, R. 2020. Type 2 Diabetes and its Impact on the Immune System. *Current Diabetes Reviews*, 442–449.
<https://doi.org/10.2174/1573399815666191024085838>
- Bermudez, V., Finol, F., Parra, N., Parra, M., Pe, A., Pen, L., ... Edin, F. 2010. PPAR- g Agonists and Their Role in Type 2 Diabetes Mellitus Management. *American Journal of Therapeutics* 17, 17, 274–283.
- Calapai, G. 2012. Assessment report on Centella asiatica (L .) Urban , herba. *EMA (Eropean Medicine Agency)*, 44(November 2010).
- Calvo, P., Alonso, M. J., & Remun, C. 1997. Novel Hydrophilic Chitosan –

- Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63, 125–132.
- Costoff, A. 2008. *Endocrinology: The Endocrine Pancreas*. Georgia: MedicalCollege.
- Dodane, V., Khan, M. A., & Merwin, J. R. 1999. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *International Journal of Pharmaceutics*, 182, 21–32.
- Fanun, M. (2010). *Colloids In Drug Delivery*. (A. Hubbard, Ed.). California: CRC Press.
- Fizur, M., Meeran, N., Goyal, S. N., Suchal, K., Patil, C. R., & Ojha, S. K. 2018. Pharmacological Properties, Molecular Mechanisms and Pharmaceutical Development of Asiatic acid: A Pentacyclic Triterpenoid of Therapeutic Promise. *Frontiers in Pharmacology*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00892>
- Frandsen, R. 1992. *Anatomi dan Fisiologi Ternak*. Yogyakarta: UGM Press.
- Ganong, W. 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Jakarta: EGC Press.
- Ganugula, R., Arora, M., Jaisamut, P., Wiwattanapatapee, R., Guo, S., Venkata, N., & Kumar, R. 2017. Nano-curcumin safely prevents streptozotocin-induced inflammation and apoptosis in pancreatic beta cells for effective management of Type 1 diabetes mellitus. *British Journal of Pharmacology*, 174(April 2017), 2074–2084. <https://doi.org/10.1111/bph.13816>
- Hamka. 1993. *Tafsir Al-Azhar*. Jakarta: Panjimas. <https://doi.org/10.3791/2429>
- Hani, H., Z, N. A., & Sarsaifi, K. 2016. Evaluation of isolated caprine pancreatic islets cytoarchitecture by laser scanning confocal microscopy and flow cytometry. *Xenotransplantation*, 23(July 2015), 128–136. <https://doi.org/10.1111/xen.12220>
- Hashim, P., Sidek, H., Helan, M. H. M., Sabery, A., Palanisamy, U. D., & Ilham, M. 2011. Triterpene Composition and Bioactivities of Centella asiatica. *Molecules*, 16, 1310–1322. <https://doi.org/10.3390/molecules16021310>
- Huajun, Y., Chen, Y., Kong, H., He, Q., Sun, H., Bhugul, P. A., ... Zhou, M. 2018. The rat pancreatic body tail as a source of a novel extracellular matrix scaffold for endocrine pancreas bioengineering. *Journal of Biologucal Engineering*, 12,

1–15.

- Javidi, M. A., Kaeidi, A., Sahar, S., Farsani, M., Babashah, S., & Sadeghizadeh, M. 2019. Investigating curcumin potential for diabetes cell therapy, in vitro and in vivo study. *Life Sciences*, 116908. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116908>
- Jayakumar, R., Menon, D., Manzoor, K., Nair, S. V, & Tamura, H. 2010. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials — A short review. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.074>
- Jo, J., Choi, M. Y., & Koh, D. 2007. Size Distribution of Mouse Langerhans Islets. *Biophysical Journal*, 93(8), 2655–2666. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.104125>
- Junod, A., Lambert, A. E., Orci, L., Pictet, R., Gonet, A. E., & Renold, A. E. 1967. Studies of the Diabetogenic Action of Streptozotocin. *Biol Med (Maywood)*, 126: 201. <https://doi.org/10.3181/00379727-126-32401>
- Kaiser, N., Corcost, A., Tur-Sinai, A., Ariav, Y., & Cerasi, E. 2016. Monolayer Culture of Adult Rat Pancreatic Islet on Extracellular Matrix: Long Term Maintenance of Differentiated B-Cell Function. *Endocrinology*, 123, 2. <https://doi.org/10.1007/s13300-018-0380-x>
- Khumairoh, I., & Puspitasari, I. M. 2016. Farmaka KULTUR SEL Farmaka. *Farmaka Suplemen*, 14, 98–110.
- Kumar, A., Solakhia, T. M., & Agrawal, S. 2012. Chitosan Nanoparticle - A Drug Delivery System. *IJPBA*, 3(4), 737–743.
- Kumar, R. M. N. ., Bakowsky, U., & Lehr, C. M. 2004. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers Ethyl acetate. *Biomaterials*, 25(August), 1771–1777. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.08.069>
- Kwon, H., Lee, J., Choi, S., & Jang, Y. 2001. Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification – diffusion method. *Colloids and Surfaces*, 182(November), 123–130.
- Lee, C. J., Wilson, L., Jordan, M. A., Nguyen, V., Tang, J., & Smiyun, G. 2010. of

- both Human Breast Cancer and Androgen-dependent Prostate Cancer Cells. *Phytotherapy Research*, 19(March 2009), 15–19. <https://doi.org/10.1002/ptr>
- Lehmann, V., Andersen, P. L., Damodaran, R. G., & Vermette, P. 2018. A Method for Isolation of Pancreatic Blood Vessels, their Culture and Co-culture with Islets of Langerhans Running Head: Isolation and Culture of Pancreatic Blood Vessels Vivian Lehmann. *Cell Culture and Tissue Engineering Biotechnology*. <https://doi.org/10.1002/btpr.2745>
- Lenzen, S. 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51, 216–226. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>
- Li, Y., Pei, Y., Zhou, Z., & Zhang, X. 2001. PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as tumor necrosis factor- α carriers. *Journal of Controlled Release*, 71(January 2001), 287–296.
- Lytrivi, M., Anne-laure, C., Poitout, V., & Cnop, M. 2019. $\uparrow$ Intrapancreatic fat Unbalanced composition Oxidative stress Mitochondrial dysfunction GLP-1 analogs ER stress GLP-1 analogs Dysfunction Apoptosis Dedifferentiation (?). *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.09.016>
- Ma'at, S. 2011. *Teknik dasar kultur sel*. Surabaya: UNAIR Press.
- Marshall, S. M., & Marshall, S. M. 2020. The pancreas in health and in diabetes. *Diabetologia*, 63, 1962–1965. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00125-020-05235-z>
- Martini, F. H. 2008. *Anatomy and Physiology* (Seventh). America: Person Education Press. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0763-6>
- Mashudi, S. 2011. *Anatomi dan Fisiologi Dasar*. Jakarta: Salemba Medika.
- Merentek, E. 2006. Resistensi Insulin Pada Diabetes Melitus Tipe 2, (150), 38–41.
- Mescher, A. 2012. *Histologi dasar junqueira teks dan atlas* (11th ed.). Jakarta: EGC. <https://doi.org/10.5415/apallergy.2011.1.1.12>
- Mohanraj, V. J., & Chen, Y. 2006. Nanoparticles – A Review. *Tropicals Journal of Pharmaceutical Research*, 5(June), 561–573.
- Nahdi, A. M. T. Al, John, A., & Raza, H. 2017. Elucidation of Molecular Mechanisms of Streptozotocin-Induced Oxidative Stress , Apoptosis , and

- Mitochondrial Dysfunction in Rin-5F Pancreatic β -Cells. *Hindawi*, 2017, 15.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2017/7054272>
- Nicolas, J., & Couvreur, P. 2009. Synthesis of poly (alkyl cyanoacrylate) -based colloidal nanomedicines. France: John Willwy & Sons, Inc.
<https://doi.org/10.1002/wnan.015>
- Niwa, T., Takeuchi, H., Hino, T., Kunou, N., & Kawashima, Y. 1994. In Vitro Drug Release Behavior of D , L-Lactide / Glycolide Copolymer (PLGA) Nanospheres with Nafarelin Acetate Prepared by a Novel Spontaneous Emulsification Solvent Diffusion Method. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(May 1994), 5.
- Oyenihi, A. B., Ahiante, B. O., Oyenihi, O. R., & Masola, B. 2020. Centella asiatica : its potential for the treatment of diabetes. *Diabetes*, (21), 212.
- Pearch, E. . 2000. *Anatomi dan Fisiologis untuk Paramedis*. Jakarta: Gramedia.
- Prasetyaningtyas, W., Putra, D., Susana, F., Djuwita, I., & Kusdiantoro, M. 2016. Black Seed (*Nigella sativa*) Extract Induce in vitro Proliferation and Differentiation of Rat Pancreatic Bone Cells. *Jurnal Veteriner*, 17(15), 337–346.
<https://doi.org/10.19087/jveteriner.2016.17.3.337>
- Prashanth, K. V. H., & Tharanathan, R. N. 2007. Chitin / chitosan : modifications and their unlimited application potential d an overview. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 117–131. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.10.022>
- Puglisi, G., Fresta, M., Giammona, G., & Ventura, C. A. 1995. journal of pharmaceutics Influence of the preparation conditions on poly (ethylcyanoacrylate) nanocapsule formation. *International Journal of Pharmaceutics*, 125(April 1995), 283–287.
- Rao, J. P., & Geckeler, K. E. 2011. Progress in Polymer Science Polymer nanoparticles : Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36(7), 887–913.
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>.
- Rohanova, D., Boccaccini, A.R., Horkavcova, D., Bozdechova, P., Bezdictka, P., Castoralova, M. 2014. Is Non-buffered DMEM solution a suitable medium fot in

- vitro bioactivity tests?. *Journal of Materials Chemistry B*, 2: 5068- 5076.
- Savitri, E. sandi. 2006. Studi Morfologi Tumbuhan Gulma yang berpotensi sebagai obat di lingkungan UIN Malang. *Jurnal Saintika*, 2, 3.
- Setyawati, T. 2014. Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ (Ppar- γ) coactivator 1- α (PGC-1 α) Pada Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2) dan Perannya dalam fungsi mitokondria. *MEDIKA TADULAKO*, 1(1), 54–62.
- Shanmukha, Y., Saikishore, V., Srikanth, K., Satyanarayana, J., & Pradesh, A. 2012. Drug delivery systems using chitosan nanoparticles. *Am. J. PharmTech*, 2(December 2011), 2249–3387.
- Skelin, M., & Rupnik, M. 2010. Pancreatic Beta Cell Lines and their Applications in Diabetes Mellitus Research. *Altex*, 27(May), 105–113.
- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., & Kulkarni, A. R. 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70(September 28th), 1–20.
- Standl, E. 2007. The importance of b -cell management in type 2 diabetes. *Int J Clin Pract*, (June), 10–19. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2007.01360.x>
- Sumbayak, E. M. 2014. Regenerasi Epitel. *Jurnal Kedokteran Meditek*, 15(6), 1–4. <https://doi.org/https://doi.org/10.36452/jkdoktmeditek.v15i39A.870>
- Sun, B., Wu, L., Wu, Y., Zhang, C., Qin, L., Hayashi, M., ... Liu, T. 2020. Therapeutic Potential of Centella asiatica and Its Triterpenes : A Review. *Frontiers in Pharmacology*, 11(September), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.568032>
- Suriani, N. 2012. *Gangguan Metabolisme Karbohidrat pada Diabetes Melitus*. Malang.
- Syahidah, H. N., & Hadisaputri, Y. E. 2012. Farmaka Farmaka. *Farmaka*, 14, 27–36.
- Syauqi, A. A.-F. 2000. *Nilai kesehatan dalam syariat islam*. Jakarta: PT. Bumi Aksara.
- Tiyaboonchai, W. 2003. Chitosan Nanoparticles : A Promising System for Drug Delivery. *Naresuan University Journal*, 11(3), 51–66. <https://doi.org/10.1.1.460.1550>.

- USDA, NRCS. 2020. The PLANTS Database (<http://plants.usda.gov>, 22 December 2020). National Plant Data Team, Greensboro, NC 27401-4901 USA.
- Vauthier, C., Dubernet, C., Fattal, E., Pinto-alphandary, H., & Couvreur, P. 2003. Poly (alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(January 2003), 519–548.
- Velasco, M., Larqué, C., Díaz-garcía, C. M., Sanchez-soto, C., & Hiriart, M. 2018. Rat Pancreatic Beta-Cell Culture. *Methods in Molecular Biology*, (January). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6>
- W.R, W., & Surbakti, Ma. 2003. *Khasiat dan Manfaat Pegagan*. Jakarta: Agromedia.
- Wang, J., & Wang, H. 2017. Review Article Oxidative Stress in Pancreatic Beta Cell Regeneration. *Hindawi*, 2017, 9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2017>.
- Wilson, S., Cholan, S., Vishnu, U., Sannan, M., Jananiya, R., Vinodhini, S., ... Rajeswari, D. 2015. In vitro assessment of the efficacy of free-standing silver nanoparticles isolated from *Centella asiatica* against oxidative stress and its antidiabetic activity. *Der Pharmacia Lettre*, 7(12), 194–205. Retrieved from <http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>
- Wolters, G. H. J., Vos-scheperkeuter, G. H., Lin, H., & Schilfgaard, R. Van. 1995. Different Roles of Class I and Class II *Clostridium Histolyticum* Collagenase in Rat Pancreatic Islet Isolation. *Diabetes*, 44(February 1995).
- Yordanov, G., Skrobanska, R., & Petkova, M. 2015. Poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles stabilised with poloxamer 188 : particle size control and cytotoxic effects in cervical carcinoma (HeLa) cells. *Chemical Papers*, (August). <https://doi.org/10.1515/chempap-2015-0220>
- Zambaux, M. F., Bonneaux, F., Gref, R., Maincent, P., Dellacherie, E., & Alonso, M. J. 1998. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly (lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *Jurnal of Controlled Release*, 50, 31–40.
- Zhu, W., & Zhang, Z. 2014. Preparation and characterization of catechin-grafted chitosan with antioxidant and antidiabetic potential. *International Journal of BiologicalMacromolecules*, 70, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014>

Lampiran 1 Perhitungan statistika data viabilitas sel

Perlakuan	Ulangan				Jumlah	Rata-Rata
	1	2	3	4		
0 μ M	8	10	12	9	39	9,75
20 μ M	15	18	20	17	70	17,5
40 μ M	18	22	24	20	84	21
60 μ M	31	33	34	30	128	32
80 μ M	28	32	30	28	118	29,5
100 μ M	20	23	25	20	88	22
Total data					527	87,83333

1. Hasil Perhitungan Statistik Manual

$$\begin{aligned} \text{A. Faktor Koreksi (FK)} &= (\text{Jumlah data})^2 / \text{Jumlah Ulangan (r)} \times \text{Jumlah Perlakuan (t)} \\ &= (527)^2 / 4 \times 6 \\ &= 11572,04167 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{B. Jumlah Kuadrat Total (JKT)} &= (8^2 + 10^2 + 12^2 + \dots + 25^2 + 20^2) - \text{FK} \\ &= 12963 - 11572,04167 \\ &= 1390,958333 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{C. Jumlah Kuadrat Perlakuan (JKP)} &= (39^2 + 70^2 + \dots + 88^2) / r - \text{FK} \\ &= 51529 / 4 - 11572,04167 \\ &= 1310,208333 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{D. Jumlah Kuadrat Galat (JKG)} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\ &= 1390,958333 - 1310,208333 \\ &= 80,75 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{E. Kuadrat Tengah Perlakuan (KTP)} &= \text{JKP} / t - 1 \\ &= 1310,208333 / 6 - 1 \\ &= 217,3680556 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{F. Kuadrat Tengah Galat (KTG)} &= \text{JKG} / t (r-1) \\ &= 80,75 / 6 (4 - 1) \\ &= 4,486111111 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{G. F Hitung} &= \text{KTP} / \text{KTG} \\ &= 217,3680556 / 4,486111111 \\ &= 48,45356037 \end{aligned}$$

H. Tabel ANSIRA (analisis sidik ragam) *One Way Anova*

SK	Db	JK	KT	F	F Tabel
Hitung					
Perlakuan	5	1310,21	217,37	48,4536	2,63999
Galat	18	80,75	4,49		
Total	23	1390,96			

2. Hasil Perhitungan Statistik dengan SPSS versi 25

A. Uji Normalitas Kolmogorov- Smirnov

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Konfluenitas
N		24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	21,8202
	Std. Deviation	7,84213
Most Extreme Differences	Absolute	,118
	Positive	,092
	Negative	-,118
Test Statistic		,118
Asymp. Sig. (2-tailed)		,200 ^{c,d}
a. Test distribution is Normal.		
b. Calculated from data.		
c. Lilliefors Significance Correction.		
d. This is a lower bound of the true significance.		

= Hasil uji normalitas menunjukkan data berdistribusi Normal

B. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Konfluenitas	Based on Mean	1,110	5	18	,390
	Based on Median	,801	5	18	,563
	Based on Median and with adjusted df	,801	5	8,626	,577
	Based on trimmed mean	1,038	5	18	,426

= Hasil uji homogenitas menunjukkan data homogen

C. One way Anova

ANOVA					
Konfluenitas					
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1158,722	5	231,744	16,310	,000
Within Groups	255,754	18	14,209		
Total	1414,476	23			

Lampiran 2 Perhitungan statistika data konfluenitas sel

Perlakuan	Ulangan				Jumlah	Rata-Rata
	1	2	3	4		
0 μ M	4	6	7	4	21	5,25
20 μ M	18	19	21	15	73	18,25
40 μ M	29	35	38	30	132	33
60 μ M	35	40	46	35	156	39
80 μ M	12	18	19	13	62	15,5
100 μ M	12	13	15	10	50	12,5
Total data					494	82,33333

1. Hasil Perhitungan Statistik Manual

A. Faktor Koreksi (FK) = $(\text{Jumlah data})^2 / \text{Jumlah Ulangan (r)} \times \text{Jumlah Perlakuan (t)}$

$$= (494)^2 / 4 \times 6$$

$$= 10168,17$$

B. Jumlah Kuadrat Total (JKT) = $(4^2 + 6^2 + 7^2 + \dots + 15^2 + 10^2) - \text{FK}$

$$= 13680 - 10168,17$$

$$= 3511,833$$

C. Jumlah Kuadrat Perlakuan (JKP) = $(39^2 + 70^2 + \dots + 88^2) / r - \text{FK}$

$$= 53874 / 4 - 10168,17$$

$$= 3300,333$$

D. Jumlah Kuadrat Galat (JKG) = $\text{JKT} - \text{JKP}$

$$= 3511,833 - 3300,333$$

$$= 211,5$$

E. Kuadrat Tengah Perlakuan (KTP) = $\text{JKP} / t - 1$

$$= 3300,333 / 6 - 1$$

$$= 549,0556$$

F. Kuadrat Tengah Galat (KTG) = $\text{JKG} / (r - 1)$

$$= \text{JKG} / t (r - 1)$$

$$= 211,5 / 6 (4 - 1)$$

$$= 11,75$$

G. F Hitung = KTP / KTG

$$= 549,0556 / 11,75$$

$$= 46,72813$$

H. Tabel ANSIRA (analisis sidik ragam) *One Way Anova*

SK	Db	JK	KT	F Hitung	F Tabel
Perlakuan	5	3300,3	549,06	46,72813	2,63999
Galat	18	211,5	11,75		
Total	23	3511,83			

2. Hasil Perhitungan Statistik dengan SPSS versi 25

A. Uji Normalitas Kolmogorov- Smirnov

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Viabilitas
N		24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	20,5833
	Std. Deviation	12,35672
Most Extreme Differences	Absolute	,176
	Positive	,176
	Negative	-,128
Test Statistic		,176
Asymp. Sig. (2-tailed)		,053 ^c
a. Test distribution is Normal.		
b. Calculated from data.		
c. Lilliefors Significance Correction.		

= Hasil uji normalitas menunjukkan data berdistribusi Normal

B. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Viabilitas	Based on Mean	2,726	5	18	,053
	Based on Median	2,097	5	18	,113
	Based on Median and with adjusted df	2,097	5	7,500	,174
	Based on trimmed mean	2,716	5	18	,053

= Hasil uji homogenitas menunjukkan data homogen

C. One way Anova

ANOVA					
Viabilitas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3300,333	5	660,067	56,176	,000
Within Groups	211,500	18	11,750		
Total	3511,833	23			

= Hasil Anova menunjukkan bahwa perlu dilakukan uji lanjut

Lampiran 3 Prosedur Isolasi Sel Pankreas Tikus

1. Disiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
2. Diambil fetus tikus dan diletakkan dialas-bedah
3. Disemprot fetus tikus dengan alkohol 70%
4. Didislokasi fetus tikus
5. Disayat secara horizontal abdomen fetus tikus
6. Diambil organ pankreas yang dibutuhkan, kemudian dicuci pada cawan petri yang telah diisi NaCl Fis 0,9%, kemudian dicuci lagi pada cawan petri yang telah diisi NaCl Fis 0,9% + antibiotik
7. Dicacah organ dengan menggunakan gunting bedah hingga menjadi granula kecil, kemudian dihaluskan dengan menggunakan spuilit hingga menjadi suspensi halus.
8. Dimasukkan Suspensi halus ke dalam tube 15 ml yang telah ditambahkan dengan 3 ml HBSS.
9. Disentrifugasi tube yang berisi sampel dengan kecepatan 3.500 rpm selama 10 menit.
10. Dibuang supernatan yang dihasilkan, kemudian pellet diresuspensi dengan 3 ml HBSS yang telah ditambahkan antibiotik.
11. Diresentrifugasi sampel dengan kecepatan 3.500 rpm selama 10 menit.
12. Dibuang supernatan yang dihasilkan, kemudian pellet diresuspensi dengan 2 ml media DMEM 0%.
13. Diresentrifugasi sampel dengan kecepatan 3.500 rpm selama 10 menit.
14. Dipisahkan pellet dengan supernatnya. Pellet kemudian disuspensikan dengan 1 ml media DMEM 0%.
15. Dihomogenkan suspensi dengan menggunakan vortex.
16. Suspensi sel dihitung konsentrasi selnya secara manual.
17. Digunakan suspensi sel yang telah siap untuk kepentingan penanaman.

Lembar 4 Dokumentasi Penelitian*Laminar air flow Set**Stok Nanopartikel dan Ekstrak Pegagan**Proses Sonifikasi Nanopartikel**Proses Homogenizing Nanopartikel**Flowcytometry Device 1**Flowcytometry Device 2*



**KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI**

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Muhammad Andi Fachrudin
NIM : 16620074
Program Studi : Biologi
Semester : 9, Tahun Ajaran 2019/2020
Pembimbing : Prof. Dr. drh. Hj. Bayyinatul M, M. Si
Judul Skripsi : PENGARUH NANOPARTIKEL PEGAGAN (*Centella asiatica* L) TERSALUT KITOSAN TERHADAP KONFLUENITAS, VIABILITAS, DAN KADAR INSULIN KULTUR SEL PANKREAS TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI STRETOZOTOCIN

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	Senin, 06 Januari 2020	Konsultasi Judul	
2.	Kamis, 16 Januari 2020	Konsultasi Bab 1	
3.	Senin, 03 Februari 2020	Konsultasi Bab 2	
4.	Rabu, 16 Maret 2020	Konsultasi Rancangan Penelitian	
5.	Jum'at, 27 Maret 2020	Konsultasi Bab 3	
6.	Jumat, 13 November 2020	Konsultasi Hasil Penelitian	
7.	Senin, 07 Desember 2020	ACC Skripsi	

Pembimbing Skripsi,

Prof. Dr. drh. Hj. Bayyinatul M, M. Si
NIP. 19710919 200003 2 001

Malang, 09 Desember 2020
Ketua Program Studi,



Dr. Evika Sandi Savitri, M.P.
NIP. 19741018 200312 2 002



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
 Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Muhammad Andi Fachrudin
 NIM : 16620074
 Program Studi : Biologi
 Semester : 9, Tahun Ajaran 2019/2020
 Pembimbing : Mujahidin Ahmad, M.Sc
 Judul Skripsi : PENGARUH NANOPARTIKEL PEGAGAN (*Centella asiatica* L) TERSALUT KITOSAN TERHADAP KONFLUENITAS, VIABILITAS, DAN KADAR INSULIN KULTUR SEL PANKREAS TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI STRETOZOTOCIN

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	Jum'at, 27 Maret 2020	Konsultasi BAB I	
2.	Senin, 6 April 2020	Konsultasi Bab 2	
3.	Rabu, 15 April 2020	Konsultasi revisi BAB I dan II	
4.	Jum'at, 4 Desember 2020	Konsultasi Integrasi Bab IV	
5.	Rabu, 09 Desember 2020	Acc Skripsi	

Malang, 09 Desember 2020

Pembimbing Skripsi,

Mujahidin Ahmad, M. Sc
 NIP. 19860512201608011060

Ketua Program Studi,

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P.
 NIP. 19741018 200312 2 002



**KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI**

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

Form Checklist Plagiasi

Nama : Muhammad Andi Fachrudin
NIM : 16620074
Judul : PENGARUH NANOPARTIKEL PEGAGAN (*Centella asiatica* L)
TERSALUT KITOSAN TERHADAP KONFLUENITAS, VIABILITAS, DAN KADAR INSULIN PADA KULTUR SEL PANKREAS TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI STRETOZOTOCIN

No	Tim Checkplagiasi	Skor Plagiasi	TTD
1.	Azizatur Rohmah, M.Sc		
2.	Berry Fakhry Hanifa, M.Sc	6%	
3.	Bayu Agung Prahardika, M.Si		

Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi


Dr. Evika Sandi Savitri, M.P.
NIP. 197410182003122002