

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL BEKATUL TERFERMENTASI
Rhizopus oryzae TERHADAP HISTOLOGI LIMPA MENCIT
(*Mus musculus*) DIABETES**

SKRIPSI

Oleh:

**AYYUMA JAUHAROH JARRO BI MA'SHUM
NIM. 15630013**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL BEKATUL TERFERMENTASI
Rhizopus oryzae TERHADAP HISTOLOGI LIMPA MENCIT
(*Mus musculus*) DIABETES**

SKRIPSI

Oleh:
AYYUMA JAUHAROH JARRO BI MA'SHUM
NIM. 15630013

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

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL BEKATUL TERFERMENTASI
Rhizopus oryzae TERHADAP HISTOLOGI LIMPA MENCIT
(*Mus musculus*) DIABETES**

SKRIPSI

Oleh:
AYYUMA JAUHAROH JARRO BI MA'SHUM
NIM. 15630013

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 21 Desember 2020

Pembimbing I



Anik Maunatin, S.T., M.P NIP.
NIDT. 19760105 20180201 2 248

Pembimbing II



Lulu'atul Hamidatn Ulya, M.Sc
NIDT. 19900906 20180201 2 239

Mengetahui,
Ketua Jurusan







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

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL BEKATUL TERFERMENTASI
Rhizopus oryzae TERHADAP HISTOLOGI LIMPA MENCIT
(*Mus musculus*) DIABETES**

SKRIPSI

Oleh:
AYYUMA JAUHAROH JARRO BI MA'SHUM
NIM. 15630013

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 21 Desember 2020

Penguji Utama	: Rachmawati Ningsih, M.Si NIP. 19810811 200801 2 010	 (.....)
Ketua Penguji	: Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P NIP.19750410 200501 2 009	 (.....)
Sekretaris Penguji	: Anik Maunatin, S.T., M.P NIDT. 19760105 20180201 2 248	 (.....)
Anggota Penguji	: Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc NIDT. 19900906 20180201 2 239	 (.....)

**Mengesahkan,
Ketua Jurusan**


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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Ayyuma Jauharoh Jarro Bi Ma'shum

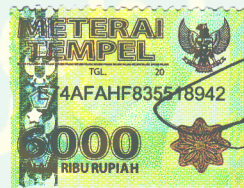
NIM : 15630013

Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia

Judul Penelitian : Pengaruh Ekstrak Etanol Bekatul Terfermentasi *Rhizopus oryzae* terhadap Histologi Limpa Mencit (*Mus musculus*) Diabetes

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

Malang, 21 Desember 2020,
Yang Membuat Pernyataan,



Ayyuma Jauharoh Jarro Bi Ma'shum
NIM. 15630013

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirobbil ‘Alamin, dengan penuh rasa syukur kepada Allah Swt. saya akhirnya dapat menyelesaikan naskah skripsi ini. Tanpa kehendak-Nya dan dukungan dari orang-orang sekitar, saya tidak akan mampu menyelesaikan naskah skripsi ini dengan baik. Oleh karena itu, saya ingin mempersembahkan tulisan ini untuk:

Kedua orang tua saya, Bapak Saifur Romdlon dan Ibu Zakiyah Fuad yang selama ini telah sabar dan ikhlas dalam memberikan segala bentuk dukungan, doa, motivasi, nasihat, dan dukungan baik secara moril maupun materiil Do’a beliau berdua pada setiap sujudnya menjadi gerbang pembuka dalam setiap langkah yang saya lalui. Beliau berdua adalah alasan terbesar saya untuk terus berjuang.

Adik saya Labib Ramdhaniz Zaha, yang telah menjadi tempat bergurau, memberikan semangat, dan membuat saya lebih tegar hingga saat ini.

Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah membimbing dan menyalurkan ilmu pengetahuan kepada saya. Khususnya kepada Bu Anik, Bu Akyun, dan Bu Lulu’ yang telah memotivasi, memberikan arahan, dan bimbingan kepada saya dengan sangat sabar selama ini.

Partner lab (Mbak Izza), teman lab (Mbak Dedew, Mbak Aan, Mbak Nende, Mbak Ani, Mbak Nisak, Mukhlis, dan Irfan), seluruh teman Kimia A’15 dan kimia angkatan 2015 yang telah menjadi teman dari proses perkuliahan saya selama ini, dan untuk jodoh saya dimasa depan, terimakasih telah menunggu saya.

MOTTO

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

"Dengan menyebut nama Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang"

“Ikhlas”



KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr.Wb.

Alhamdulillah, puji syukur kehadirat Allah Swt. yang telah melimpahkan Rahmat, Taufiq dan hidayah-Nya tiada henti dan tiada batas kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Pengaruh Ekstrak Etanol Bekatul Terfermentasi *Rhizopus Oryzae* terhadap Histologi Limpa Mencit (*Mus Musculus*) Diabetes”**. Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada Nabi Muhammad saw., keluarga, sahabat dan umat yang mengikutinya.

Selanjutnya penulis mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Ucapan terimakasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Bapak, Ibu, dan segenap keluarga yang telah dan selalu memberikan perhatian, nasihat, dukungan, dan do'a sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
2. Prof. Dr. H. Abdul Haris, M.Ag selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Ibu Anik Maunatin, S.T, M.P., selaku dosen pembimbing I yang telah memberikan bimbingan dan pengarahan dalam penyusunan skripsi ini.

6. Ibu Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc., selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dan pengarahan dalam penyusunan skripsi ini.
7. Ibu Dr. Akyunul Jannah, S. Si, M.P., selaku konsultan yang telah memberikan pengarahan dalam penyusunan skripsi ini.
8. Segenap civitas akademi Jurusan Kimia, terutama kelompok riset bekatul 2019 yang turut membantu dalam penyelesaian skripsi ini.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materil maupun moril.

Penulis sadar bahwa skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga dapat memberikan manfaat kepada para pembaca, khususnya bagi penulis. *Amin Ya Rabbal Alamin.*

Wassalamu'alaikum Wr. Wb

Malang, 21 Desember 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PENGAJUAN	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
MOTTO	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR PERSAMAAN	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
ABSTRAK	xvi
ABSTRACT	xvii
مستخلص البحث	xviii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Batasan Masalah	6
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Bekaul	7
2.2 Diabetes Mellitus	10
2.3 Organ Limpa	13
2.4 Antioksidan	14
2.4.1 Pengaruh Radikal Bebas Pada Histologi Limpa dan Glukosa Darah	16
2.4.2 Pengaruh Pemberian Antioksidan Pada Histologi Limpa dan Glukosa Darah	18
2.5 Fermentasi	20
2.5.1 <i>Rhizopus oryzae</i>	22
2.6 Hewan Coba Mencit (<i>Mus musculus</i>)	26
2.6.1 Agen Diabetogenik Aloksan	27
2.7 Uji Fitokimia	28
2.7.1 Fenolik	29
2.7.2 Flavonoid	29
2.7.3 Saponin	30
2.7.4 Terpenoid dan Steroid	30
2.7.5 Alkaloid	31
2.8 Ekstraksi Maserasi Senyawa Bioaktif Bekatul Menggunakan Pelarut Etanol	32

2.9 Pewarnaan Hematoksin-Eosin	35
--------------------------------------	----

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Pelaksanaan Penelitian	37
3.2 Alat dan Bahan	37
3.2.1 Alat	37
3.2.2 Bahan	37
3.3 Rancangan Penelitian	38
3.4 Tahapan Penelitian	39
3.5 Pelaksanaan Penelitian	40
3.5.1 Preparasi Alat dan Bekatul	40
3.5.1.1 Sterilisasi Alat	40
3.5.1.2 Stabilisasi Bekatul	40
3.5.2 Analisis Kadar Air	40
3.5.3 Sterilisasi dan Pembuatan Media	41
3.5.3.1 Sterilisasi Bekatul	41
3.5.3.2 Pembuatan Media <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA).....	41
3.5.3.3 Regenerasi Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	41
3.5.4 Fermentasi Bekatul	42
3.5.4.1 Pembuatan Inokulum Jamur	42
3.5.4.2 Fermentasi Bekatul Menggunakan <i>Rhizopus oryzae</i>	42
3.5.5 Ekstraksi Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi	42
3.5.6 Uji Fitokimia	43
3.5.6.1 Uji Fenolik	43
3.5.6.2 Uji Flavonoid	43
3.5.6.3 Uji Saponin	43
3.5.6.4 Uji Steroid dan Terpenoid.....	44
3.5.6.5 Uji Alkaloid	44
3.5.7 Persiapan Mencit.....	44
3.5.8 Pengukuran Kadar Glukosa Darah.....	45
3.5.9 Pengkondisian Mencit Diabetes Mellitus.....	45
3.5.10 Perlakuan dengan Ekstrak Bekatul Terfermentasi	46
3.5.11 Pewarnaan Hematoksin-Eosin	46
3.5.11.1 Pembuatan Preparat	46
3.5.11.2 Pewarnaan Preparat	47
3.5.12 Analisis Data	48

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Bekatul.....	49
4.2 Analisis Kadar Air.....	50
4.3 Sterilisasi dan Pembuatan Media	50
4.3.1 Sterilisasi Bekatul	50
4.3.2 Pembuatan Media <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA).....	51
4.3.3 Regenerasi Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	51
4.4 Fermentasi Bekatul.....	52
4.4.1 Pembuatan Inokulum Jamur	52
4.4.2 Fermentasi Bekatul Menggunakan <i>Rhizopus oryzae</i>	52

4.5 Ekstraksi Senyawa Aktif Bekatul dengan Maserasi Menggunakan Pelarut Etanol	55
4.6 Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Bekatul	57
4.6.1 Uji Fenolik	58
4.6.2 Uji Flavonoid	59
4.6.3 Uji Steroid dan Terpenoid.....	61
4.6.4 Uji Alkaloid	62
4.7 Pengaruh Ekstrak Bekatul terhadap Mencit (<i>Mus musculus</i>) yang Diinduksi Aloksan.....	65
4.7.1 Persiapan Mencit.....	65
4.7.2 Pengkondisian Mencit Diabetes Mellitus	67
4.7.3 Perlakuan dengan Ekstrak Bekatul Terfermentasi	68
4.7.3.1 Perubahan Berat Badan Mencit	69
4.7.3.2 Perubahan Kadar Glukosa Darah Mencit	71
4.7.3.3 Pengamatan Histologi Limpa Mencit	74
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan.....	82
5.2 Saran.....	82
DAFTAR PUSTAKA	83
LAMPIRAN	93

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan Bekatul	8
Tabel 2.2 Klasifikasi Diabetes Mellitus	11
Tabel 2.3 Pengaruh Radikal Terhadap Jumlah Sel Limfosit.....	17
Tabel 2.4 Pengaruh Radikal Terhadap Kadar Glukosa Darah	18
Tabel 2.5 Pengaruh Antioksidan Terhadap Kadar Glukosa Darah	20
Tabel 2.6 Peningkatan Aktivitas Antioksidan Bekatul.....	21
Tabel 2.7 Pengaruh Pelarut Terhadap Rendemen dan Aktivitas Antioksidan	33
Tabel 2.8 Pengaruh Ukuran Partikel dan Lama Ekstraksi Terhadap Rendemen ..	34
Tabel 3.1 Pembagian Kelompok dan Perlakuan Hewan Coba Mencit	38
Tabel 4.1 Rendemen Ekstrak Etanol 95% Bekatul	56
Tabel 4.2 Hasil Uji Fitokimia.....	57
Tabel 4.3 Berat Badan Mencit Sebelum Aklimatisasi dan Setelah Aklimatisasi..	65
Tabel 4.4 Jumlah Sel Limfosit Mencit Setelah Terapi	76
Tabel 4.5 Hasil Uji Lanjut Tukey Terhadap Jumlah Sel Limfosit Mencit.....	78



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Beras	7
Gambar 2.2 Histologi Limpa Tikus Jantan.....	13
Gambar 2.3 Reaksi Peredaman Radikal Bebas Oleh Vitamin E	15
Gambar 2.4 Histologi Limpa Tikus Normal dan Tikus Terpapar Radikal Bebas	15
Gambar 2.5 Histologi Limpa Tikus Terpapar Radikal Bebas dan Tikus Terpapar Radikal Bebas Diterapi dengan Ekstrak kulit Jengkol.....	18
Gambar 2.6 Kurva Pertumbuhan Kapang <i>Rhizopus oryzae</i>	23
Gambar 2.7 Mekanisme Enzim Selulase	25
Gambar 2.8 Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	26
Gambar 2.9 Mekanisme Aloksan	28
Gambar 2.10 Struktur Inti Fenolik	29
Gambar 2.11 Struktur Inti Flavonoid	30
Gambar 2.12 Struktur Inti Steroid	31
Gambar 2.13 Isoprena.....	31
Gambar 2.14 Struktur Inti Alkaloid.....	32
Gambar 4.1 Mekanisme Enzim Selulase	53
Gambar 4.2 Bekatul Tanpa Fermentasi dan Bekatul Terfermentasi	54
Gambar 4.3 Filtrat Bekatul Tanpa Fermentasi dan Filtrat Bekatul Terfermentasi.....	56
Gambar 4.4 Reaksi Dugaan Uji Fenol.....	59
Gambar 4.5 Reaksi Reduksi Inti Benzopiron Rangka Flavonol.....	60
Gambar 4.6 Reaksi Terpenoid dengan Pereaksi Liebermann-burchard.....	61
Gambar 4.7 Reaksi Dugaan Senyawa Steroid Membentuk Kompleks Steroid....	62
Gambar 4.8 Reaksi Alkaloid dengan Pereaksi Dragendorf	63
Gambar 4.9 Reaksi Alkaloid dengan Reagen Mayer	64
Gambar 4.10 Grafik Berat Badan Mencit Setelah Terapi Ekstrak Bekatul.....	69
Gambar 4.11 Grafik Kadar Glukosa Darah Mencit Setelah Terapi Ekstrak Bekatul.	71
Gambar 4.12 Reaksi Inisiasi Prooksidan.....	74
Gambar 4.13 Histologi Limpa Mencit Setelah Terapi Ekstrak Bekatul.....	75

DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 3.1 Kadar Air.....	41
-------------------------------------	----



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian	93
Lampiran 2. Diagram Alir	94
Lampiran 3. Pembuatan dan Perhitungan Larutan	103
Lampiran 4. Perhitungan Uji Kadar Air dan Rendemen Ekstrak.....	108
Lampiran 5. Data Berat Badan Mencit.....	111
Lampiran 6. Data Kadar Glukosa Darah Mencit.....	113
Lampiran 7. Data Jumlah Sel Limfosit	115
Lampiran 8. Dokumentasi	117



ABSTRAK

Ma'shum, A. J. J. B. 2020. Pengaruh Ekstrak Etanol Bekatul Terfermentasi *Rhizopus oryzae* terhadap Histologi Limpa Mencit (*Mus musculus*) Diabetes. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Anik Maunatin, S.T, M.P.; Pembimbing II: Lulu'atul Hamidatu Ulya, Konsultan: Dr. Akyunul Jannah, S. Si, M.P.

Kata Kunci : bekatul, fermentasi, *Rhizopus oryzae*, antidiabetes, histologi limpa.

Bekatul mengandung senyawa bioaktif yang bersifat hipoglikemik. Fermentasi bekatul menggunakan *Rhizopus oryzae* meningkatkan aktivitas antioksidan. Diabetes melitus merupakan gangguan metabolisme ditandai tingginya kadar glukosa darah yang dapat meningkatkan pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Species*). Kenaikan ROS menyebabkan kematian sel limfosit pada limpa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae* terhadap histologi limpa mencit diabetes.

Penelitian ini dilakukan dengan fermentasi bekatul menggunakan *Rhizopus oryzae* kemudian diekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 95% dan diuji fitokimia. Induksi diabetes mencit menggunakan aloksan dosis 200 mg/Kg BB. Terapi ekstrak bekatul tanpa fermentasi dan terfermentasi masing-masing menggunakan dosis 100 mg/Kg BB dan 200 mg/Kg BB selama 19 hari. Perubahan berat badan diamati 3 hari sekali, kadar glukosa darah pada hari ke-7, 11, 15, dan 19. Hari ke-20 mencit dibedah dan diambil organ limpa untuk pengamatan histologi dan perhitungan sel limfosit secara mikroskopik.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak bekatul tanpa fermentasi dan terfermentasi berpengaruh pada penurunan glukosa darah dan histologi organ limpa. Perlakuan ekstrak bekatul tanpa fermentasi 200 mg/Kg BB dan terfermentasi 100 mg/Kg BB menghasilkan persen penurunan kadar glukosa darah mencit masing-masing 41,87% dan 51,26%. Jumlah sel limfosit tertinggi pada perlakuan ekstrak bekatul tanpa fermentasi dan terfermentasi dosis 200 mg/Kg BB masing-masing 211 sel dan 163 sel.

ABSTRACT

Ma'shum, A. J. J. B. 2020. The Effect of Ethanolic Extract of Rice Bran Fermented by *Rhizopus oryzae* towards Spleen Histology of Diabetic Mice (*Mus musculus*). Chemistry of Department of Science and Technology State Islamic University Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: Anik Maunatin, S.T, M.P.; Supervisor II: Lulu'atul Hamidatu Ulya, M. Sc., Consultant: Dr. Akyunul Jannah, S. Si, M.P.

Keywords : rice bran, fermentation, *Rhizopus oryzae*, antidiabetic, spleen histology

Rice bran contains some bioactive compounds that hypoglycemic properties. Rice bran fermentation using *Rhizopus oryzae* can increase antioxidant activity. Diabetes mellitus is metabolic disorder characterized by high blood glucose level which can increase the formation of ROS (Reactive Oxygen Species). Increasing ROS causes programmed death of lymphocyte cells in spleen. The aim of the research is to determine the effect of ethanolic extract of rice bran fermented by *Rhizopus oryzae* towards spleen histology of diabetic mice.

This research was done by fermentation of rice bran using *Rhizopus oryzae* then extracted using maceration method with ethanol 95% solvent and tested for the phytochemical contents. Diabetic induction in mice was using alloxan 200 mg/Kg BW. Each treatment of non-fermented and fermented rice bran extract used dosage 100 mg/Kg BW and 200 mg/Kg BW for 19 days. The change of body weight was observed every 3 days, blood glucose level was observed in day-7, 11, 15, and 19. In the day-20, mice were dissected and the spleen organ was taken for histology observation and the lymphocyte cells were counted microscopically.

The result showed that non-fermented and fermented rice bran ethanolic extract affected the blood glucose level and spleen histology. The treatment of non-fermented rice bran extract 200 mg/Kg and fermented rice bran extract 100 mg/Kg BW resulted percent decrease of blood glucose level of each treatments were 41,87% and 51,26%.. The highest increase of lymphocyte cell in each treatments of non-fermented and fermented rice bran extract dosage 200 mg/Kg BW were 211 cells and 163 cells.

مستخلص البحث

بمعصوم، أيوما جوهره جرّ. 2020 م. تأثير مستخلص الإيثانول المخمر *Rhizopus oryzae* على نسيج الطحال لدى الفئران (*Mus musculus*) مرض السكري. البحث الجامعي، قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانق. المشرفة الاولى : أنيك موناتن الماجستير، المشرفة الثانية: لؤلؤة الحميدة العليا الماجستير، المشاركة: والدكتورة أعيون الجنة

الكلمات الأساسية: نخالة، تخمير، *Rhizopus oryzae*، مضاد لمرض السكر، أنسجة الطحال.

تحتوي النخالة على العديد من المركبات النشطة بيولوجيًا بحيث يمكن أن تكون مصدرًا لمضادات الأكسدة التي تسبب نقص السكر في الدم. التخمير باستخدام *Rhizopus oryzae* يمكن أن يزيد من نشاط مضادات الأكسدة للنخالة. داء السكري هو اضطراب في التمثيل الغذائي يتميز بارتفاع مستويات السكر في الدم والتي يمكن أن تزيد من تكوين أنواع الأكسجين التفاعلية. تؤدي الزيادة في أنواع الأكسجين التفاعلية إلى موت مبرمج لخلايا الخلايا الليمفاوية في الطحال والذي يتضح من التغيرات في أنسجة الطحال. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد تأثير مستخلص الإيثانول المخمر لنخالة الأرز *Rhizopus oryzae* على نسيج الطحال لدى الفئران المصابة بداء السكري.

تم إجراء هذا البحث عن طريق تخمير نخالة الأرز باستخدام *Rhizopus oryzae* ثم استخلاصها بطريقة النقع مع 95٪ من مذيب الإيثانول واختبارها لمواد كيميائية نباتية. تحريض مرض السكري في الفئران باستخدام جرعة الألوكسان 200 ملجم / كجم من وزن الجسم. استخدم العلاج بمستخلص نخالة الأرز غير المخمر والمخمر جرعة 100 مجم / كجم من وزن الجسم و 200 مجم / كجم من وزن الجسم على التوالي لمدة 19 يومًا. لوحظت تغيرات في وزن الجسم كل 3 أيام ، ومستويات السكر في الدم في اليوم السابع ، الحادي عشر ، الخامس عشر ، التاسع عشر ، تم تشريح الفئران وأخذ أعضاء الطحال للمراقبة النسيجية وعد الخلايا الليمفاوية المجهرية.

أظهرت النتائج أن مستخلص نخالة الأرز المخمر وغير المخمر كان له تأثير في خفض نسبة السكر في الدم وأنسجة الطحال. أدت معالجة مستخلص نخالة الأرز غير المخمر 200 مجم / كجم من وزن الجسم والمخمرة 100 مجم / كجم من وزن الجسم إلى انخفاض مستويات السكر في الدم لدى الفئران ، على التوالي 41.87٪ و 51.26٪. أعلى عدد من الخلايا الليمفاوية في علاج مستخلص النخالة بدون تخمير وتخمير بجرعة 200 مجم / كجم من وزن الجسم ، على التوالي 211 خلية و 163 خلية.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bekatul merupakan hasil samping atau limbah dari proses penggilingan padi. Produksi penggilingan gabah kering giling padi nasional mencapai 60,33 juta ton dan 10 % dari jumlah tersebut adalah bekatul. Selama ini, bekatul hanya difungsikan sebagai pakan ternak dengan nilai ekonomi yang rendah tetapi jika ditelaah lebih lanjut, bekatul memiliki banyak manfaat. Allah Swt. berfirman dalam Al-Qur'an surat Ali-Imran ayat 191:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمٰوٰتِ وَالْاَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هٰذَا بَا طِلًا سُبْحٰنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

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

Allah Swt. menjelaskan ciri khas orang berakal dalam ayat tersebut. Orang berakal adalah mereka yang senantiasa memahami hikmah, berpikir, dan mengambil pelajaran pada setiap ciptaan-Nya. Tidak sekali-kali Allah menciptakan sesuatu yang sia-sia (Abdullah, 2004). Seperti halnya bekatul, meskipun bekatul merupakan hasil samping atau limbah dari proses penggilingan padi, manusia perlu berpikir dan mempelajari bekatul, sehingga diketahui bahwa bekatul dapat berpotensi sebagai sumber senyawa bioaktif.

Kandungan bioaktif pada bekatul antara lain adalah γ -orizanol, asam ferulat, asam kafeat, trisin, asam kumarat, asam fitat, isoform dari vitamin E (α -

tokoferol, γ -tokoferol, dan tokotrienol), fitosterol (β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol), dan kartenoid (Astawan dan Febrinda, 2010). Moongnarm, dkk. (2012) menyatakan bahwa bekatul beras putih mengandung senyawa fenolik sebanyak 1,57 mg/g, γ -orizanol 3,5 mg/g, γ -tokoperol 40,94 mg/g, dan α -tokoferol 46,12 μ g/g. Isoform dari vitamin E merupakan komponen bioaktif yang memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi sehingga bekatul berpotensi sebagai sumber antioksidan (Chen, dkk., 2005).

Salah satu cara untuk meningkatkan senyawa bioaktif yang dapat meningkatkan aktivitas antioksidan adalah fermentasi. Penelitian Zubaidah dan Aldina (2010) menunjukkan bahwa bekatul yang difermentasi menggunakan *L. plantarum* J2 meningkatkan aktivitas antioksidan sebanyak 18,17% sedangkan fermentasi menggunakan *L. casei* meningkatkan aktivitas antioksidan sebanyak 21,48%. Zubaidah, dkk. (2012) melakukan fermentasi bekatul menggunakan mikroba *L. plantarum* B2 meningkatkan aktivitas antioksidan sebanyak 16,85% sedangkan fermentasi menggunakan *L. acidophilus* meningkatkan aktivitas antioksidan sebanyak 15,03%. Oliviera, dkk. (2012) yang melakukan fermentasi bekatul menggunakan *R. Oryzae* selama 96 jam dapat meningkatkan aktivitas antioksidan bekatul yang sangat tinggi mencapai 88,37%. Razak, dkk. (2015) menyatakan bahwa fungi seperti *R. oryzae* menghasilkan enzim hidrolitik seperti enzim β -glukosidase yang dapat memecah struktur dinding sel dan dalam proses hidrolisis dapat membebaskan senyawa fenolik terikat. Peningkatan keberadaan senyawa fenolik mengakibatkan peningkatan aktivitas antioksidan.

Senyawa antioksidan merupakan senyawa yang dapat meredam dampak negatif dari oksidan atau radikal bebas (Setiawan dan Suhartono, 2005). Semakin

tinggi aktivitas antioksidan, maka peredaman radikal bebas dalam tubuh makhluk hidup dalam mengurangi risiko terjangkit penyakit yang disebabkan oleh stress oksidatif akan meningkat. Stress oksidatif merupakan suatu kondisi ketika terjadi ketidak seimbangan terhadap peningkatan pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Species*) dengan penurunan aktivitas enzimatis oleh sistem antioksidan. Stress oksidatif merupakan penyebab utama dari muncul dan berkembangnya penyakit diabetes mellitus (Ma, dkk., 2018).

Diabetes mellitus merupakan suatu gangguan metabolisme yang ditandai dengan tingginya kadar glukosa darah yang disebabkan oleh kurangnya pasokan insulin dalam tubuh, kurangnya sensitivitas sel terhadap insulin, ataupun keduanya. Kadar glukosa darah dalam jumlah yang tinggi pada jangka waktu yang lama dapat meningkatkan pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Species*) sehingga dapat memperparah kerusakan yang disebabkan oleh stress oksidatif (Susilawati, dkk., 2017). Pada tahun 2018, jumlah dari penderita diabetes di Indonesia mencapai 10,9% penduduk Indonesia dan meningkat setiap tahunnya (Balitbang Kemenkes, 2018).

Kerusakan oksidatif pada pengidap diabetes dapat ditinjau secara langsung pada histologi organ limpa. Kadar radikal bebas yang tinggi pada sel limfosit menyebabkan peningkatan kadar sitokin pro-inflamasi dan berakibat pada kematian sel limfosit yang terprogram (Ebaid, dkk., 2015). Penelitian Warif, dkk. (2014) menunjukkan bahwa jumlah sel limfosit mencit diabetes lebih rendah yaitu $1,17 \pm 0,24 (\times 10^7)$ sel dibandingkan dengan jumlah sel limfosit mencit sehat yaitu $2,25 \pm 0,1 (\times 10^7)$ sel. Kerusakan sel limfosit akan menurunkan imunitas tubuh dan dengan adanya infeksi kuman dapat memperparah komplikasi diabetes mellitus

yaitu ulkus diabetikum (Dewi, dkk., 2014). Sehingga diperlukan komponen antioksidan yang memiliki efek hipoglikemia dan dapat menekan terjadinya kondisi stress oksidatif.

Penelitian Malini, dkk. (2019) menunjukkan bahwa kandungan senyawa bioaktif ekstrak etanol kulit jengkol meliputi senyawa golongan alkaloid, steroid, triterpenoid, saponin, flavonoid, dan tanin berperan sebagai antioksidan dan dapat memperbaiki kerusakan struktur histologi limpa. Mencit diabetes memiliki jumlah sel limfosit nekrosis $242,75 \pm 3,86$ sel dengan skor kerusakan histologi $7,50 \pm 1,29$ sedangkan mencit diabetes yang diberikan ekstrak etanol kulit jengkol dengan dosis 1540 mg/Kg BB memiliki jumlah sel limfosit nekrosis $181,75 \pm 5,32$ sel dengan skor kerusakan histologi $5,50 \pm 0,58$ dan lebih mendekati jumlah sel limfosit nekrosis mencit normal yaitu $131,50 \pm 3,42$ sel dengan skor kerusakan histologi $1,50 \pm 1,00$. Penelitian Wahyuni dan Munawaroh (2015) menyatakan kandungan antioksidan pada ekstrak etanol bekatul beras hitam dosis 200 mg/Kg BB dapat menurunkan 71,32% kadar glukosa darah tikus diabetes menjadi 131,33 mg/dL. Penelitian Sholeha (2019) menunjukkan bahwa kandungan antioksidan yang berupa tokoferol, tokotrienol, γ -orizanol yang terkandung dalam ekstrak etanol bekatul dapat menurunkan kadar glukosa darah mencit. Mencit diabetes memiliki kadar glukosa darah 278,5 mg/dL sedangkan mencit diabetes yang diberikan ekstrak etanol bekatul dengan dosis 400 mg/Kg BB memiliki kadar glukosa darah 177,75 mg/dL dan lebih mendekati kadar glukosa darah mencit normal yaitu 84,4 mg/dL. Antioksidan dalam bekatul dapat meredam efek dari kerusakan oksidatif sel β -pankreas seperti nekrosis sel dan mengembalikan fungsi sel β -pankreas sebagai penghasil hormon insulin (Posuwan, dkk., 2013).

Pemilihan pelarut dengan kepolaran yang sesuai meningkatkan keefektifitasan ekstraksi sehingga kandungan bioaktif bekatul terekstrak lebih banyak dan memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi. Purwanto, dkk. (2014) menyatakan bahwa ekstraksi bekatul dengan pelarut etanol menghasilkan rendemen paling tinggi mencapai 17,431% dibandingkan dengan pelarut n-heksana dengan rendemen 10,164% dan etil asetat dengan rendemen 11,846%. Penelitian tersebut juga menyatakan bahwa aktivitas antioksidan yang diuji dengan metode DPPH paling tinggi terdapat pada ekstrak etanol 96% mencapai 47,290% dibandingkan dengan ekstrak n-heksana yang memiliki aktivitas sebesar 12,315% dan ekstrak etil asetat yang memiliki aktivitas sebesar 28,078%.

Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan penelitian tentang pengaruh ekstrak etanol 95% bekatul yang telah terfermentasi *Rhizopus oryzae* terhadap kadar glukosa darah dan histologi limpa mencit diabetes mellitus serta hasil penelitian ini dapat diterapkan sebagai obat alternatif bagi penderita diabetes mellitus.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana pengaruh pemberian ekstrak bekatul terfermentasi terhadap kadar glukosa darah dan histologi limpa mencit ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bekatul terfermentasi terhadap kadar glukosa darah dan histologi limpa mencit.

1.4 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah bekatul beras putih yang diambil dari penggilingan padi di daerah Malang.
2. Ekstraksi bekatul terfermentasi menggunakan pelarut etanol 95% dengan metode maserasi.
3. Mencit yang digunakan adalah mencit galur Balb/C
4. Induksi diabetes menggunakan aloksan dosis 200 mg/Kg BB.
5. Dosis ekstrak bekatul terfermentasi yang diinduksikan pada mencit adalah 100 dan 200 mg/Kg BB.
6. Pewarnaan preparat menggunakan pewarna Hematoksilin-eosin.

1.5 Manfaat Penelitian

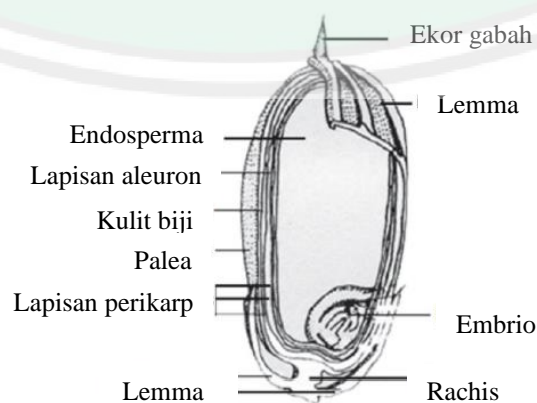
Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk kedepannya dengan diketahui tingginya kandungan antioksidan dalam bekatul yang dapat dimanfaatkan sebagai antidiabetes. Selain itu, penelitian ini diharapkan dapat membantu pihak medis sebagai bahan tambahan atau zat pelengkap obat yang alami sehingga dapat meminimalisir dampak-dampak buruk yang dihasilkan oleh tambahan obat sintetis.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bekatul

Bekatul merupakan bagian terluar bulir beras yang terbuang selama proses penyosohan beras. Presentase bekatul dari proses penggilingan bulir padi tergantung oleh beberapa faktor seperti laju penggilingan dan jenis beras. Penggilingan ideal akan menghasilkan 8-12% bekatul. Morfologi bekatul terdiri atas lapisan perikarp, testa, dan lapisan aleuron. Pada lapisan tersebut, terkandung sejumlah nutrisi seperti protein, lemak, serat pangan, sejumlah vitamin, dan berbagai mineral. Bekatul mengandung berbagai asam amino yaitu triptofan, histidin, sistein, dan agrinin. Bekatul mengandung serat pangan yang terdiri atas selulosa, hemiselulosa, pektin, arabinosilan, lignin, dan beta-glukan. Kandungan bioaktif dari bekatul antara lain adalah γ -orizanol, asam ferulat, asam linoleat, asam kafeat, trisin, asam kumarat, asam fitat, isoform vitamin E (α -tokoferol, γ -tokoferol, dan tokotrienol), fitosterol (β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol), dan kartenoid (α -karoten, β -karoten, lutein, likopen). Bagian-bagian dari struktur beras dapat dilihat pada **Gambar 2.1** (Tuarita, dkk., 2017).



Gambar 2.1 Struktur Beras (Tuarita, dkk., 2017)

Moongngarm, dkk. (2012) menyatakan bahwa bekatul merupakan bagian yang bernutrisi dan merupakan sumber utama senyawa bioaktif diantaranya adalah senyawa fenolik, asam fitat, γ -orizanol, α -tokoferol, γ -tokoferol. Kandungan senyawa bioaktif dalam bekatul berpotensi sebagai antioksidan. Senyawa aktif tersebut dapat memberikan fungsi fisiologis sebagai agen pencegah penyakit degeneratif. Kandungan senyawa bioaktif dan zat lain pada bekatul dapat dilihat pada **Tabel 2.1**.

Tabel 2.1 Kandungan Bekatul

Kandungan	Jumlah
Senyawa fenolik	1,57 mg/g
Asam fitat	50,68 mg/g
γ orizanol	3,5 mg/g
α tokoferol	46,12 μ g/g
γ tokoferol	40,94 mg/g
Lemak	18,80%
Protein	13,66%
Karbohidrat	40,63%
Serat	12,48%
Kadar abu	10,65%

(Sumber: Moongngarm, dkk., 2012)

Kandungan asam amino, serat pangan, dan senyawa bioaktif bekatul yang begitu beragam merupakan salah satu bentuk kuasa Allah Swt. Bekatul yang merupakan bagian dari kulit padi berpotensi memberikan manfaat berlimpah bagi manusia. Hal tersebut telah tersirat pada firman Allah Swt. dalam Al-Qur'an surat Qaf ayat 9:

وَنَزَّلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً مُّبْرَكًا فَأَنْبَتْنَا بِهِ جَنَّاتٍ وَحَبَّ الْحَصِيدِ ۙ

Artinya: “Dan dari langit Kami turunkan air yang memberi berkah, lalu Kami tumbuhkan dengan (air) itu, pepohonan yang rindang dan biji-bijian yang dapat dipanen”

Ayat tersebut merupakan paparan bukti kuasa Allah Swt. atas penciptaan langit dan bumi. Air yang berasal dari bumi akan menguap ke angkasa kemudian Allah menurunkan karunia-Nya dengan menurunkan air membasahi tanah. Tanah tersebut akan menjadi subur dan dari air tersebut, Allah menumbuhkan berbagai tumbuhan, bunga, dan biji-bijian seperti padi yang kemudian dapat dipanen dan disimpan (Shihab, 2002). Tujuan ditumbuhkannya aneka macam tumbuhan adalah berkah dari Allah Swt. supaya manusia senantiasa memahami dan memanfaatkan segala sesuatu hasil ciptaan Allah. Allah berfirman dalam surat Ar-Rahman ayat 12-13:

وَالْحَبُّ ذُو الْعَصْفِ وَالرَّيْحَانُ ﴿١٢﴾ فَبِأَيِّ آلَاءِ رَبِّكُمَا تُكَذِّبِينَ ﴿١٣﴾

Artinya: *“Dan biji-bijian yang berkulit dan bunga-bunga yang harum baunya (12) Maka nikmat Tuhanmu manakah yang kamu dustakan?(13)”*

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah telah memberikan bahan pangan dan kenyamanan hidup makhluk-Nya. Bahan pangan yang dimaksud merupakan bahan pangan pokok seperti beras dan gandum. Segala sesuatu yang ada di bumi dapat dimanfaatkan oleh manusia selama tidak menghalangi pemanfaatan bumi untuk makhluk lain. Tidak hanya beras yang dapat dimanfaatkan, bekatul yang merupakan bagian kulit dari padi juga dapat dimanfaatkan karena kandungan senyawa bioaktif dan zat lain yang berlimpah. Dengan demikian, maka manusia hendaknya bersyukur atas keagungan nikmat serta banyaknya manfaat yang diciptakan Allah Swt. untuk penerimanya atau manusia (Shihab, 2002).

Kandungan antioksidan dalam bekatul dapat mencegah penyakit yang disebabkan oleh stress oksidatif seperti diabetes mellitus, jantung koroner, kanker, dan stroke. Kandungan vitamin E mampu mencegah adanya kerusakan dinding sel. Kandungan peptida dan tokotrienol memiliki aktivitas kemopreventif terhadap kanker hati. Kandungan serat pangan, asam lemak tak jenuh, dan γ orizanol memiliki aktivitas hipokolesterolemik (Astawan dan Febrinda, 2010).

Penelitian Siddiqui, dkk. (2015) menyatakan bahwa pemberian ekstrak metanol bekatul dengan dosis 200 mg/Kg BB/ hari pada tikus diabetes selama 8 minggu dapat menurunkan kadar glukosa darah puasa dan memberikan penurunan volume hipertrofi glomerular hingga 81%. Kandungan tokotrienol dalam ekstrak bekatul memberikan efek hipoglikemik dan efek protektif terhadap stress oksidatif.

2.2 Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus merupakan suatu sindrom yang ditandai dengan tingginya kadar glukosa darah (hiperglikemia) kronis. Hal tersebut dikarenakan adanya gangguan produksi, sekresi insulin, atau resistensi insulin. Keadaan tersebut akan berimbas pada gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein yang akan menyebabkan terjadinya komplikasi mikrovaskuler yang spesifik, penyakit mikrovaskuler sekunder pada perkembangan aterosklerosis, dan beberapa komplikasi lain seperti mikroangiopati maupun makroangiopati (Nugroho, 2006).

Patofisiologi diabetes mellitus yang diakibatkan oleh kurangnya insulin dalam tubuh dapat berupa beberapa hal. Terjadinya pengurangan penggunaan

glukosa oleh sel-sel menyebabkan sel-sel tubuh akan memanfaatkan lemak serta protein sebagai sumber energi pengganti yang akan menyebabkan gangguan metabolisme lemak dan protein serta mengakibatkan pengurangan massa lemak dan protein dalam jaringan tubuh. Kadar glukosa darah normal adalah 60-100 mg/dL. Hasil pemeriksaan glukosa darah sewaktu ≥ 200 mg/dL dan glukosa darah puasa ≥ 126 mg/dL dapat menjadi diagnosis awal penderita diabetes mellitus (Setiadi, 2007).

Pengobatan yang dapat diberikan terhadap penderita diabetes dapat melalui obat hipoglikemik oral, terapi insulin, atau terapi kombinasi. Obat hipoglikemik oral yang biasa digunakan adalah obat golongan sulfonilurea, meglitinida, turunan fenilalanin, tiazolidindion, dan inhibitor α -glukosidase. Pengobatan tersebut memerlukan biaya yang cukup tinggi dan memiliki efek samping apabila diberikan dalam jangka waktu yang lama. Klasifikasi tipe diabetes mellitus berdasarkan penyebab terjadinya diabetes mellitus dapat dilihat seperti pada **Tabel 2.2** (Depkes RI, 2005).

Tabel 2.2 Klasifikasi Diabetes Mellitus

No	Diabetes Mellitus	Penyebab
1	Tipe 1	Kerusakan sel β -pankreas yang menyebabkan defisiensi insulin oleh senyawa toksin, diabetogenik, atau faktor genetik.
2	Tipe 2	Penurunan respons jaringan terhadap insulin atau resistensi insulin dan penurunan respons sel β -pankreas terhadap beban glukosa.
3	Gestasional	Muncul pada masa kehamilan dan bersifat sementara.
4	Tipe lain	Kelainan genetik pada fungsi sel β -pankreas atau kerja insulin, penyakit eksokrin pankreas, infeksi, trauma, beberapa sindrom, dan efek konsumsi beberapa obat.

(Sumber: Depkes RI, 2005).

Kadar glukosa darah yang tinggi pada penderita diabetes memperparah kondisi stress oksidatif melalui tiga mekanisme diantaranya adalah sebagai berikut (Setiawan dan Suhartono, 2005):

1. Glikasi non-enzimatik pada protein

Kelimpahan glukosa sebagai gula pereduksi bersifat toksik karena terdapatnya gugus karbonil aldehid. Gugus aldehid atau ketosa pada glukosa akan berikatan secara kovalen dengan gugus amino bebas pada protein atau asam nukleat melalui reaksi glikasi Maillard membentuk senyawa *Advance Glycosylation End Products (AGE-products)*. Senyawa AGEs yang terakumulasi merupakan sumber radikal bebas yang dapat memperparah stress oksidatif. Senyawa AGEs berikatan dengan reseptor makrofag spesifik menyebabkan sintesis sitokin.

2. Autooksidasi glukosa

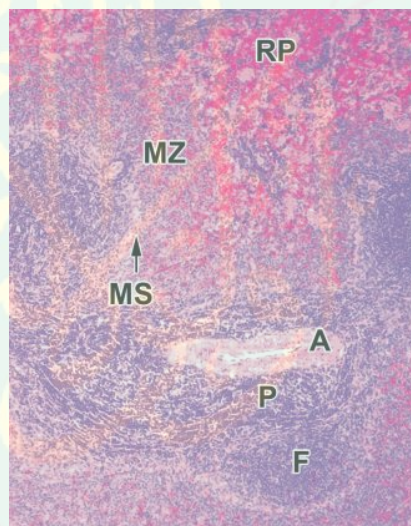
Proses autooksidasi glukosa dikatalis oleh logam Cu dan Fe menghasilkan radikal superoksida dan hidrogen peroksida. Produksi hidrogen peroksida dapat menghambat kerja Cu/ZnSOD. Autooksidasi glukosa terjadi pada proses kondensasi aldehid atau gula pereduksi dengan asam amino bebas protein.

3. Jalur poliol-sorbitol.

Glukosa berlebih akan dimetabolismekan melalui jalur poliol. Glukosa akan diubah menjadi polialkohol sorbitol dengan bantuan enzim aldose reduktase melalui reduksi gugus aldehid glukosa. Hal tersebut menurunkan rasio NADPH terhadap NADP^+ sehingga menghambat aktivitas enzim lain yang membutuhkan NADPH. Degradasi sorbitol berjalan secara lambat sehingga penumpukan sorbitol menyebabkan meningkatnya tekanan osmotik dan menyebabkan lisisnya sel.

2.3 Organ Limpa

Limpa merupakan salah satu organ pertahanan tubuh yang berwarna merah tua sampai biru kehitaman yang berada pada abdomen kiri. Limpa memiliki fungsi memfiltrasi darah dan mengkoordinasi respons imun. Secara histologi limpa terdiri dari 2 bagian yaitu stroma dan parenkim. Bagian stroma terdiri dari kapsula dan trabekula, sedangkan parenkim limpa terdiri dari pulpa putih (*white pulp*) merupakan sistem kekebalan untuk melawan infeksi dan pulpa merah (*red pulp*) bertugas membuang bahan-bahan yang tidak diperlukan dari dalam darah seperti sel darah merah yang rusak (Guyton dan Hall, 2006).



Gambar 2.2 Histologi Limpa Tikus Jantan. A= Arteri Sentral, P= *Pariarteriolar Lymphoid Sheath* (PALS), F= Folikel Limfoid, MZ= Zona Marginal, MS= Zona Marginal Sinus. RP= Pulpa Merah (*Red Pulp*) (Cesta, 2006).

Pulpa merah terdiri dari sel makrofag, sel plasma, dan elemen darah. Pigmen besi (hemosiderin dan ferritin) merupakan pigmen yang umum ditemukan pada pulpa merah. Pulpa putih terdiri dari makrofag, sel dendritik, sel plasma, sel limfosit yang tersusun padat di dalamnya, dan arteri sentralis pada bagian

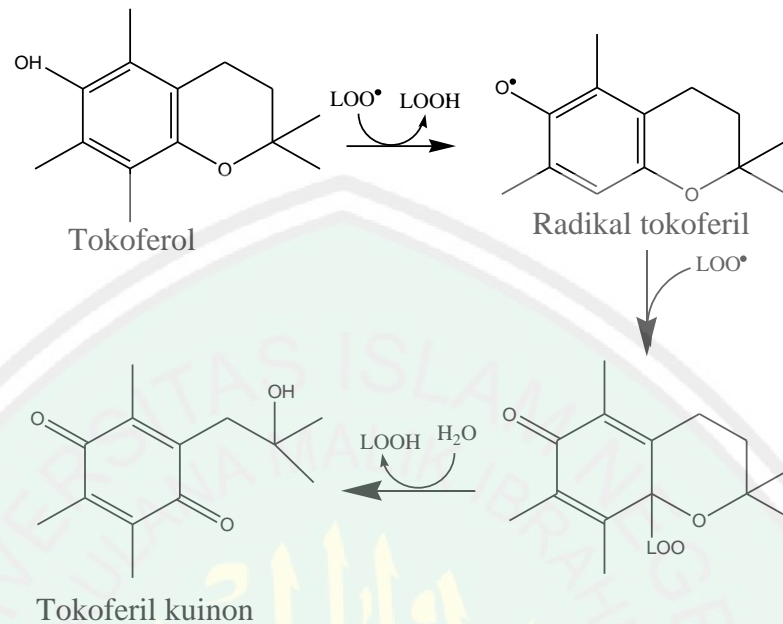
tengahnya (Cesta, 2006). Pulpa putih merupakan jaringan limfatik yang menyebar di seluruh limpa sebagai nodulus limpa dan seperti selubung limfatik periarterial. Serabut retikuler dan sel retikuler membentuk jalinan stroma dalam tiga dimensi mengandung pecahan limfosit, makrofag dan sel lain mirip dengan yang terlihat pada limfoglandula (Setiasih, dkk., 2011). Ciri-ciri histologi limpa normal diantaranya adalah pada pulpa merah (pulpa rubra) tidak terjadi kongesti sedangkan pada pulpa putih (pulpa alba) sel limfosit yang tersusun rapat dan arteri sentralis tidak melebar (Matheos, dkk., 2013).

2.4 Antioksidan

Setiawan dan Suhartono (2005) menyatakan bahwa antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron terhadap radikal bebas ataupun ROS. Sedangkan pengertian antioksidan secara biologis, antioksidan merupakan semua senyawa yang dapat menurunkan atau meredam dampak dari penyebab stress oksidatif dengan cara menghambat dan menghentikan kerusakan oksidatif dari molekul target.

Salah satu antioksidan yang terkandung dalam bekatul adalah vitamin E. Vitamin E merupakan antioksidan dari golongan steroid yang dapat meredam radikal lipofilik. Vitamin E memiliki struktur tokoferol dengan gugus metil dan satu rantai fetil. Dari berbagai isoform vitamin E, α -tokoferol merupakan antioksidan yang paling kuat. Vitamin E dapat menghentikan reaksi penyebaran radikal bebas karena bentuk radikal bebasnya (radikal tokoferil) yang terstabilkan oleh resonansi. Vitamin E akan berinteraksi langsung dengan radikal peroksi lemak yang menyebabkan lepasnya atom hidrogen dan membentuk tokoferil

kuinon yang teroksidasi sempurna (Marsk, 2000 dalam Sholeha, 2019). Reaksi peredaman radikal bebas oleh tokoferol seperti pada **Gambar 2.3**.

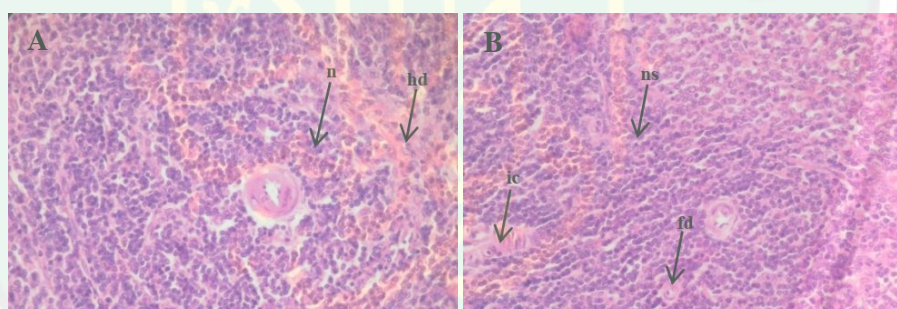


Gambar 2.3 Reaksi Peredaman Radikal Bebas Oleh Vitamin E (Marsk, 2000 dalam Sholeha, 2019)

Vitamin E merupakan salah satu antioksidan yang memiliki efek hipoglikemik dengan cara meredam radikal bebas. Vitamin E dapat memperbaiki sistem transpor glukosa dan dapat meningkatkan sensitivitas sel terhadap insulin. Selain itu, konsumsi vitamin E dapat meningkatkan kadar GSH (*Glutation*) dalam sel darah merah dan meningkatkan rasio antara GSH/GSSG plasma. Konsumsi vitamin E juga dapat mengurai proses glikosidasi protein serum dan hemoglobin serta menurunkan aktivitas protein kinase C yang berkaitan langsung dengan produksi senyawa oksigen reaktif (Setiawan dan Suhartono, 2005).

2.4.1 Pengaruh Radikal Bebas Pada Histologi Limpa dan Glukosa Darah

Radikal bebas merupakan senyawa yang memiliki elektron tidak berpasangan yang menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif. Salah satu radikal bebas yang terdapat dalam tubuh manusia adalah *Reactive Oxygen Species* (ROS). Spesies oksigen reaktif bersifat patogenesis terhadap sel salah satunya pada sel limfosit. ROS menyebabkan terjadinya inflamasi dan disfungsi sel. Adanya peningkatan ROS di dalam mitokondria dapat menyebabkan terjadinya kerusakan *deoxyribonucleic acid* (DNA). Tingginya ROS yang tidak diseimbangi dengan peningkatan antioksidan menyebabkan sel rentan terhadap stress oksidatif (Retnaningsih, dkk., 2013). Perbandingan histologi limpa tikus normal dan limpa tikus yang terpapar radikal bebas seperti pada **Gambar 2.4**.



Gambar 2.4 Histologi Limpa Tikus Normal (A) dan Tikus Terpapar Radikal Bebas (B). fd= degenerasi lemak, hd= degenerasi hidropik, ic= sel inflamasi n= sel normal, ns= sel nekrosis (Malini, dkk., 2019).

Morfologi sel yang mengalami nekrosis memberikan ciri-ciri diantaranya adalah adanya pembengkakan sel atau inti sel, kariolisis, karioreksis, piknosis, dan sitoplasma yang pucat (Elmore, dkk, 2016). Histologi limpa tikus normal menunjukkan adanya sel limfosit yang mengalami nekrosis dan degenerasi hidropik. Sedangkan histologi limpa tikus yang terpapar radikal bebas

(streptozotocin) menunjukkan adanya sel limfosit yang mengalami nekrosis, degenerasi hidropik, dan inflamasi sel. Degenerasi hidropik terjadi karena adanya gangguan pada membran sel sehingga fluida masuk pada sitoplasma. Sitoplasma akan terlihat bengkak, pucat, bening, dan terkandung banyak air. Infiltrasi sel inflamasi terjadi karena adanya respons sel terhadap beberapa kelainan akibat aktivasi termoregulator tubuh. Sel yang mengalami inflamasi melepaskan beberapa senyawa biokimia seperti senyawa hormon glukokortikoid dan sitokin. Selama proses inflamasi maka terjadi kenaikan sekresi sitokin, sehingga akan meningkatkan respons peradangan. Pada keadaan peradangan kronis, protein protektif dari proses inflamasi (*heat shock proteins/HSP*) menjadi tidak terkontrol dan menyebabkan peningkatan apoptosis dan nekrosis sehingga menyebabkan penurunan jumlah sel limfosit pada limpa (Malini, dkk., 2019). Pengaruh senyawa radikal diabetogenik terhadap jumlah sel limfosit dapat dilihat pada **Tabel 2.3**.

Tabel 2.3 Pengaruh Radikal Terhadap Jumlah Sel Limfosit

Peneliti	Hewan Uji	Senyawa Diabetogenik	Dosis (mg/Kg BB)	Jumlah Sel Limfosit	
				Normal	Terinduksi
Warif, dkk. (2014)	Tikus	Streptozotocin	45	$2,25 \times 10^7$	$1,17 \times 10^7$
Malini, dkk., (2019)	Tikus	Streptozotocin	65	868,5	757,25

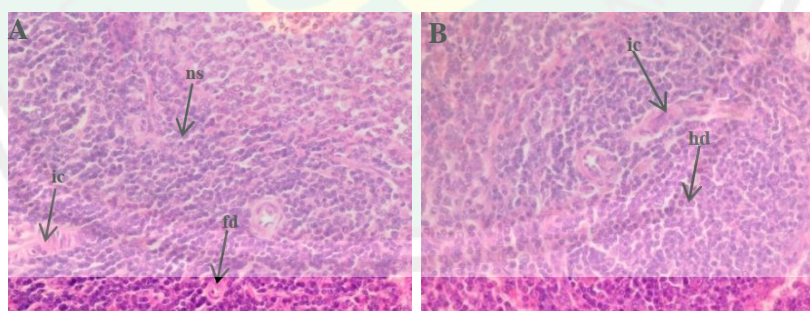
Keadaan stress oksidatif juga terjadi pada sel pankreas yang berfungsi untuk mensekresikan insulin. Kerusakan sel β -pankreas akan menurunkan sekresi insulin. Keadaan tersebut memperparah keadaan hiperglikemia dan semakin meningkatkan kadar glukosa dalam darah (Depkes RI, 2005). Pengaruh senyawa radikal diabetogenik terhadap kadar glukosa darah dapat dilihat pada **Tabel 2.4**.

Tabel 2.4 Pengaruh Radikal Terhadap Kadar Glukosa Darah

Peneliti	Hewan Uji	Senyawa Diabetogenik	Dosis (mg/Kg BB)	Kadar Glukosa Darah (mg/dL)	
				Normal	Terinduksi
Wahyuni dan Munawaroh (2015)	Tikus	Aloksan	150	116,67	442
Ulyah (2019)	Mencit	Aloksan	200	59	544,75

2.4.2 Pengaruh Pemberian Antioksidan Pada Histologi Limpa dan Glukosa Darah

Zhou dkk. (2009) menyatakan bahwa antioksidan merupakan senyawa penstabil radikal bebas. Pemberian antioksidan pada organ yang terpapar radikal bebas dapat menekan atau menunda disfungsi sel. Antioksidan memberikan sifat proteksi dan penyembuhan terhadap organ yang mengalami kerusakan akibat paparan radikal bebas. Perbandingan histologi limpa mencit yang terpapar radikal bebas dan limpa mencit yang diberi pengobatan antioksidan seperti pada **Gambar 2.5** (Posuwan, dkk., 2013).



Gambar 2.5 Histologi Limpa Tikus Terpapar Radikal Bebas (A) dan Tikus Terpapar Radikal Bebas Diterapi dengan Ekstrak kulit Jengkol (B). fd= degenerasi lemak, hd= degenerasi hidropik, ic= sel inflamasi, ns= sel nekrosis (Malini, dkk., 2019).

Pemberian asupan antioksidan pada tikus yang terpapar radikal bebas memberikan efek perbaikan pada sel limfosit pada limpa. Perbaikan pada sel yang rusak ditandai dengan pemulihan sebagian sel, adanya pengurangan nekrosis sel limfosit, dan perbaikan sel yang terdampak berdasarkan degenerasi lemak, degenerasi hidropik, dan infiltrasi sel inflamasi. Perbaikan tersebut menyebabkan adanya peningkatan jumlah sel limfosit. Tikus yang terpapar radikal bebas memiliki jumlah sel limfosit 757,25 per 1000 sel limfosit dan tikus yang terpapar radikal bebas yang telah diterapi dengan ekstrak kulit jengkol memiliki jumlah sel limfosit 818,25 per 1000 sel limfosit. Antioksidan seperti flavonoid dapat menghambat reaksi inflamasi sehingga dapat menekan makrofag dan menekan terjadinya kerusakan sel (Malini, dkk., 2019).

Antioksidan dapat berperan untuk menurunkan kadar glukosa darah. Antioksidan dapat diperoleh dari metabolit sekunder bagian tumbuh-tumbuhan. Senyawa antioksidan dalam golongan fenol mempunyai kemampuan meningkatkan sekresi insulin. Sedangkan senyawa antioksidan golongan flavonoid dan tanin dapat menghambat kerja α -glukosidase sehingga penyerapan glukosa dan laju peningkatan glukosa dalam sistem pencernaan dapat ditekan (Yuda, dkk., 2015). Senyawa golongan alkaloid dapat meregenerasi sel β -pankreas yang rusak sehingga terjadi peningkatan insulin dalam tubuh dan dapat mengontrol kadar glukosa dalam darah. Saponin dapat menciutkan selaput lendir dinding mukosa lambung dan dengan dibantu oleh senyawa golongan alkaloid dan flavonoid maka penyerapan glukosa dapat diminimalisir. Senyawa tanin dapat memicu metabolisme glukosa dan lemak sehingga meminimalisir timbunan kalori di dalam darah, selain itu tanin berfungsi sebagai pengkhelet yang dapat

mengerutkan membran epitel usus halus sehingga menghambat penyerapan sari-sari makanan (Tandi, dkk., 2017). Pengaruh pemberian antioksidan terhadap kadar glukosa darah dapat dilihat pada **Tabel 2.5**.

Tabel 2.5 Pengaruh Antioksidan Terhadap Kadar Glukosa Darah

Peneliti	Hewan Uji	Ekstrak	Dosis (mg/Kg BB)	Lama Perlakuan	Kadar Glukosa Darah	
					Kontrol (-)	Kelompok perlakuan
Datusalia, dkk. (2012)	Tikus	<i>Sida tiagii</i>	500	19 hari	215,838	108,850
Wahyuni dan Munawaroh (2015)	Mencit	Bekatul beras hitam	50	10 hari	295,33	365,67
			100			139
			200			131,33
Ulyah (2019)	Mencit	Bekatul	350	14 hari	278,5	299,75
			400			177,75
			500			266,75

2.5 Fermentasi

Fermentasi merupakan proses perubahan kimia yang diakibatkan oleh metabolisme mikroorganisme melalui aktivitas enzim dan menyebabkan terjadinya perubahan kimia substrat organik kompleks menjadi molekul yang lebih sederhana (Radji, 2011). Kurniati, dkk. (2017) menyatakan bahwa selama proses fermentasi, mikroba akan menyintesis beberapa enzim yang dapat mendegradasi ikatan senyawa fenolik terikat pada komponen sel seperti dinding sel, dan vakuola. Enzim β -glukosidase yang dihasilkan oleh mikroba fermentasi akan mendegradasi glikon menghasilkan senyawa aglikon fenolik bebas. Proses degradasi senyawa fenolik yang terikat pada berbagai komponen sel akan meningkatkan aktivitas antioksidan. Peningkatan aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh mikroba fermentasi. Beberapa penelitian yang menunjukkan

peningkatan aktivitas antioksidan bekatul oleh mikroba fermentasi dapat dilihat pada **Tabel 2.6**.

Tabel 2.6 Peningkatan Aktivitas Antioksidan Bekatul

Peneliti	Mikroba Fermentasi	Lama Fermentasi (jam)	Aktivitas Antioksidan (%)*	
			Tanpa Fermentasi	Terfermentasi
Zubaidah dan Aldina (2010)	<i>L. plantarum</i> J2	12	72,71	88,86
	<i>L. casei</i>		70,31	85,41
Zubaidah, dkk. (2012)	<i>L. plantarum</i> B2	12	73,95	86,41
	<i>L. acidophilus</i>		71,74	82,52
Oliveira, dkk. (2011)	<i>R. oryzae</i>	96	35,08	66,09

*uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH

Tabel 2.6 menunjukkan bahwa fermentasi dengan *Rhizopus oryzae* meningkatkan aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan mikroba fermentasi lainnya. Metode fermentasi disesuaikan dengan substrat dan mikroba fermentasi. Metode fermentasi yang sesuai dengan substrat bekatul dan mikroba *Rhizopus oryzae* adalah metode SSF (*Solid State Fermentation*). Metode tersebut memiliki keunggulan diantaranya produktivitas fermentasi yang tinggi, konsentrasi produk yang dihasilkan tinggi dan lebih stabil, serta aktivitas air yang digunakan rendah dapat meminimalisir aktivitas sterilitas (Maftukhah, 2020). Adanya penambahan air pada proses fermentasi menyebabkan produk hasil fermentasi memiliki kadar air yang cukup tinggi sehingga perlu dilakukan pengeringan. Metode pengeringan berhubungan dengan aktivitas antioksidan. Semakin tinggi suhu pengeringan menyebabkan terjadinya kerusakan senyawa bioaktif yang tidak tahan panas. Penelitian Husni, dkk. (2014) menunjukkan bahwa pengeringan rumput laut *Padina sp.* pada suhu 50°C menghasilkan total

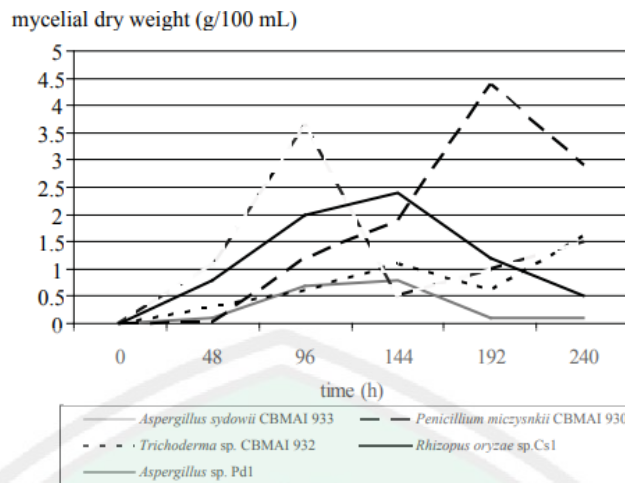
senyawa fenolik yang lebih tinggi dibandingkan pengeringan pada suhu 55°C dan 60°C. Sedangkan penelitian Wianingsih, dkk. (2013) menunjukkan bahwa pengeringan lempuyang wangi menggunakan oven suhu 50°C menghasilkan rendemen lebih tinggi dibandingkan dengan pengeringan menggunakan metode kering angin dan menggunakan sinar matahari secara langsung.

2.5.1 *Rhizopus oryzae*

Salah satu kapang yang biasa digunakan pada proses fermentasi adalah kapang *Rhizopus oryzae*. Kapang ini memiliki karakteristik fisik yaitu memiliki miselia berwarna putih dan ketika dewasa akan berubah warna menjadi abu-abu kecokelatan dikarenakan tertutup oleh sporangium. Taksonomi kapang *Rhizopus oryzae* adalah sebagai berikut (Germain dan Summerbell, 2006):

Kingdom	: Fungi
Divisi	: Zygomycota
Kelas	: Zygomycotes
Ordo	: Mucorales
Famili	: Mucoraceae
Genus	: <i>Rhizopus</i>
Spesies	: <i>Rhizopus oryzae</i>

Media pertumbuhan kapang yang sesuai adalah PDA (*potato dextrose agar*) karena komponen nutrisi pada media tersebut sesuai dengan nutrisi yang dibutuhkan oleh kapang. Waktu pertumbuhan kapang pada umumnya lebih lama dibandingkan dengan waktu tumbuh bakteri. Waktu tumbuh kapang dibagi atas beberapa fase yaitu fase lag (adaptasi), fase log (eksponensial), fase stasioner, fase kematian dipercepat, dan fase kematian. Kurva pertumbuhan kapang *Rhizopus oryzae* seperti pada **Gambar 2.6** (Melgar, dkk., 2013).



Gambar 2.6 Kurva Pertumbuhan Kapang *Rhizopus oryzae* (Melgar, dkk., 2013)

Kapang *Rhizopus oryzae* memiliki fase log terpendek diantara kapang jenis lain. Pada fase log terjadi produksi miselium tertinggi yaitu pada waktu 48 sampai 96 jam masa inkubasi. Penurunan massa miselium dimulai pada waktu 144 jam masa inkubasi. Berdasarkan kurva pertumbuhan tersebut dapat diamati fase-fase pertumbuhan kapang yaitu fase lag (0-48 jam), fase log (48-96 jam), fase stasioner (96-144 jam), fase kematian dipercepat (144-192 jam), dan fase kematian (192-240 jam) (Melgar, dkk., 2013). Kapang akan memproduksi metabolit seperti enzim dengan jumlah besar ketika kapang memasuki fase log. Pada fase log, pembelahan kapang terjadi secara cepat dan menghasilkan metabolit pertumbuhan dengan maksimal dibandingkan ketika memasuki fase stasioner yang lebih menghasilkan metabolit untuk pertahanan diri (Suprihatin, 2010).

Terdapat beberapa faktor yang memengaruhi proses fermentasi, yaitu :

1. Lama Fermentasi

Lama fermentasi optimal berbeda-beda tergantung jenis mikroba yang digunakan pada proses fermentasi. Lama fermentasi bekatul menggunakan

mikroba *Rhizopus oryzae* menghasilkan jumlah aktivitas antioksidan tertinggi adalah 5 hari (120 jam) (Fikriyah, 2018).

2. Konsentrasi inokulum

Pemberian konsentrasi inokulum yang optimal akan menghasilkan produk fermentasi yang lebih maksimal. Fermentasi limbah pasar menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis* dengan penambahan inokulum sebanyak 10 % menghasilkan produksi etanol dengan kadar paling tinggi (Kusumaningati, dkk., 2013).

3. Konsentrasi substrat

Perbandingan antara bekatul (substrat) dengan air yaitu 1:1 menghasilkan nilai aktivitas antioksidan tertinggi (Fikriyah, 2018).

4. Suhu fermentasi

Suhu diatas 37°C *Rhizopus oryzae* akan membentuk morfologi *yeast-like*. Morfologi tersebut akan menghasilkan produksi enzim endoglukanase yang optimum dibandingkan dengan morfologi filamen pada fermentasi suhu dibawah 34°C (Karmakar, dkk., 2012).

5. Oksigen

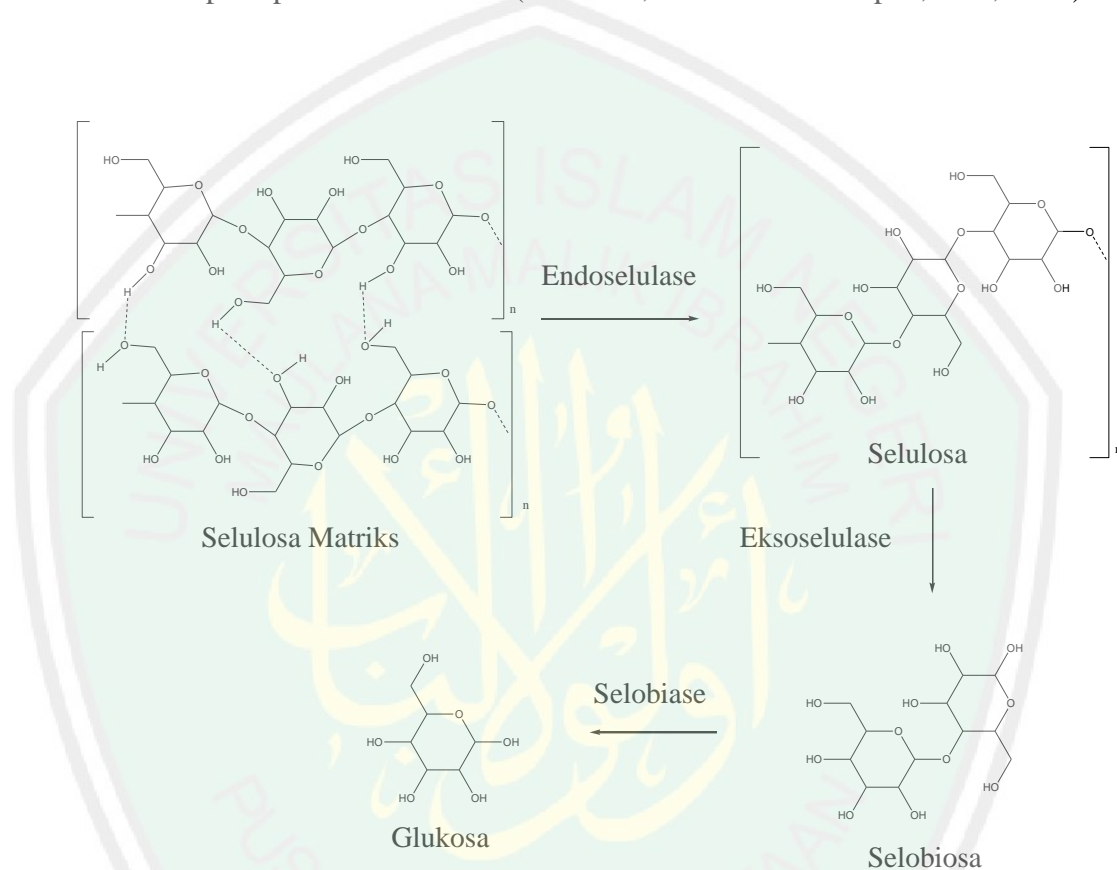
Ketersediaan oksigen berpengaruh pada sifat mikroba yang digunakan. Aerasi diperlukan bagi mikroba yang memiliki sifat aerobik (Suprihatin, 2010)

6. pH substrat

pH fermentasi optimal tergantung pada jenis mikroba fermentasi yang digunakan. *Rhizopus oryzae* dapat tumbuh pada kisaran pH 4-8 dan tumbuh optimum pada pH 6 (Karmakar, dkk., 2012).

Kapang dari genus *Rhizopus* dapat meningkatkan kadar total fenolik yang terikat pada serat substrat. Enzim selulase pada kapang *Rhizopus oryzae* dapat

menghidrolisis selulosa menjadi oligosakarida yang lebih sederhana. Pada proses hidrolisis, ikatan senyawa bioaktif yang terikat pada selulosa akan melemah dan dapat terlepas sehingga dapat meningkatkan kadar senyawa bioaktif pada hasil fermentasi (Amalia, 2016). Dugaan mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase seperti pada **Gambar 2.7** (Whithers, 1995 dalam Saropah, dkk., 2012).



Gambar 2.7 Mekanisme Enzim Selulase (Whithers, 1995 dalam Saropah, dkk., 2012)

Proses hidrolisis selulosa matriks dibantu oleh enzim ekstraseluler antara lain endo β -1,4-glukanase, ekso β -1,4-glukanase, dan β -glukosidase. Enzim endo β -1,4-glukanase akan menghidrolisis selulosa matriks menjadi selulosa yang lebih sederhana. Tahapan selanjutnya adalah enzim ekso β -1,4-glukanase akan menghidrolisis selulase menjadi disakarida selobiosa. Tahap terakhir yaitu selobiosa dihidrolisis dengan β -glukosidase menjadi glukosa. Proses hidrolisis

tersebut juga akan membebaskan senyawa fenolik terikat pada bekatul dan akan terjadi penurunan kadar serat bekatul (Saropah, dkk., 2012).

2.6 Hewan Coba Mencit (*Mus musculus*)

Mencit (*Mus musculus*) merupakan hewan coba yang biasa digunakan sebagai penunjang dalam sebuah penelitian terhadap obat-obatan, vaksin, ataupun berbagai penelitian biologi lainnya. Mencit banyak dipakai sebagai hewan coba karena memiliki beberapa keunggulan antara lain adalah sifat anatomi dan fisiologi yang terkarakterisasi secara baik, mudah ditangani, jumlah anak perkelahiran banyak mencapai 10 anak/kelahiran, siklus hidup pendek, serta variasi sifat yang tinggi. Mencit dapat hidup hingga usia 1 sampai 3 tahun tergantung galur dan kepekaan terhadap penyakit dan perubahan lingkungan (Andri, 2007).

Mencit memiliki taksonomi sebagai berikut (Booolotion, 1991):

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

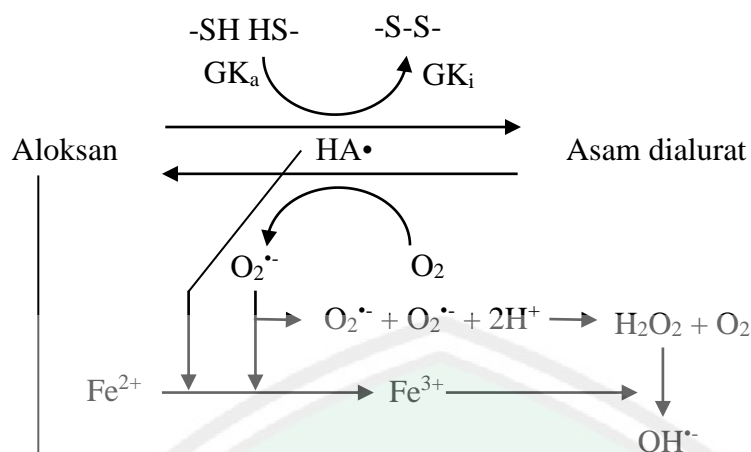


Gambar 2.8 Mencit (*Mus musculus*) (Booolotion, 1991)

Mencit dipilih sebagai hewan coba karena sebagai hewan mamalia, mencit memiliki sistem pernapasan, reproduksi dan peredaran darah yang mirip dengan manusia. Mencit dapat digunakan sebagai hewan coba apabila memenuhi beberapa syarat antara lain adalah bebas dari parasit, memberikan reaksi imunitas yang baik, peka terhadap penyakit, dan nutrisi, kesehatan, kebersihan, pemeliharaan mencit terjaga. Terdapat beberapa mikroorganisme patogen yang bersifat parasit dan sering menginfeksi mencit. Penyakit tersebut diantaranya adalah *toksoplasmolisis*, *Hymenolepis nana*, *Giardia muris*, dan *Taenia taeniaeformis* (Tolistiawaty, dkk., 2014).

2.6.1 Agen Diabetogenik Aloksan

Aloksan digunakan sebagai senyawa toksin untuk pemodelan hewan coba *insulin dependent diabetes mellitus* (IDDM) atau diabetes tipe 1. Aloksan dapat merusak jaringan pankreas melalui aksinya yang merusak sel β pankreas. Kerusakan sel tersebut disebabkan oleh pembentukan oksigen reaktif. Pembentukan oksigen reaktif diawali oleh reduksi aloksan yang terjadi pada sel β pankreas. Proses reduksi aloksan menghasilkan asam dialurat dan teroksidasi kembali menjadi aloksan yang membangkitkan pembentukan oksigen reaktif. Reaksi antara aloksan dengan asam dialurat yang menghasilkan senyawa intermediet radikal aloksan ($HA\bullet$) yang membangkitkan radikal superoksida (Szkudelski, 2001). Mekanisme aloksan dalam pembentukan spesi oksigen reaktif dalam sel β pankreas seperti pada **Gambar 2.9**.



- Memperbesar influx Ca²⁺ dari cairan ekstraseluler
- Memperbesar mobilisasi Ca²⁺ dari tempat penyimpanan intraseluler
- Membatasi pengeluaran Ca²⁺ dari sitoplasma

Gambar 2.9 Mekanisme Aloxsan (Szkudelski, 2001)

Radikal superoksida dapat membebaskan ion ferri dari fenitin yang akan direduksi menjadi ion ferro. Ion ferri juga dapat direduksi oleh radikal aloksan. Radikal superoksida akan mengalami dismutasi menjadi hidrogen peroksida yang dikatalis dengan oleh enzim superoksida dismutase yang berjalan secara spontan. Target kerusakan yang disebabkan oleh oksigen reaktif adalah DNA dari pulau Langerhans pankreas (Szkudelski, 2001).

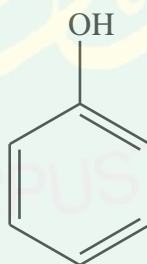
2.7 Uji Fitokimia

Tanaman yang kaya akan senyawa yang memiliki aktivitas biologis (zat bioaktif) memiliki potensi sebagai obat. Zat bioaktif tersebut merupakan zat metabolit sekunder dari tanaman yang meliputi senyawa golongan fenolik, flavonoid, saponin, terpenoid dan steroid, serta alkaloid. Kandungan zat metabolit sekunder tersebut dapat diidentifikasi melalui uji fitokimia (Setyowati, dkk., 2014). Bekatul merupakan salah satu hasil samping tanaman yang mengandung

zat bioaktif. Uji fitokimia bekatul menunjukkan bahwa bekatul memiliki kandungan alkaloid, steroid dan triterpenoid, saponin, dan tanin (Sholeha, 2019). Sedangkan penelitian Moko, dkk. (2014) yang menunjukkan hasil positif pada uji senyawa golongan saponin dan hasil negatif pada uji senyawa golongan steroid. Perbedaan komposisi fitokimia disebabkan oleh perbedaan faktor agronomi, varietas padi, dan proses penggilingan atau derajat sosoh (Hartati, dkk., 2015).

2.7.1 Fenolik

Senyawa golongan fenolik merupakan senyawa yang terdiri atas cincin aromatik dan gugus hidroksil (-OH) satu atau lebih. Senyawa golongan fenolik dapat berperan sebagai antioksidan dan menekan kerusakan stress oksidatif pada sel β -pankreas sehingga dapat meningkatkan sekresi insulin. Keberadaan fenolik dapat diidentifikasi dengan pereaksi FeCl_3 . Fenolik akan membentuk senyawa kompleks dengan ion logam Fe^{3+} dan memberikan warna hijau kehitaman. Struktur inti dari fenolik seperti pada **Gambar 2.10** (Nafisah, dkk., 2014).

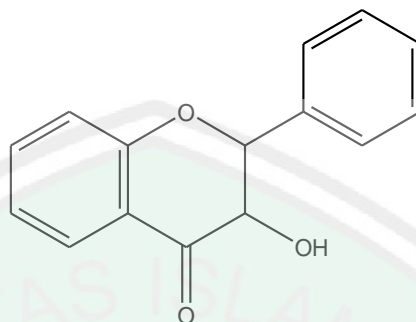


Gambar 2.10 Struktur Inti Fenolik (Nafisah, dkk., 2014)

2.7.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu antioksidan yang sangat efektif dari golongan senyawa polifenol. Flavonoid memiliki struktur inti benzopiron yang dapat direduksi dalam keadaan asam oleh logam. Keberadaan senyawa flavonoid

dapat diidentifikasi melalui uji Wilstater yang ditandai dengan terbentuknya garam flavilium saat ditambahkan dengan logam Mg dan HCl. Struktur inti dari flavonoid seperti pada **Gambar 2.11** (Sumardjo, 2009).



Gambar 2.11 Struktur Inti Flavonoid (Sumardjo, 2009)

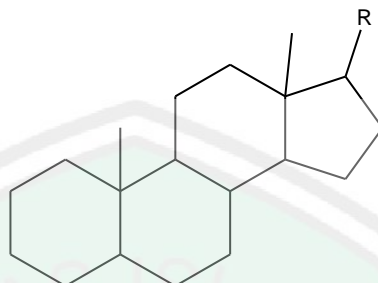
2.7.3 Saponin

Saponin merupakan metabolit sekunder tanaman yang memiliki struktur gugus gula dan berikatan dengan sapogenin atau aglikon. Saponin merupakan zat bioaktif yang memiliki sifat sebagai antikanker, antivirus, antibakteri, dan penurun kolesterol. Keberadaan senyawa golongan senyawa saponin dapat diidentifikasi menggunakan uji Forth yang ditunjukkan oleh pembentukan busa ketika dilakukan pengocokan yang kuat (Harborne, 1987).

2.7.4 Terpenoid dan Steroid

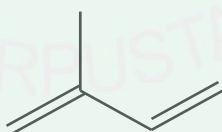
Steroid merupakan kelompok dari senyawa lipid yang memiliki struktur inti yang sama. Senyawa yang termasuk dalam golongan steroid merupakan derivat dari perhidrosiklopentafenantrena yang memiliki 3 cincin sikloheksana. Beberapa jenis senyawa penting dalam golongan steroid antara lain adalah kolesterol, 7-dehidrokolesterol, ergosterol, asam-asam empedu, dan hormon-

hormon kelamin. Struktur inti dari senyawa golongan steroid seperti pada **Gambar 2.12** (Poedjiadi, 2012).



Gambar 2.12 Struktur Inti Steroid (Poedjiadi, 2012)

Terpenoid merupakan senyawa yang tersusun atas beberapa molekul isoprena. Molekul senyawa ini kebanyakan memiliki kelipatan lima dari atom karbon. Senyawa yang termasuk dalam terpenoid antara lain adalah sitral, karoten, vitamin A, skualen, pinen, geraniol, kamfer, dan fitol. Keberadaan senyawa golongan steroid maupun terpenoid dapat diidentifikasi dengan uji Lieberman-Burchard (Setyowati, dkk., 2014). Struktur dari isoprena seperti pada **Gambar 2.13** (Poedjiadi, 2012).

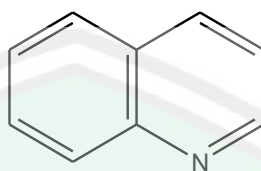


Gambar 2.13 Isoprena (Poedjiadi, 2012)

2.7.5 Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa organik yang memiliki sifat alkali atau basa dan memiliki struktur heterosiklis. Struktur alkaloid memiliki atom nitrogen sebagai heteroatom yang memiliki pasangan elektron bebas dan akan membentuk

ikatan kovalen koordinat apabila berinteraksi dengan ion logam. Keberadaan alkaloid dapat diidentifikasi melalui uji Mayer, uji Wagner, dan uji Dragendroff. Struktur inti dari alkaloid seperti pada **Gambar 2.14** (Setyowati, dkk. 2014).



Gambar 2.14 Struktur Inti Alkaloid (Setyowati, dkk. 2014)

2.8 Ekstraksi Maserasi Senyawa Bioaktif Bekatul Menggunakan Pelarut Etanol

Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang dilakukan pada temperatur ruangan. Proses maserasi ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dengan perendaman sampel maka akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat adanya perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada di dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa dapat diatur lama waktu perendaman yang dilakukan (Sofia, 2006).

Pemilihan pelarut pada proses ekstraksi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa yang akan diekstrak dalam pelarut tersebut. Secara umum, pelarut metanol merupakan pelarut yang paling umum digunakan dalam proses ekstraksi maserasi karena dapat melarutkan sejumlah golongan metabolit sekunder (Sofia, 2006). Chen, dkk (2005) menyatakan bahwa pemilihan pelarut yang lebih polar seperti metanol, etanol, dan isopropanol akan lebih mengekstrak vitamin E homolog atau γ -orizanol

dibandingkan dengan pelarut non polar seperti heksana. Pengaruh pemilihan pelarut terhadap rendemen dan aktivitas antioksidan dapat dilihat pada **Tabel 2.7**.

Tabel 2.7 Pengaruh Pelarut Terhadap Rendemen dan Aktivitas Antioksidan

Peneliti	Sampel	Pelarut	Rendemen (%)	Aktivitas Antioksidan (%)*
Widarta, dkk., 2013	Bekatul beras putih	Etanol 96%	5,00	49,14
	Bekatul beras hitam	Metanol p.a	3,91	78,61
Purwanto, dkk. (2014)	Bekatul	n-Heksana	10,164	13,300
		Etanol 96%	17,431	46,798
		Etil asetat	11,846	28,571

*uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH

Tabel 2.7 menunjukkan bahwa etanol dapat mengekstrak senyawa bioaktif dengan rendemen yang lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut lainnya dan ekstrak etanol bekatul memiliki aktivitas antioksidan paling besar. Etanol merupakan pelarut polar yang efektif dalam mengekstraksi senyawa bioaktif dibandingkan dengan pelarut air. Penggunaan etanol dalam proses ekstraksi dapat menghindarkan sifat toksisitas yang ditimbulkan oleh pelarut metanol. Etanol juga dapat melarutkan sejumlah senyawa polifenol dengan baik (Widarta, dkk., 2013).

Rasio pelarut dapat mempengaruhi rendemen yang dihasilkan. Penelitian Hu, dkk. (1996) menunjukkan ekstraksi bekatul menggunakan pelarut heksana dan isopropanol dengan rasio pelarut dan bekatul adalah 3:1 (b/b) menghasilkan kadar minyak kasar, vitamin E, dan oryzanol yang lebih tinggi. Penelitian Pendit, dkk. (2016) menunjukkan bahwa ekstraksi maserasi daun belimbing wuluh menggunakan etanol 70% dengan rasio pelarut 1:5 menghasilkan total fenol paling tinggi sebesar 3,35% dibandingkan dengan ekstraksi dengan rasio pelarut 1:4 dan 1:6. Sedangkan penelitian Mas'ud, dkk. (2019) menunjukkan bahwa

ekstraksi maserasi kelapa parut menggunakan etanol 86% dengan rasio pelarut 1:5 menghasilkan rendemen VCO paling tinggi yaitu 23,79% dibandingkan dengan ekstraksi dengan rasio pelarut 1:3, 1:4, dan 1:6. Semakin banyak jumlah pelarut akan memaksimalkan distribusi partikel pada pelarut sehingga menghasilkan rendemen tinggi. Namun, jumlah pelarut yang terlalu banyak menyebabkan kemampuan pelarut untuk mengekstraksi sudah mencapai titik maksimum dan menghasilkan rendemen yang lebih rendah (Mas'ud, dkk., 2019)

Ukuran partikel bahan dan lama ekstraksi mempengaruhi proses ekstraksi. Semakin kecil ukuran partikel bahan, maka meningkatkan kemungkinan kontak antara bahan dan pelarut sehingga mempermudah pelarut dalam menembus dinding sel bahan yang dan semakin banyak zat aktif yang terekstrak (Antari, dkk., 2015). Pengaruh ukuran partikel dan lama waktu ekstraksi dapat diamati pada **Tabel 2.8**.

Tabel 2.8 Pengaruh Ukuran Partikel dan Lama Ekstraksi Terhadap Rendemen

Peneliti	Sampel	Ukuran Partikel (Mesh)	Lama Ekstraksi (Jam)	Rendemen (%)		
Sembiring dan Suhirman (2014)	Meniran	20	2	9,20		
			4	10,30		
			6	9,40		
		40	2	13,23		
			4	12,51		
			6	13,00		
		Antari, dkk. (2015)	Pandan	60	2	18,40
					4	16,50
				40	6	17,00
3	3,26					
60	5			3,79		
	7			3,67		
60	3	3,45				
	5	4,80				
	7	4,57				

Tabel 2.8 menunjukkan bahwa sampel dengan ukuran kecil menghasilkan rendemen tinggi. Sedangkan lama ekstraksi dapat mempengaruhi jumlah rendemen karena semakin lama waktu ekstraksi akan memberikan kesempatan interaksi antara sampel dengan pelarut lebih lama. Hal tersebut akan meningkatkan kelarutan senyawa aktif hingga mencapai titik jenuh. Namun berdasarkan penelitian pada **Tabel 2.8**, semakin lama proses ekstraksi tidak memberikan nilai rendemen yang lebih tinggi yang disebabkan karena menyebabkan senyawa bioaktif menjadi rusak karena telah mengalami kejenuhan larutan dan ekstraksi selama 5 jam memberikan nilai rendemen paling tinggi (Antari, dkk., 2015).

2.9 Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

Pewarnaan jaringan bertujuan untuk memberikan warna pada jaringan sehingga dapat diketahui perubahan-perubahan yang terjadi pada sel pada jaringan. Salah satu teknik pewarnaan yang umum digunakan adalah pewarnaan Hematoksilin-Eosin. Pewarnaan tersebut terdiri atas dua zat pewarna yaitu pewarna hematoksilin dan eosin. Hematoksilin merupakan zat warna yang bersifat basa dan akan mewarnai jaringan basofilik atau bagian jaringan yang bersifat asam seperti DNA yang berada pada inti sel. Zat warna hematoksilin memberikan warna kebiruan. Sedangkan eosin merupakan zat warna yang bersifat asam dan mewarnai komponen yang bersifat asidofilik seperti sitoplasma, mitokondria, granula sekretoris, dan kolagen. Zat warna eosin memberikan warna merah muda (Adi, 2015). Contoh dari jaringan yang telah diwarnai menggunakan pewarnaan Hematoksilin-Eosin terdapat pada **Gambar 2.2**, **Gambar 2.4**, dan **Gambar 2.5**.

Terdapat beberapa tahapan sebelum dilakukan pewarnaan jaringan diantaranya adalah tahapan fiksasi, dehidrasi, pembersihan (*clearing*), pembedaan (*embedding*), pengecoran (*blocking*), dan pemotongan (*mounting*). Fiksasi merupakan tahapan pengawetan jaringan dengan cara pencelupan jaringan dalam larutan formalin. Dehidrasi merupakan tahapan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang ada pada jaringan sehingga cairan tersebut dapat diganti dengan parafin. Dehidrasi jaringan biasa dilakukan dengan merendam jaringan pada alkohol dengan konsentrasi bertingkat. Pembersihan bertujuan untuk menghilangkan alkohol yang tersisa pada tahapan selanjutnya dengan direndam dalam clearing agent yaitu toluena. Pembedaan atau penanaman jaringan dilakukan dengan dimasukkan jaringan pada parafin panas. Pengecoran dilakukan untuk pembuatan blok jaringan dalam parafin sehingga mempermudah pemotongan jaringan. Pemotongan jaringan dilakukan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-5 μ m sehingga zat warna dapat menembus dan mewarnai keseluruhan jaringan (Jusuf, 2009).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2019 hingga Oktober 2019 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia dan Laboratorium Fisiologi Hewan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan adalah sebagai berikut: seperangkat alat gelas, ayakan 60 mesh, oven, cawan, desikator, *aluminium foil*, *autoclave*, plastik *wrap*, timbangan analitik, jarum ose, bola hisap, inkubator, *vortex*, kertas saring, corong Buchner, *rotary evaporator*, kandang mencit ukuran 20×30×40 cm, botol minum mencit, tempat makan mencit, spuit 1 mL, alat sonde, *Gluco DR*, strip *Gluco DR*, *disposable syringe*, meja preparat, mikrotom, gelas objek, dan mikroskop.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah sebagai berikut: mencit, bekatul, akuades, etanol 95%, media PDA, inokulum *Rhizopus oryzae*, H₂SO₄ pekat, kloroform, asam asetat anhidrat, larutan FeCl₃ 1%, HCl pekat, methanol 50%, serbuk Mg, larutan HCl 2 M, reagen Dragendorff, reagen Mayer, pakan standar, aloksan, Na-CMC, reagen, formaldehid, toluena, parafin, alkohol bertingkat, xilol, Hematoksilin, eosin.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan jenis *experimental laboratory*. Bekatul terlebih dahulu distabilisasi kemudian dilakukan analisis kadar air. Bekatul dibagi dua bagian yang akan digunakan sebagai bekatul terfermentasi dan bekatul tanpa fermentasi sebagai kontrol. Bekatul difermentasi dengan ditambahkan inokulum *Rhizopus oryzae* kemudian diinkubasi selama 120 jam pada suhu 37°C. Bekatul hasil fermentasi dikeringkan di dalam oven dan diekstraksi menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 95% selama 5 jam kemudian dipekatkan. Ekstrak kasar yang diperoleh dilakukan pengujian fitokimia meliputi uji fenolik, flavonoid, saponin, terpenoid dan steroid, serta alkaloid. Rancangan perlakuan terhadap hewan uji dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pengelompokan hewan menjadi enam kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri atas tiga ekor mencit dengan faktor perlakuan yang berbeda seperti yang ditunjukkan pada **Tabel 3.1**.

Tabel 3.1 Pembagian Kelompok dan Perlakuan Hewan Coba Mencit

Kelompok	Jumlah Mencit	Perlakuan
Kontrol normal	3	Mencit normal tanpa induksi aloksan.
Kontrol (-)	3	Mencit diinduksi aloksan dengan diberikan Na-CMC 0,5%.
Kontrol 1	3	Mencit diinduksi aloksan dengan diberikan ekstrak bekatul tanpa fermentasi dosis 100mg/Kg BB.
Kontrol 2	3	Mencit diinduksi aloksan dengan diberikan ekstrak bekatul tanpa fermentasi dosis 200mg/Kg BB.
Kelompok 1	3	Mencit diinduksi aloksan dengan diberikan ekstrak bekatul terfermentasi dosis 100mg/Kg BB.
Kelompok 2	3	Mencit diinduksi aloksan dengan diberikan ekstrak bekatul terfermentasi dosis 200mg/Kg BB.

Pengkondisian mencit diabetes mellitus dilakukan dengan induksi aloksan dosis 200 mg/Kg BB secara intraperitoneal. Mencit hiperglikemia diberikan perlakuan sesuai perlakuan masing-masing kelompok selama 19 hari dimulai dari hari ke-1. Kadar glukosa darah diuji pada hari ke-7, 11, 15 dan 19. Pada hari ke-20 organ limpa diambil dan dilakukan pewarnaan Hematoksilin-eosin kemudian diamati jumlah sel limfositnya. Data berupa jumlah sel limfosit dianalisis secara statistik dengan analisis *One Way Anova* dan uji lanjut Tukey.

3.4 Tahapan Penelitian

1. Preparasi alat dan bekatul.
2. Analisis kadar air bekatul.
3. Fermentasi bekatul.
4. Ekstraksi bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi.
5. Uji fitokimia.
6. Persiapan mencit.
7. Pengkondisian mencit diabetes mellitus.
8. Perlakuan dengan ekstrak bekatul terfermentasi.
9. Pengukuran kadar glukosa darah.
10. Pewarnaan Hematoksilin-Eosin.
11. Analisis data.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Preparasi Alat dan Bekatul

3.5.1.1 Sterilisasi Alat (Fikriyah, 2018)

Alat terlebih dahulu disterilkan sebelum dilakukan fermentasi. Alat berupa peralatan gelas dicuci bersih kemudian dibungkus plastik tahan panas. Alat yang sudah siap disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.1.2 Stabilisasi Bekatul (Sholeha, 2019)

Preparasi sampel berupa bekatul disaring hingga diperoleh ukuran ≤ 60 mesh. Bekatul dimasukkan pada dua wadah yang berbeda dengan masing-masing berat sebanyak 100 gram. Bekatul distabilisasi dengan dioven selama 60 menit pada suhu 40°C. Kemudian didinginkan dalam suhu ruang. Sampel yang telah kering digunakan untuk analisis lebih lanjut.

3.5.2 Analisis Kadar Air (Herman, dkk., 2011)

Analisis kadar air bekatul dilakukan berdasarkan metode gravimetri. Cawan yang telah dibersihkan dipanaskan dalam oven selama 3 jam dengan suhu 100-105°C. Cawan diambil dan didinginkan dalam desikator selama 15 menit kemudian ditimbang hingga diperoleh berat konstan (C_0). Bekatul sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam cawan kemudian ditimbang (C_b). Cawan beserta bekatul yang telah ditimbang, dipanaskan kembali ke dalam oven selama 3 jam dan didinginkan dalam desikator selama 15 menit kemudian ditimbang (C_k). Perlakuan tersebut dilakukan berulang hingga diperoleh berat konstan. Kadar air dapat ditentukan dengan persamaan berikut:

$$\text{Kadar air} = \frac{C_b - C_k}{C_b - C_o} \times 100\% \dots\dots\dots (3.1)$$

Keterangan :

Co= berat cawan kosong (g)

Cb= berat cawan dengan sampel basah (g)

Ck= berat cawan dengan sampel kering (g)

3.5.3 Sterilisasi dan Pembuatan Media

3.5.3.1 Sterilisasi Bekatul

Bekatul yang telah distabilisasi dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL sebanyak 50 gram. Erlenmeyer yang berisi bekatul ditutup dengan aluminium foil dan dibungkus dengan plastik kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.3.2 Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Fikriyah, 2018)

Media PDA dibuat dengan ditimbang media PDA bubuk sebanyak 3,9 gram dan dilarutkan pada 100 mL akuades. Larutan media PDA dipanaskan sambil diaduk sampai mendidih. Media PDA disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit. Media PDA dituang dalam cawan petri dan didinginkan hingga media memadat.

3.5.3.3 Regenerasi Jamur *Rhizopus oryzae* (Dewi, dkk., 2005)

Jamur yang akan digunakan pada proses fermentasi bekatul harus terlebih dahulu diregenerasi. 1 ose isolat jamur *Rhizopus oryzae* digoreskan pada media PDA cawan petri. Kemudian media diinkubasi pada suhu 37°C hingga bersporulasi penuh selama 72 jam.

3.5.4 Fermentasi Bekatul

3.5.4.1 Pembuatan Inokulum Jamur (Suswanto, dkk., 2018)

Akuades steril sebanyak 50 ml dituangkan sedikit demi sedikit pada cawan petri yang berisi jamur *Rhizopus oryzae* yang sudah diregenerasi. Jamur dikerok hingga miselia jamur terlepas dari media. Akuades yang tercampur dengan miselia jamur disaring menggunakan kain kasa sehingga diperoleh akuades keruh yang suspensi miselia jamur. Akuades yang keruh siap untuk digunakan pada proses fermentasi.

3.5.4.2 Fermentasi Bekatul Menggunakan *Rhizopus oryzae* (Fikriyah, 2018)

Bekatul yang telah disterilisasi ditambahkan akuades dengan perbandingan adalah 1:1 (b/v) dan 5 ml inokulum jamur *Rhizopus oryzae* yang telah dipersiapkan secara aseptik. Bekatul diinkubasi selama 120 jam dengan suhu 37°C. Setelah proses fermentasi selesai, bekatul dikeringkan di dalam oven 50°C selama 24 jam.

3.5.5 Ekstraksi Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi (Umami, 2016)

Bekatul terfermentasi ditimbang 30 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml. Ekstraksi maserasi dilakukan dengan menambahkan pelarut etanol 95% p.a dengan perbandingan berat bekatul terfermentasi dan volume pelarut 1:5 (b/v). Proses maserasi dilakukan selama 5 jam pada *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang. Setelah proses maserasi, ekstrak disaring menggunakan corong Buchner untuk memisahkan filtrat dari residunya. Pemisahan ekstrak dengan pelarut dilakukan menggunakan *rotary evaporator* dan

dipekatkan dengan disemprot gas N₂. Ekstraksi diulangi pada bekatul tanpa fermentasi.

3.5.6 Uji Fitokimia

3.5.6.1 Uji Fenolik (Harbone, 1987)

Ekstrak bekatul terfermentasi sebanyak 5 mg dilarutkan dalam 1-2 ml akuades. Larutan ditambahkan dengan 10 tetes larutan FeCl₃ 1%. Keberadaan senyawa fenolik ditandai dengan munculnya warna warna hijau, merah, coklat, ungu, biru, atau hitam. Perlakuan diulangi pada ekstrak bekatul tanpa fermentasi.

3.5.6.2 Uji Flavonoid (Harbone, 1987)

Ekstrak bekatul terfermentasi sebanyak 5 mg dilarutkan dalam 1-2 mL methanol panas 50%. Larutan ditambahkan dengan 0,1 gram serbuk Mg dan 4-5 tetes larutan HCl pekat. Keberadaan senyawa flavonoid ditandai dengan munculnya warna merah atau jingga. Perlakuan diulangi pada ekstrak bekatul tanpa fermentasi.

3.5.6.3 Uji Saponin (Harbone, 1987)

Ekstrak bekatul terfermentasi 5 mg dilarutkan dalam 5 mL akuades. Larutan dikocok selama 5 menit. Larutan didiamkan selama 30 menit dan diamati. Keberadaan senyawa saponin ditandai dengan busa yang tetap stabil selama 30 menit. Perlakuan diulangi pada ekstrak bekatul tanpa fermentasi.

3.5.6.4 Uji Steroid dan Terpenoid (Harbone, 1987)

Ekstrak bekatul terfermentasi sebanyak 5 mg dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform. Larutan ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Campuran ditetesi dengan 1-2 mL larutan H₂SO₄ pekat. Keberadaan senyawa terpenoid ditandai dengan munculnya cincin kecokelatan atau violet diantara perbatasan dua pelarut sedangkan keberadaan senyawa steroid ditandai dengan munculnya warna hijau kebiruan. Perlakuan diulangi pada ekstrak bekatul tanpa fermentasi.

3.5.6.5 Uji Alkaloid (Harbone, 1987)

Ekstrak bekatul terfermentasi sebanyak 5 mg ditambahkan dengan 1 mL larutan HCl 2 M dan 9 mL akuades. Larutan dipanaskan selama 2 menit, kemudian didinginkan. Larutan dibagi menjadi dua. Larutan pertama ditambahkan dengan 2-3 tetes reagen Dragendorff dan larutan kedua ditambahkan dengan 2-3 tetes reagen Mayer. Keberadaan senyawa alkaloid ditandai dengan munculnya warna kuning-merah ketika diberikan reagen Dragendorff dan timbulnya endapan putih ketika diberikan reagen Mayer. Perlakuan diulangi pada ekstrak bekatul tanpa fermentasi.

3.5.7 Persiapan Mencit (Febrina dan Sari, 2019)

Mencit dibagi atas enam kelompok dengan empat kelompok sebagai kontrol. Jumlah mencit setiap kelompok adalah tiga mencit sehingga jumlah mencit yang digunakan adalah 18 ekor mencit. Sebelum dilakukan perlakuan, hewan uji diberikan pakan standar dan air mineral selama satu minggu. Mencit dipelihara dalam kandang dengan luas kandang adalah 20×30×40 cm

perkelompok dan diberi alas serbuk kayu. Kandang ditutup dengan anyaman kawat. Suhu kandang dijaga tetap berada pada suhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Pemberian pakan dan minum *ad libitum* setiap pagi hari. Pembagian kelompok mencit seperti pada **Tabel 3.1.**

3.5.8 Pengukuran Kadar Glukosa Darah (Soemardji, 2004)

Pengukuran kadar glukosa darah mencit dilakukan dengan alat glukometer *Gluco Dr.* Alat terlebih dahulu dikalibrasi. *Test strip* untuk uji kadar glukosa darah diselipkan pada tempat khusus pada alat kemudian akan muncul gambar tetesan darah. Darah mencit diambil dengan bantuan *blood lancet* yang ditusukkan pada aliran darah vena ekor mencit. Volume minimal darah yang dapat diukur adalah $0,5 \mu\text{L}$ yang kemudian dimasukkan pada celah sensor di ujung strip.

3.5.9 Pengkondisian Mencit Diabetes Mellitus (Bukhari, dkk., 2015)

Mencit terlebih dahulu diukur kadar glukosa darah dan ditimbang berat badannya sebelum dilakukan induksi. Mencit diinduksi dengan aloksan dengan dosis 200 mg/Kg BB mencit secara intraperitoneal sebanyak $0,2 \text{ mL}/20 \text{ g BB}$ mencit. Cara penginduksian dengan menghadapkan mencit ke arah frontal hingga bagian abdomen mencit terlihat. Rongga abdomen yang sejajar dengan kaki disemprot dengan alkohol 70% dan kulit dicubit hingga terasa bagian otot mencit. Spuit dimasukkan dalam abdomen dan diinduksikan larutan aloksan secara perlahan. Kemudian spuit dilepas dan disemprot kembali bagian abdomen mencit menggunakan alkohol 70%. Kadar glukosa darah mencit diukur pada hari ke-7.

Apabila peningkatan kadar glukosa darah belum mencapai $\geq 200\text{mg/dL}$ maka dilakukan induksi berikutnya dengan dosis aloksan yang sama.

3.5.10 Perlakuan dengan Ekstrak Bekatul Terfermentasi (Susilawati, dkk., 2017)

Hewan uji diberikan perlakuan yang berbeda pada masing-masing kelompoknya. Pada kontrol normal, mencit diberikan minum dan pakan standar tanpa adanya penambahan apapun. Pada kontrol (-), mencit diberikan minum dan pakan standar dengan induksi Na-CMC 0,5% sebanyak 0,2 mL/20 g BB mencit. Pada kontrol 1 dan kontrol 2, mencit diberikan minum dan pakan standar dengan induksi ekstrak bekatul sebanyak 0,2 ml/20 g BB mencit sesuai dengan dosis yang telah ditentukan. Pada kelompok 1 dan kelompok 2, mencit diberikan pakan standar dengan induksi ekstrak bekatul terfermentasi sebanyak 0,2 ml/20 g BB mencit sesuai dengan dosis yang telah ditentukan. Perlakuan tersebut dilakukan secara berulang selama 19 hari setiap pagi hari secara oral melalui sonde lambung. Masing-masing mencit ditimbang berat badannya setiap 3 hari sekali untuk menyesuaikan dosis ekstrak yang diberikan. Kemudian masing-masing mencit diuji kadar glukosa darahnya pada hari ke-7,11, 15, dan 19, tetapi terlebih dahulu mencit dipuasakan selama 5 jam.

3.5.11 Pewarnaan Hematoksin-Eosin

3.5.11.1 Pembuatan Preparat (Swarayana, dkk., 2012)

Mencit terlebih dahulu didislokasi leher. Setelah mencit mati yang ditunjukkan oleh tidak adanya respons mencit ketika kaki mencit ditekan dengan kuat, mencit diletakkan pada papan fiksasi dan dihadapkan posisi ventral di atas

kemudian mencit dibedah menggunakan skalpel dan alat bedah. Organ limpa diambil masing-masing 1 irisan. Organ limpa kemudian difiksasi menggunakan formalin selama 24 jam. Organ limpa yang telah difiksasi kemudian didehidrasi dengan cara dimasukkan dalam alkohol dengan konsentrasi bertingkat (alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, dan alkohol 96%), toluen 1 dan toluen 2 masing-masing selama 2 jam. Organ limpa yang telah didehidrasi dimasukkan ke dalam parafin cair dengan suhu 56°C selama 2 jam dan dilakukan sebanyak 2 kali. Organ limpa diambil dan diblok menggunakan blok parafin. Organ limpa dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-5 μm . Kemudian organ limpa direhidrasi dengan dimasukkan dalam air kemudian diletakkan dalam gelas objek. Preparat organ limpa dikeringkan dan diwarnai menggunakan Hemaktosilin eosin.

3.5.11.2 Pewarnaan Preparat (Swarayana, dkk., 2012)

Preparat di atas gelas objek direndam dalam xilol 1, xilol 2, xilol 3 masing-masing selama 5 menit. Kemudian preparat direndam dalam alkohol absolut 1 dan alkohol absolut 2 masing-masing selama 5 menit. Preparat dimasukkan dalam akuades dan direndam dalam Hemaktosilin selama 15 menit. Preparat dibilas dengan akuades. Preparat dicelupkan dalam alkohol 1% sebanyak 7-10 celupan kemudian direndam akuades selama 15 menit. Preparat direndam dalam eosin selama 2 menit. Preparat yang telah diwarnai kemudian direndam dalam alkohol 96% 1 dan alkohol 96% 2 masing-masing selama 3 menit dan alkohol absolut 1 dan alkohol absolut 2 masing-masing selama 3 menit. Preparat dimasukkan dalam xilol 4 dan xilol 5 masing-masing selama 5 menit. Preparat yang telah diwarnai kemudian dikeringkan dan diamati dibawah mikroskop untuk

dilakukan pengamatan histologi. Jumlah sel limfosit dihitung setiap satu lapang pandang terpilih pada perbesaran 1000×.

3.5.12 Analisis Data

Data berupa jumlah sel limfosit mencit yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan uji *One Way Anova* dengan $\alpha = 0,05$. Jika ada perbedaan signifikan pada perlakuan maka dilakukan uji lanjut dengan Tukey. Analisis statistik menggunakan program *SPSS 23.0*.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian berjudul “Pengaruh Ekstrak Etanol Bekatul Terfermentasi *Rhizopus Oryzae* Terhadap Histologi Limpa Mencit (*Mus Musculus*) Diabetes” dilakukan dengan beberapa tahapan. Tahapan pertama yaitu preparasi bekatul dan analisis kadar air. Tahapan selanjutnya adalah sterilisasi dan pembuatan media kemudian fermentasi bekatul. Bekatul yang telah terfermentasi diekstraksi dan dilakukan uji fitokimia. Setelah itu dilakukan tahapan untuk mengetahui pengaruh ekstrak bekatul terhadap histologi limpa mencit (*mus musculus*) yang diinduksi aloksan meliputi persiapan hewan uji, pengkondisian mencit diabetes mellitus, dan perlakuan dengan ekstrak bekatul terfermentasi. Perlakuan pada penelitian ini adalah dosis terapi ekstrak etanol bekatul tanpa fermentasi dan terfermentasi yang diberikan pada mencit sedangkan perubahan yang diamati meliputi perubahan berat badan, kadar glukosa darah, dan histologi limpa mencit kemudian dianalisis secara statistik.

4.1 Preparasi Bekatul

Ukuran bekatul diseragamkan menggunakan ayakan 60 mesh. Bekatul dengan ukuran partikel ≤ 60 mesh memiliki luas permukaan yang besar dan meningkatkan interaksi antara partikel bekatul dan pelarut ketika proses ekstraksi dilakukan sehingga mempermudah kelarutan senyawa bioaktif bekatul dan meningkatkan rendemen ekstrak (Antari, dkk., 2015). Bekatul distabilisasi untuk deaktivasi enzim lipase pada bekatul. Aktivitas enzim lipase dapat meningkatkan kadar asam lemak bebas akibat degradasi lipid sehingga dapat merusak

kandungan nutrisi dalam bekatul (Purwanto, dkk., 2014). Stabilisasi bekatul dilakukan pada suhu 40°C karena enzim lipase mulai mengalami deaktivasi enzim pada suhu tersebut (Martati, dkk., 1999). Bekatul yang telah distabilisasi disimpan dalam wadah tertutup rapat dan kedap udara untuk meminimalisir kontaminan seperti uap air sampai menunggu proses fermentasi.

4.2 Analisis Kadar Air

Bekatul memiliki sifat higroskopis yang dapat mempengaruhi kadar airnya. Kadar air dapat mempengaruhi umur simpan bekatul akibat aktivitas mikroorganisme yang dapat mengubah sifat fisik dan sifat kimia bekatul (Husni, dkk., 2014). Selain itu, kadar air juga berpengaruh terhadap proses ekstraksi, kadar air yang rendah dapat mempermudah penarikan komponen bioaktif dalam sampel karena pelarut lebih mudah menembus dinding sel tanpa adanya gangguan dari kandungan air (Khoiriyah, dkk., 2014). Kadar air bekatul bahan baku yaitu 7,07%, bekatul yang telah distabilisasi yaitu 6,43%, bekatul terfermentasi yaitu 4,93%. Kadar air bekatul telah berada pada rentang kadar air yang disarankan yaitu berkisar 3-7%. Pada rentang tersebut dapat menekan pertumbuhan mikroba, meminimalisir reaksi kimiawi (hidrolisis), dan oksidasi lemak tak jenuh pada bekatul (Luthfianto, dkk., 2017).

4.3 Sterilisasi dan Pembuatan Media

4.3.1 Sterilisasi Bekatul

Bekatul yang telah distabilisasi kemudian disterilisasi dengan *autoclave* untuk mematikan keberadaan mikroorganisme lain yang terdapat pada bekatul.

Suhu sterilisasi yang digunakan adalah 121°C dan pada tekanan 15-17,5 psi (2 atm) sedangkan media pensterilnya adalah air sehingga pada suhu dan tekanan tersebut air dapat mendidih. Uap panas yang terdapat pada *autoclave* dapat membantu proses denaturasi protein yang terdapat pada organisme hidup sehingga akan mematikan mikroorganisme yang terdapat pada bekatul (Adji, dkk., 2007).

4.3.2 Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Pemilihan media *Potato Dextrose Agar* (PDA) sebagai media pertumbuhan dan regenerasi jamur *Rhizopus oryzae* dikarenakan kesesuaian unsur nutrisi yang terkandung dalam media PDA diantaranya nutrisi karbohidrat yang berasal dari ekstrak kentang sebagai sumber karbon, dan vitamin serta dextrose sebagai sumber glukosa dan memiliki pH yang rendah yang dapat menekan adanya kontaminan bakteri (Cappucino, 2013).

4.3.3 Regenerasi Jamur *Rhizopus oryzae*

Regenerasi jamur *Rhizopus oryzae* merupakan proses peremajaan kembali sel-sel jamur *Rhizopus oryzae* dari jamur induk. Selain itu, proses regenerasi bertujuan untuk menjaga ketersediaan nutrisi pada media dan menjaga kemungkinan terdapat perubahan karakter jamur dari kultur induk (Amalia, 2016). Biakan baru diinkubasi pada suhu 37°C karena pada suhu tersebut berada pada rentangan suhu optimum pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae* (Karmakar, dkk, 2012). Proses inkubasi dilakukan selama 72 jam hingga bersporulasi penuh untuk memperoleh jamur *Rhizopus oryzae* dalam fase logaritmik (48-96 jam) sehingga

diperoleh jamur dengan jumlah miselium tinggi, aktif membelah, dan produktif ketika dilakukan proses fermentasi (Melgar, dkk., 2013).

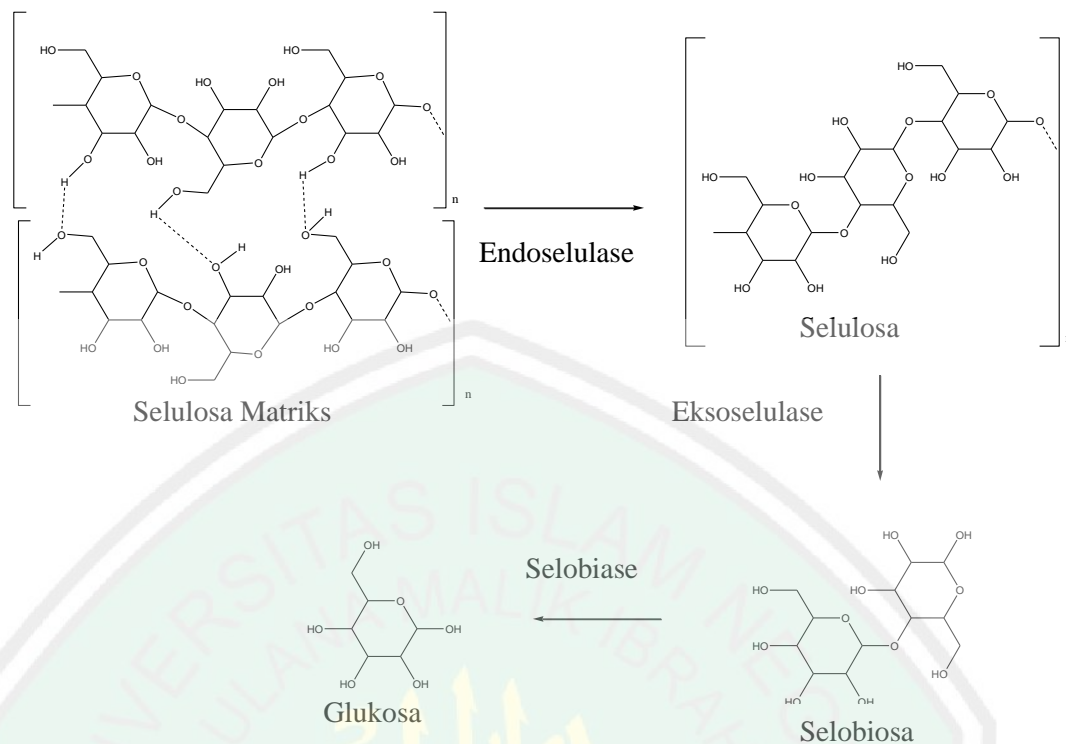
4.4 Fermentasi Bekatul

4.4.1 Pembuatan Inokulum Jamur

Inokulum merupakan kultur jamur *Rhizopus oryzae* yang diinokulasikan pada akuades steril. Pembuatan larutan inokulum bertujuan untuk mempermudah meratakan dan pencampuran sampel yang akan difermentasi dengan agen fermentasi atau jamur *Rhizopus oryzae*. Pembuatan inokulum dilakukan untuk memperoleh suspensi miselia jamur *Rhizopus oryzae* berupa larutan berwarna putih keruh.

4.4.2 Fermentasi Bekatul Menggunakan *Rhizopus oryzae*

Proses fermentasi bertujuan untuk merenggangkan kompleks selulosa yang terdapat dalam bekatul dengan bantuan jamur *Rhizopus oryzae*. Jamur *Rhizopus oryzae* mampu menghasilkan enzim selulase yang dapat membuka selulosa matriks dan dapat membebaskan senyawa bioaktif yang terikat pada matriks selulosa (Saropah, dkk., 2012), sehingga proses fermentasi dapat meningkatkan kadar senyawa bioaktif (Razak, dkk., 2016). Pembukaan serat bekatul dengan bantuan enzim selulase dapat dilihat pada **Gambar 4.1** (Whithers, 1995 dalam Saropah, dkk., 2012).

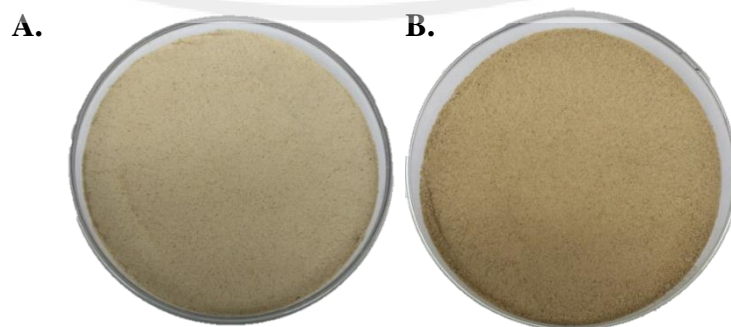


Gambar 4.1 Mekanisme Enzim Selulase (Whithers, 1995 dalam Saropah, dkk., 2012)

Fermentasi bekatul menggunakan teknik *Solid State Fermentation* (SSF) dengan perbandingan 1:1 (bekatul:akuades) karena kesesuaian metode dengan substrat bekatul selain itu dapat meningkatkan produktivitas fermentasi, konsentrasi produk dan stabilitas yang tinggi, aktivitas sterilitas yang rendah akibat rendahnya aktivitas air (Maftukhah, 2020) dan menghindari terlarutnya dan terbuangnya senyawa aktif bekatul dalam akuades selama proses fermentasi (Fikriyah, 2018). Penambahan inokulum sebanyak 10% (v/b) karena dapat menghasilkan produk fermentasi yang lebih maksimal (Kusumaningati, dkk., 2013). Fermentasi dilakukan selama 120 jam karena pada waktu tersebut jamur *Rhizopus oryzae* telah berada pada fase stasioner sehingga jamur bekerja secara maksimal dalam memecahkan serat-serat bekatul. Penelitian Schmidt, dkk. (2014), menunjukkan bahwa adanya peningkatan asam ferulat dan asam sirigat

pada fermentasi bekatul selama 120 jam. Suhu fermentasi dikondisikan pada suhu 37°C karena pada suhu tersebut, jamur *Rhizopus oryzae* berada pada rentangan suhu optimal bagi jamur untuk bekerja (Karmakar, dkk., 2012). Proses penguapan kandungan air yang tersisa dari proses fermentasi pada bekatul terfermentasi dilakukan dalam oven pada suhu 50°C untuk meminimalisir adanya kerusakan senyawa bioaktif pada bekatul (Husni, dkk., 2014).

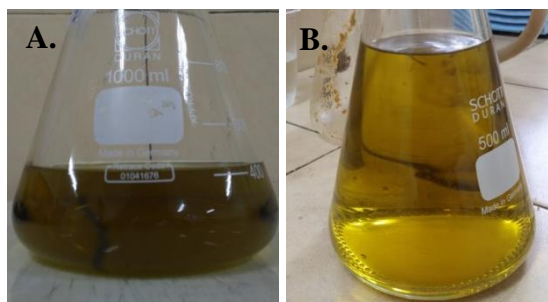
Proses fermentasi menyebabkan terjadinya perubahan sifat fisik bekatul diantaranya adalah perubahan warna dan aroma. Terdapat perubahan warna bekatul yaitu bekatul tanpa fermentasi memiliki warna cokelat terang sedangkan bekatul terfermentasi memiliki warna cokelat gelap seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 4.2**. Bekatul terfermentasi memiliki aroma yang lebih kuat dan lebih harum dibandingkan dengan bekatul tanpa fermentasi. Penelitian Yosi, dkk. (2014), menyatakan bahwa perubahan warna disebabkan adanya aktivitas jamur yang menyebabkan terjadinya konversi substrat selulosa bekatul yang digunakan untuk proses pertumbuhan dan menghasilkan monomer glukosa, sedangkan perubahan aroma tersebut disebabkan oleh adanya asam lemak dan alkohol hasil degradasi pada proses fermentasi yang bereaksi membentuk senyawa ester yang memiliki aroma harum.



Gambar 4.2 (A.) Bekatul Tanpa Fermentasi, (B.) Bekatul Terfermentasi

4.5 Ekstraksi Senyawa Aktif Bekatul dengan Maserasi Menggunakan Pelarut Etanol

Ekstraksi maserasi bertujuan untuk mengisolasi senyawa bioaktif yang terkandung pada bekatul melalui proses perendaman sampel. Perendaman sampel oleh pelarut menyebabkan terjadinya pemecahan dinding sel bekatul akibat adanya tekanan osmotik sehingga metabolit sekunder bekatul dapat terlarut dalam pelarut (Sofia, 2006). Ekstraksi dilakukan pada suhu ruang untuk mencegah terjadinya kerusakan komponen bioaktif (Mas'ud dan Pabbenteng, 2016). Bekatul tanpa fermentasi diekstraksi sebagai kontrol. Pemilihan pelarut etanol 95% dikarenakan pelarut etanol memiliki sifat kepolaran tinggi sehingga dapat mengekstrak kandungan senyawa bioaktif bekatul dengan baik (Purwanto, dkk., 2014). Perbandingan antara pelarut dan bekatul adalah 1:5 (bekatul:pelarut) karena pada perbandingan tersebut bekatul dapat terendam dengan sempurna sehingga proses ekstraksi dapat berjalan secara maksimal. Penelitian Djaeni dan Listyadevi (2019), menunjukkan bahwa rasio 1:5 (bekatul:pelarut) memberikan rendemen dan kandungan tokoferol yang paling tinggi. Ekstraksi maserasi dilakukan selama 5 jam dengan kecepatan pengocokan 120 rpm. Pengocokan bertujuan untuk memaksimalkan kontak antara sampel dengan pelarut sehingga akan meningkatkan kemungkinan pelarut dalam menembus dinding sel dan mengekstrak senyawa aktif dengan lebih optimum (Mas'ud dan Pabbenteng, 2016). Residu bekatul dihilangkan dengan cara disaring sehingga diperoleh filtrat ekstrak seperti pada **Gambar 4.3**.



Gambar 4.3 (a) Filtrat Bekatul Tanpa Fermentasi, (B) Filtrat Bekatul Terfermentasi

Penguapan pelarut etanol dalam ekstrak bekatul menggunakan *vacum rotary evaporator*. Prinsip dari *vacum rotary evaporator* adalah pemisahan ekstrak dari pelarut dengan menurunkan tekanan sehingga pelarut dapat menguap dibawah titik didihnya. Suhu *waterbath* diatur 50°C atau dibawah titik didih pelarut etanol (78,29°C) dan tekanan vakum diatur 600 psi sehingga pelarut dapat terpisahkan dengan baik tanpa terjadi *bumping*. Labu alas bulat wadah sampel diputar untuk menghindari penumpukan ekstrak pada titik tertentu labu dan meratakan panas pada keseluruhan labu. Proses penguapan dilakukan hingga tidak ada pelarut yang menetes dari kondensor yang diasumsikan sudah tidak ada pelarut yang tersisa. Ekstrak dipekatan dengan dialiri gas N₂ sehingga pelarut etanol yang tersisa pada sampel akan ikut menguap bersama gas N₂.

Tabel 4.1 Rendemen Ekstrak Etanol 95% Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi

Sampel	Berat Sampel (gram)	Berat Ekstrak (gram)	Rendemen (%)
Bekatul Tanpa Fermentasi (BNF)	30	2,2081	7,3603
Bekatul Terfermentasi (BF)	30	2,8299	9,4330

Tabel 4.1 menunjukkan bahwa bekatul terfermentasi menghasilkan rendemen yang lebih tinggi yang diasumsikan bahwa senyawa bioaktif yang

terdapat pada bekatul terfermentasi terekstrak lebih optimum dibandingkan dengan bekatul tanpa fermentasi. Pelepasan senyawa bioaktif terikat pada proses pembukaan serat menyebabkan peningkatan kadar senyawa bioaktif sehingga rendemen ekstrak meningkat. Penelitian Fikriyah (2018) menunjukkan bahwa bekatul terfermentasi menghasilkan rendemen ekstrak sebesar 12,33% sedangkan bekatul tanpa fermentasi menghasilkan rendemen ekstrak sebesar 8,46%.

4.6 Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Bekatul

Uji fitokimia bertujuan untuk mengetahui keberadaan senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada bekatul secara kualitatif. Uji fitokimia yang dilakukan adalah uji fenolik, flavonoid, saponin, steroid, terpenoid, dan alkaloid. Hasil uji fitokimia seperti pada **Tabel 4.2**.

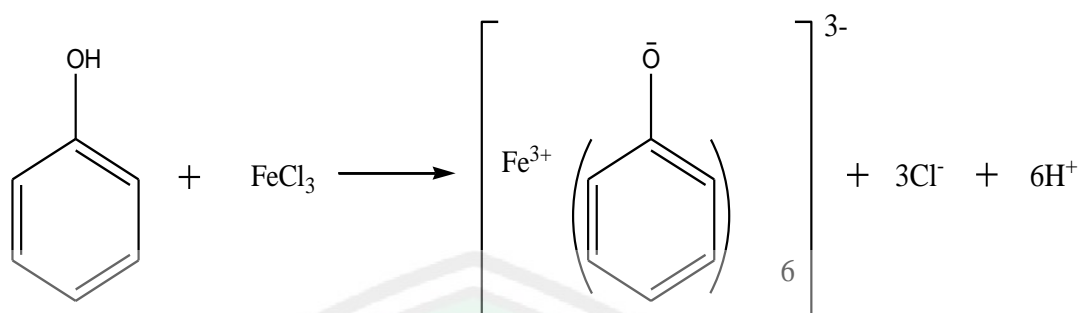
Tabel 4.2 Hasil Uji Fitokimia

Golongan Senyawa Aktif	Perubahan Warna/Endapan yang Terbentuk	Jenis Sampel	
		Bekatul Tanpa Fermentasi (BNF)	Bekatul Terfermentasi (BF)
Fenolik	Hitam	+	+++
Flavonoid	Kuning	+	++
Saponin	Terbentuk busa	-	-
Steroid	Hijau	++	+++
Terpenoid	Cincin coklat	+	++
Alkaloid	Dragendorff	+++	+++
	Mayer	+++	+++
Keterangan:	+++ =	Terjadi perubahan warna/endapan dengan intensitas tinggi	
	++ =	Terjadi perubahan warna/endapan dengan intensitas sedang	
	+ =	Terjadi perubahan warna/endapan dengan intensitas rendah	
	- =	Tidak terjadi perubahan warna/endapan	

Tabel 4.2 menunjukkan bahwa ekstrak bekatul tanpa fermentasi dan terfermentasi menunjukkan hasil positif terhadap uji senyawa golongan fenolik, flavonoid, steroid, terpenoid, dan alkaloid serta hasil negatif pada uji senyawa golongan saponin. Sedangkan hasil uji fitokimia bekatul terfermentasi menunjukkan perubahan warna atau endapan yang lebih pekat atau dapat diasumsikan bahwa ekstrak bekatul terfermentasi mengandung senyawa bioaktif lebih banyak secara kualitatif. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Faizah, dkk. (2019) yang menunjukkan peningkatan senyawa bioaktif berupa senyawa fenolik dan γ -oryzanol pada ekstrak bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae*. Senyawa metabolit sekunder pada ekstrak bekatul tanpa fermentasi dan terfermentasi dideskripsikan sebagai berikut:

4.6.1 Uji Fenolik

Ekstrak bekatul tanpa fermentasi dan ekstrak bekatul terfermentasi diuji kandungan fenolik menggunakan FeCl_3 1%. Menurut Harbone (1987), deteksi senyawa fenol dengan penambahan reagen FeCl_3 akan menimbulkan warna hijau, merah, coklat, ungu, biru, atau hitam yang kuat. Larutan FeCl_3 berfungsi sebagai pereaksi, dimana Fe^{3+} akan bereaksi dengan fenol. Hal ini membuktikan adanya warna coklat tua yang menunjukkan adanya kandungan senyawa fenol pada sampel. Kompleks berwarna yang terbentuk diduga sebagai besi (III) heksafenolat. Ion Fe^{3+} mengalami hibridisasi orbital $d^2 sp^3$ sehingga ion Fe^{3+} ($4s^0 3d^5$) memiliki 6 orbital kosong yang diisi oleh pendonor pasangan elektron, yaitu atom oksigen pada senyawa fenolik yang memiliki pasangan elektron bebas (Marliana dan Saleh, 2011). Persamaan reaksinya ditunjukkan pada **Gambar 4.4**.



Gambar 4.4 Reaksi Dugaan Uji Fenol (Nafisah, dkk., 2014)

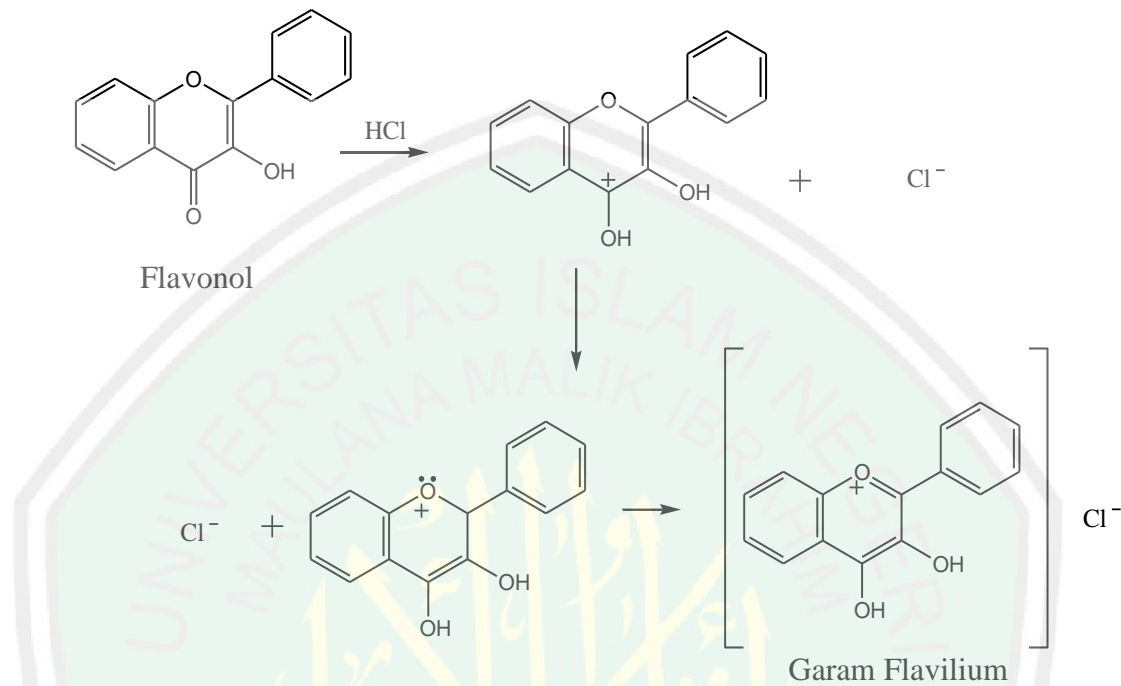
Ekstrak bekatul terfermentasi menunjukkan adanya warna kecokelatan yang lebih pekat dibandingkan dengan ekstrak bekatul tanpa fermentasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa jumlah senyawa fenolik pada ekstrak bekatul terfermentasi yang terdeteksi semakin banyak. Pembukaan serat pada proses fermentasi dapat membebaskan senyawa fenolik terikat (Saropah, dkk., 2012). Penelitian Oliveira, dkk. (2012) menunjukkan bahwa terdapat peningkatan total senyawa fenolik pada ekstrak bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae*. Senyawa aktif pada golongan fenolik diantaranya adalah asam fenolat, asam ferulat, dan asam galat (Friedman, 2013).

4.6.2 Uji Flavonoid

Ekstrak bekatul tanpa fermentasi dan ekstrak bekatul terfermentasi 120 jam diuji kandungan flavonoid menggunakan serbuk logam Mg dan HCl pekat. Ekstrak ditambahkan dengan metanol panas untuk melarutkan ekstrak. Penambahan logam Mg dan HCl pekat bertujuan untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat pada rangka flavonoid membentuk garam flavilium yang berwarna

jingga. Reaksi yang terjadi saat proses reduksi inti benzopiron seperti pada

Gambar 4.5.

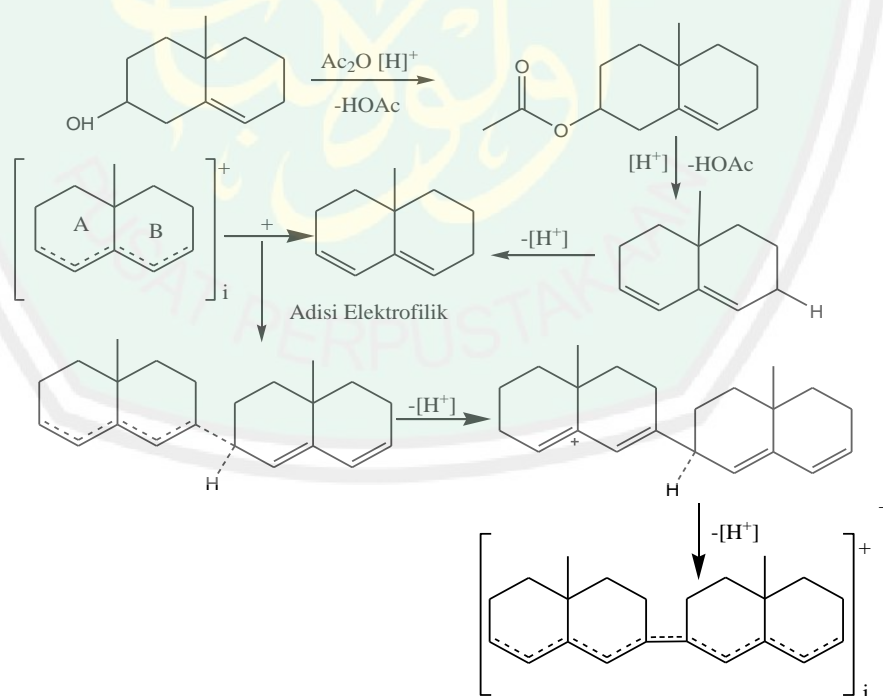


Gambar 4.5 Reaksi Reduksi Inti Benzopiron Rangka Flavonol

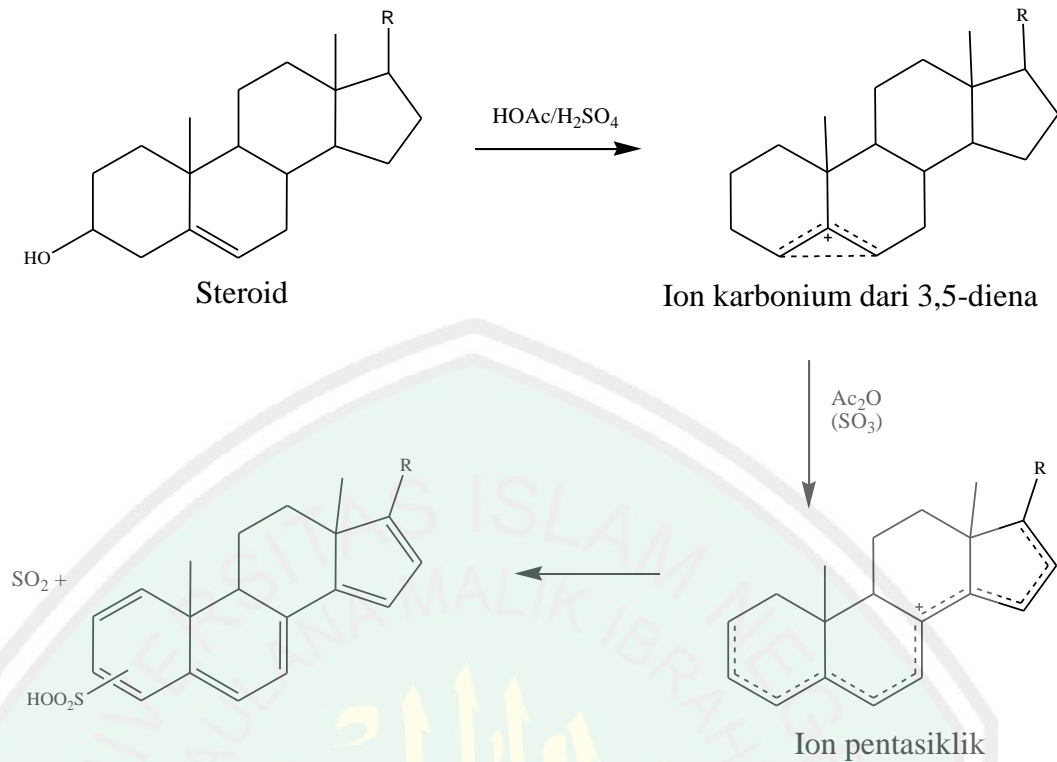
Kedua ekstrak menunjukkan hasil positif yang ditunjukkan dengan warna jingga kekuningan yang sangat tipis. Bekatul beras putih mengandung senyawa flavonoid yang rendah dibandingkan dengan bekatul beras merah atau hitam (Widarta, dkk., 2013). Sehingga pada uji flavonoid hanya menunjukkan warna kekuningan dengan intensitas sedang akibat kandungan flavonoid yang rendah. Senyawa flavonoid pada bekatul beras putih yaitu tricetin (Friedman, 2013).

4.6.3 Uji Steroid dan Terpenoid

Uji steroid dan terpenoid menggunakan uji Lieberman-Buchard menggunakan pereaksi asetat anhidrat dan H_2SO_4 pekat. Kandungan steroid dan terpenoid dapat dideteksi berdasarkan perubahan warna yang diakibatkan oleh pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi pada golongan senyawa steroid atau terpenoid. Reaksi diawali dengan proses asetilasi gugus hidroksil oleh asetat anhidrat. Gugus asetil merupakan gugus pergi yang baik sehingga akan lepas dan terbentuk ikatan rangkap pada rangka steroid atau terpenoid. Kemudian terjadi perpindahan ikatan rangkap yang disebabkan oleh pelepasan gugus hidrogen beserta elektronnya dan menyebabkan resonansi dan membentuk karbokation. Karbokation yang terbentuk akan menyebabkan adisi elektrofilik dan mengakibatkan perpanjangan konjugasi dan memunculkan cincin cokelat. Reaksi yang terjadi seperti pada **Gambar 4.6**.



Gambar 4.6 Reaksi Terpenoid dengan Pereaksi Liebermann-burchard (Siadi, 2012)

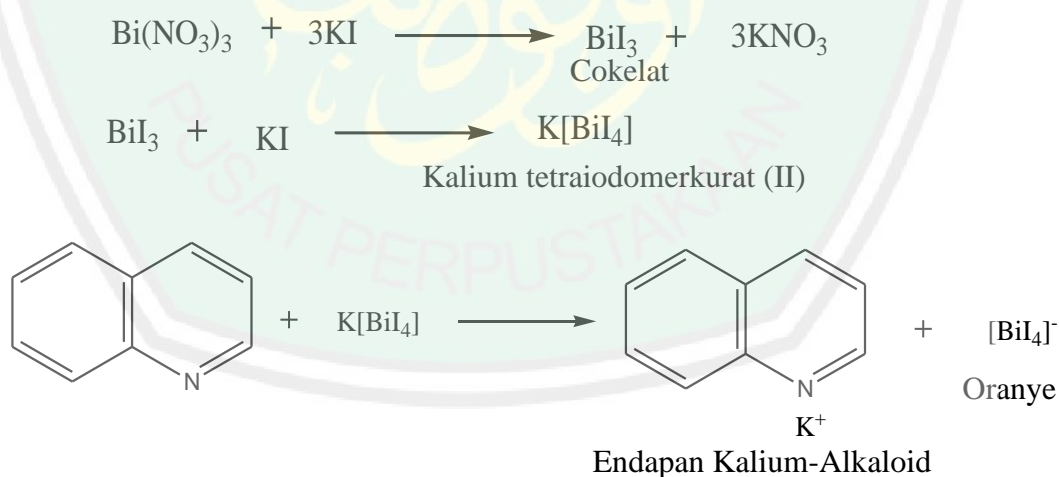


Gambar 4.7 Reaksi Dugaan Senyawa Steroid dengan Pereaksi Liebermann-Burchard (Burke, dkk., 1974).

Ekstrak bekatul kontrol dan bekatul terfermentasi 120 jam menunjukkan hasil positif pada uji terpenoid yang ditunjukkan dengan terbentuknya cincin coklat di antara dua larutan yang lebih pekat dibandingkan ekstrak bekatul tanpa fermentasi. Sedangkan kedua ekstrak tersebut juga menunjukkan hasil positif mengandung steroid dengan ditandai terdapatnya lapisan berwarna hijau dengan kepekatan ekstrak bekatul terfermentasi lebih pekat dibandingkan dengan ekstrak bekatul tanpa fermentasi. Adapun reaksi yang terbentuk ditunjukkan pada **Gambar 4.7**. Senyawa bioaktif bekatul yang termasuk pada golongan terpenoid adalah senyawa tokoferol dan tokotrienol. Sedangkan yang termasuk golongan steroid adalah senyawa oryzanol (Friedman, 2013).

4.6.4 Uji Alkaloid

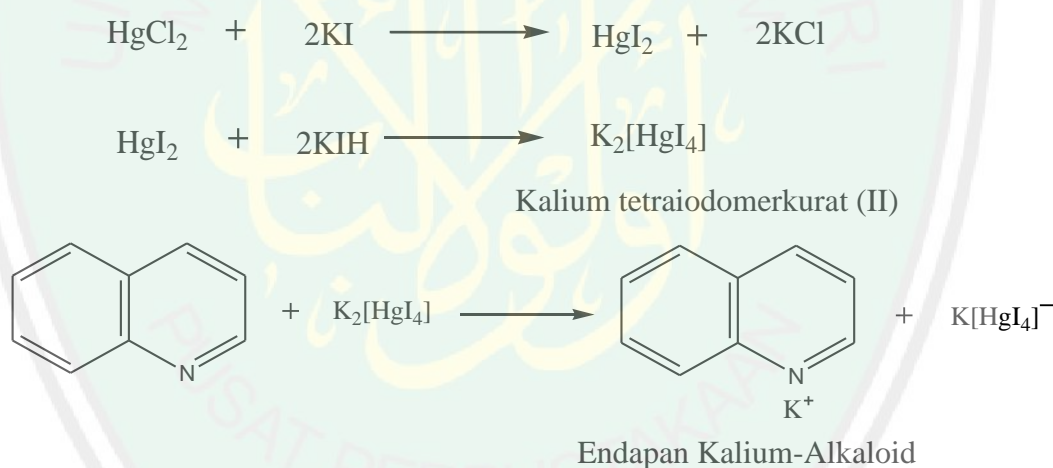
Uji alkaloid dilakukan dengan dua kali uji yaitu uji alkaloid dengan pereaksi Dragendorff dan pereaksi Mayer. Keberadaan senyawa alkaloid dengan uji Dragendorff ditandai dengan terbentuknya endapan jingga kecokelatan. Endapan tersebut merupakan kalium-alkaloid. Pereaksi Dragendorff terbuat dari bismut nitrat yang dilarutkan dalam HCl agar bismut tidak terhidrolisis membentuk bismutil (BiO^+). Ion Bi^{3+} bereaksi dengan kalium iodida membentuk endapan bismut (III) iodida kemudian terlarut dalam kalium iodida berlebih membentuk tetraiodobismutat. Atom nitrogen yang terkandung pada rangka alkaloid akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam K^+ . Reaksi yang terjadi seperti pada **Gambar 4.8**. Kedua ekstrak menghasilkan endapan jingga ketika ditambahkan pereaksi Dragendorff sehingga diketahui bahwa kedua ekstrak mengandung senyawa alkaloid.



Gambar 4.8 Reaksi Alkaloid dengan Pereaksi Dragendorff

Uji alkaloid dengan pereaksi Mayer akan menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya endapan putih kekuningan. Endapan tersebut

dimungkinkan adalah kompleks kalium-alkaloid. Pereaksi Mayer terbuat dari larutan merkuriem (II) klorida yang ditambahkan dengan kalium iodida yang menghasilkan endapan merah merkuriem (II) iodida. Kalium iodida ditambahkan secara berlebih sehingga akan terbentuk kalium tetraiodomerkurat(II). Atom N yang terdapat pada rangka alkaloid memiliki pasangan elektron bebas dan dimungkinkan akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang berbentuk endapan. Reaksi yang terjadi ditunjukkan pada **Gambar 4.9** Kedua ekstrak memberikan hasil positif yang ditunjukkan dengan terbentuknya endapan sehingga diketahui bahwa kedua ekstrak mengandung senyawa alkaloid berdasarkan uji alkaloid Mayer.



Gambar 4.9 Reaksi Alkaloid dengan Reagen Mayer

Ekstrak bekatul terfermentasi dan ekstrak bekatul tanpa fermentasi menunjukkan kepekatan endapan yang sama. Sehingga diketahui bahwa kandungan alkaloid pada ekstrak bekatul terfermentasi sama dengan ekstrak bekatul tanpa fermentasi. Hal tersebut dimungkinkan bahwa pada proses

fermentasi bekatul tidak membebaskan senyawa alkaloid terikat dan tidak terjadi peningkatan kandungan senyawa alkaloid.

4.7 Pengaruh Ekstrak Bekatul Terhadap Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Aloksan

4.7.1 Persiapan Mencit

Pemilihan mencit jantan sebagai hewan coba dikarenakan mencit jantan memiliki siklus reproduksi yang singkat dan relatif stabil sistem hormonalnya (Febrina dan Sari, 2019). Selain itu, mencit jantan memiliki metabolisme obat yang lebih cepat dibandingkan dengan mencit betina (Pitriya, dkk., 2017). Aklimatisasi mencit dilakukan selama satu minggu. Aklimatisasi dilakukan supaya mencit dapat menyesuaikan diri dengan kondisi dan lingkungan yang baru. Proses aklimatisasi meliputi kontrol kesehatan, berat badan, dan penyeragaman makanan (Aldi dan Arafat, 2013). Perubahan berat badan mencit selama aklimatisasi dapat diamati pada **Tabel 4.3**.

Tabel 4.3 Berat Badan Mencit Sebelum Aklimatisasi dan Setelah Aklimatisasi

Kelompok	Rata-rata Berat Badan mencit (gram)	
	Sebelum Aklimatisasi	Setelah Aklimatisasi
Kontrol Normal	16,70	17,20
Kontrol Negatif	18,70	22,27
Terapi Ekstrak Bekatul Tanpa Fermentasi 100 mg/Kg BB	15,90	19,97
Terapi Ekstrak Bekatul Tanpa Fermentasi 200 mg/Kg BB	16,70	18,50
Terapi Ekstrak Bekatul Terfermentasi 100 mg/Kg BB	16,07	17,43
Terapi Ekstrak Bekatul Terfermentasi 200 mg/Kg BB	16,63	20,40

Berat badan keseluruhan rata-rata mencit setelah aklimatisasi mengalami kenaikan. Berat badan mencit sebelum aklimatisasi adalah 13-19,9 gram dan setelah aklimatisasi mengalami peningkatan menjadi 15,1-25 gram. Kenaikan berat badan mencit merupakan indikasi mencit telah beradaptasi dengan lingkungan dan perlakuan baru sehingga aktivitas makan menjadi intensif dan pakan yang dikonsumsi mencit dapat digunakan untuk penambahan berat badan (Rakhmadi, dkk., 2009). Menurut Febrina dan Sari (2019), berat badan mencit selama aklimatisasi tidak mengalami penyimpangan berat badan lebih dari 20%. Beberapa mencit mengalami perubahan berat badan lebih dari 20% tetapi mencit secara visual menunjukkan perilaku yang normal dan sehat sehingga perlakuan dapat dilanjutkan.

Mencit yang telah diaklimatisasi diuji kadar glukosa darahnya untuk memastikan mencit berada pada kondisi normal. Uji kadar glukosa darah dilakukan menggunakan glukometer dengan prinsip glukosa dalam tetesan darah yang berada pada tes strip akan bereaksi secara enzimatik dan menghasilkan arus listrik kemudian total muatan listrik akan terdeteksi oleh elektroda, total muatan listrik sebanding dengan jumlah glukosa dalam darah (Lesmana dan Padli, 2019). Keseluruhan kadar glukosa darah mencit berada pada rentang normal yaitu <200 mg/dL (**Lampiran 6**).

Mencit dirandomisasi dan dibagi atas 6 kelompok dengan 2 kelompok perlakuan yaitu kelompok berisi mencit diabetes yang diterapi dengan ekstrak etanol bekatul terfermentasi dengan dosis 100 mg/Kg BB (BF100) dan dosis 200 mg/Kg BB (BF200), 4 kelompok kontrol terdiri atas kontrol normal yang berisi mencit normal (KN), kontrol negatif yang berisi mencit diabetes (K-), kontrol

ekstrak tanpa fermentasi yang berisi mencit diabetes yang diterapi dengan ekstrak bekatul tanpa fermentasi dosis 100 mg/Kg BB (BNF100) dan dosis 200 mg/Kg BB (BNF200).

4.7.2 Pengkondisian Mencit Diabetes Mellitus

Mencit diabetes diinduksi dengan larutan aloksan. Mekanisme perusakan sel β pankreas oleh aloksan yaitu aloksan dapat mendepolarisasi membran sel β pankreas sehingga terjadi peningkatan ion Ca^+ di dalam sel β pankreas menyebabkan kondisi homeostatis sel dan sel β pankreas mengalami lisis (Szkudelski, 2001). Kerusakan sel β pankreas menyebabkan penurunan sekresi insulin sehingga terjadi penumpukan glukosa di dalam darah (Nugroho, 2006).

Aloksan diberikan melalui injeksi intraperitoneal atau injeksi pada rongga yang berada pada kuadran kanan bawah perut mencit. Aloksan yang diinjeksi melalui rute intraperitoneal dapat terabsorpsi oleh pembuluh mesentrika dan mengalir menuju vena portal kemudian tertuju pada organ pankreas (Turner, dkk., 2011). Dosis aloksan yang diberikan adalah 200 mg/Kg BB mencit. Dosis tersebut dapat memberikan gejala diabetes ditunjukkan oleh meningkatnya kadar glukosa darah dengan tingkat kematian mencit yang rendah (Bukhari, dkk., 2015). Penelitian Sinata dan Arifin (2016) menunjukkan bahwa induksi aloksan dosis 200 mg/Kg BB mencit menyebabkan mencit mengalami diabetes dan tidak menyebabkan kematian pada mencit.

Kadar glukosa darah mencit setelah diinduksi dengan aloksan diuji pada hari ke-7 pasca induksi karena pada selang waktu tersebut dapat terlihat efek aloksan secara permanen. Penginduksian aloksan menyebabkan kadar glukosa

darah yang fluktuatif karena terjadi fase hiperglikemia dan hipoglikemia selama 48 jam secara bergantian sebelum terjadinya hiperglikemia permanen (Rohilla dan Ali, 2012). Namun setelah penginduksian aloksan pertama, keseluruhan kadar glukosa darah mencit masih dibawah 200 mg/dL sehingga perlu dilakukan induksi yang kedua. Setelah dilakukan induksi kedua dengan dosis yang sama, mayoritas mencit telah mengalami diabetes ditandai dengan kadar glukosa >200 mg/dL (**Lampiran 6**). Beberapa mencit yang belum mengalami gejala diabetes diinduksi ulang dengan dosis yang sama sehingga keseluruhan kadar glukosa darah mencit >200 mg/dL. Kenaikan kadar glukosa yang berbeda disebabkan oleh respons dan metabolisme tubuh masing-masing mencit terhadap aloksan berbeda sehingga menghasilkan kenaikan kadar glukosa darah yang cukup beragam (Hikma, dkk., 2016).

4.7.3 Perlakuan dengan Ekstrak Bekatul Terfermentasi

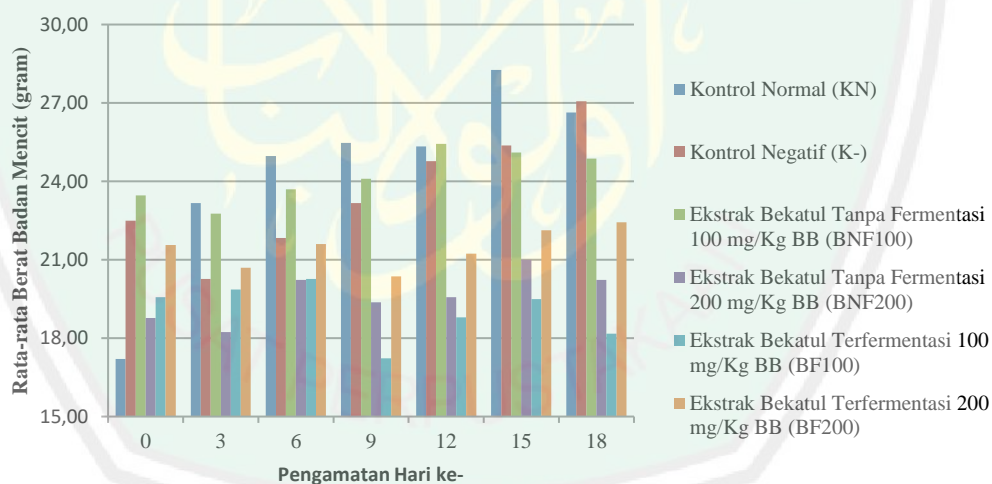
Mencit yang telah memiliki kadar glukosa >200 mg/dL diterapi dengan ekstrak sesuai dengan pembagian kelompok selama 19 hari. Ekstrak bekatul disiapkan dalam sediaan suspensi menggunakan agen suspensi larutan Na-CMC 0,5% karena ekstrak tidak dapat larut dalam air, sedangkan sediaan diperlukan dalam bentuk cair untuk mempermudah pemberian kepada mencit secara oral. Pemilihan Na-CMC sebagai agen suspensi karena tidak toksik dan dapat meningkatkan viskositas sehingga meningkatkan kestabilan suspensi ekstrak (Suena, 2015). Pengamatan yang dilakukan pada penelitian ini antara lain berat badan, kadar glukosa darah, dan jumlah sel limfosit mencit. Perubahan berat

badan diamati setiap 3 hari sekali dan perubahan kadar glukosa darah diamati pada hari ke- 7, 11, 15, 19. Sedangkan jumlah sel limfosit diamati pada hari ke-20.

4.7.3.1 Perubahan Berat Badan Mencit

Kondisi diabetes menyebabkan sel tidak mampu memanfaatkan glukosa sebagai sumber energi sehingga sel akan mencari sumber energi lain melalui mekanisme glukoneogenesis. Proses glukoneogenesis menyebabkan berkurangnya massa lemak maupun protein dan berimbas pada penurunan berat badan penderita diabetes (Rias dan Sutikno, 2017). Pengamatan perubahan berat badan mencit dimulai dari hari ke-0 pemberian ekstrak hingga hari ke-18 dapat dilihat pada

Gambar 4.10.



Gambar 4.10 Grafik Berat Badan Mencit Setelah Terapi Ekstrak Bekatul.

Berat badan mencit pada kontrol negatif (K-) terus mengalami peningkatan disebabkan adanya peningkatan konsumsi pakan dan air minum pada mencit seiring dengan kondisi diabetes yang terjadi pada mencit (Bukhari, dkk., 2015). Selain itu, adanya kemungkinan insulin yang masih terbebaskan dengan kadar

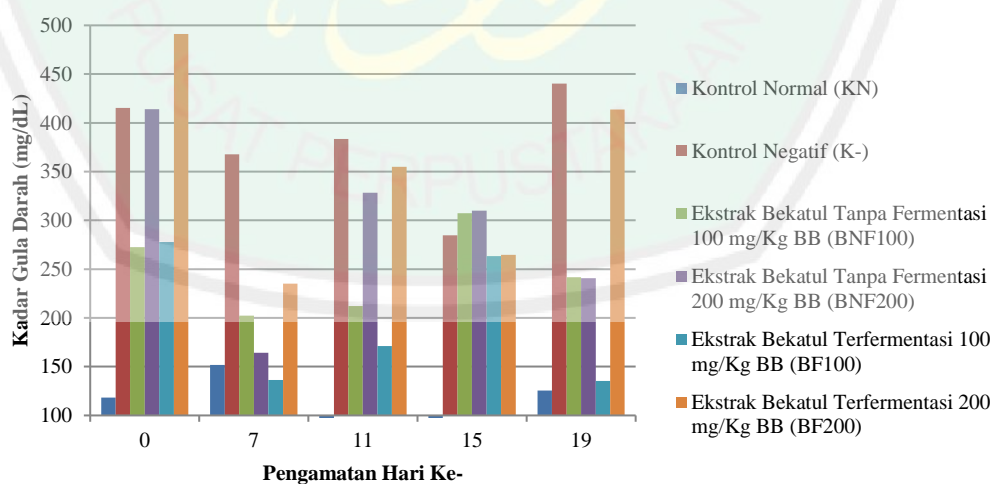
rendah menyebabkan sel masih dapat memanfaatkan glukosa darah sebagai sumber energi dan mencukupi kebutuhan kalori menciit diabetes. Asupan pakan yang berlebihan pada menciit menyebabkan tubuh menciit menyimpan cadangan nutrisi dalam bentuk lemak sehingga menciit mengalami peningkatan berat badan. Penelitian Firdaus, dkk. (2016) menunjukkan peningkatan berat badan tikus diabetes yang diberikan diet tinggi sukrosa.

Kelompok terapi diabetes mengalami penurunan berat badan pada hari ke-3 dibandingkan dengan kelompok normal (KN). Kondisi diabetes menyebabkan sel mencari sumber energi yang lain yaitu lemak dan protein menyebabkan penurunan massanya (Setiadi, 2007). Keseluruhan rata-rata berat badan menciit mengalami kenaikan pada hari ke-6. Hal tersebut menunjukkan perbaikan metabolisme dalam tubuh menciit. Kandungan senyawa bioaktif berupa γ -oryzanol dan γ -tokotrienol dalam ekstrak bekatul dapat meningkatkan sensitivitas sel terhadap insulin sedangkan kandungan senyawa vitamin B15 dapat memperbaiki metabolisme tubuh (Kurniawan dan Indriyani, 2018) sehingga meningkatkan massa lemak dan protein yang ditandai oleh meningkatnya berat badan menciit.

Hari ke-9 sampai hari ke-18, terjadi perubahan berat badan menciit yang beragam. Hal tersebut dimungkinkan adanya perbedaan metabolisme tubuh menciit yang berbeda sehingga peningkatan massa lemak dan massa protein serta respons peningkatan konsumsi pakan menciit semakin beragam (Hikma, dkk., 2016). Penelitian Nugroho, dkk. (2017), menunjukkan bahwa terapi ekstrak etanol bekatul beras hitam dosis tinggi (225 mg/200 g BB tikus) dapat mengembalikan berat badan tikus yang terpapar aloksan (diabetes) berada pada kisaran normal jika dibandingkan dengan kontrol tikus normal.

4.7.3.2 Perubahan Kadar Glukosa Darah Mencit

Perubahan kadar glukosa darah setelah dilakukan perlakuan selama 19 dapat dilihat pada **Gambar 4.11**. Kadar glukosa darah keseluruhan mencit diabetes yang telah diinduksi aloksan berada di atas 200 mg/dL dengan nilai yang variatif. Pemberian terapi ekstrak selama 7 hari dapat menurunkan kadar glukosa darah mencit diabetes kelompok BNF200 dan BF100 ke ambang kadar glukosa darah normal (<200 mg/dL). Penurunan tersebut dimungkinkan terdapat mekanisme antioksidan pada ekstrak dalam menetralkan stress oksidatif yang terjadi pada sel β -pankreas sehingga terdapat perbaikan sel β -pankreas dan meningkatkan sekresi insulin dalam darah. Peningkatan sekresi insulin dalam darah meningkatkan penyerapan glukosa darah oleh sel sebagai sumber energi (Wahyuni dan Munawaroh, 2015). Namun setelah dilanjutkan terapi sampai 11 hari, terjadi peningkatan kadar glukosa darah. Peningkatan kadar glukosa darah pada kelompok BF100 masih berada pada ambang kadar glukosa darah normal.



Gambar 4.11 Grafik Kadar Glukosa Darah Mencit Setelah Terapi Ekstrak Bekatul.

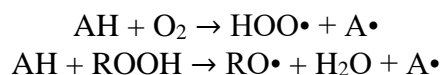
Kadar glukosa darah mencit kelompok diabetes pada hari ke-11 sampai ke-19 mengalami fluktuasi tetapi keseluruhan mencit diabetes yang diterapi mengalami penurunan kadar glukosa darah dibandingkan dengan dengan kadar glukosa darah pada awal terapi. Kadar glukosa darah mencit kelompok BNF100, BNF200 dan BF200 pada akhir terapi belum memberikan penurunan kadar glukosa sampai keambang kadar glukosa normal (<200 mg/dL). Hal tersebut dimungkinkan akibat lama terapi yang diberikan terbatas selama 19 hari. Penelitian Palupi, dkk. (2019) menunjukkan bahwa terapi ekstrak pegagan pada tikus diabetes dosis 600 mg/Kg BB selama 35 hari memberikan penurunan kadar glukosa darah keambang normal dan lebih rendah yaitu 109 mg/dL dibandingkan dengan pemberian terapi selama 28 hari yaitu 142 mg/dL. Kadar glukosa darah kelompok BF100 menunjukkan persen penurunan tertinggi mencapai 51,26% dan kelompok BNF200 dengan persen penurunan 41,87% (**Lampiran 6**).

Terapi ekstrak bekatul terfermentasi menunjukkan persen penurunan kadar glukosa lebih tinggi dibandingkan dengan terapi ekstrak bekatul tanpa fermentasi. Hal tersebut dimungkinkan karena proses fermentasi dapat membebaskan senyawa fenolik yang terikat pada serat bekatul, meningkatnya fenolik bebas akan meningkatkan kadar antioksidan dalam ekstrak (Saropah, dkk., 2012). Penurunan kadar glukosa darah disebabkan oleh senyawa bioaktif yang terdapat pada ekstrak. Senyawa golongan terpenoid berfungsi sebagai antioksidan diantaranya yaitu senyawa tokoferol dan tokotrienol dapat menyumbangkan atom hidrogennya kepada radikal bebas sehingga radikal bebas menjadi senyawa yang lebih stabil. Senyawa fenolik sederhana seperti asam fenolat, asam ferulat, asam fitat dan asam galat dapat mengurangi stres oksidatif sehingga menekan terjadinya kerusakan

pada sel β pankreas (Widowati, 2008). Senyawa golongan steroid berupa γ -oryzanol menstimulasi sekresi insulin pada pankreas (Friedman, 2013). Flavonoid berupa tricetin dapat menghambat aktivitas enzim α -glukosidase sehingga dapat menghambat pemecahan polisakarida menjadi glukosa sebelum memasuki sirkulasi darah melalui penyerapan epitelium duodenum (Rachmania dan Cristina, 2016; Sundhani, dkk., 2016). Alkaloid memiliki kemampuan regenerasi sel β pankreas sehingga terjadi peningkatan sekresi insulin (Putri, dkk., 2013).

Terapi ekstrak bekatul terfermentasi dosis 100 mg/Kg BB lebih efektif memberikan persen penurunan kadar glukosa dan mempertahankan kadar glukosa darah mencit diabetes hingga kisaran normal dibandingkan dengan pemberian terapi ekstrak dosis 200 mg/Kg BB. Semakin tinggi dosis yang diberikan maka kadar senyawa antioksidan semakin tinggi pula. Namun, antioksidan dengan kadar yang tinggi dapat bertindak sebagai senyawa antagonis karena dapat berperan sebagai prooksidan. Semakin tinggi dosis yang diberikan, semakin tinggi pula kandungan zat antagonisnya. Penelitian Marianne, dkk. (2011) menunjukkan bahwa terapi ekstrak etanol daun kluwih dosis rendah (50 mg/Kg BB mencit) lebih efektif dibandingkan dengan pemberian ekstrak dosis tinggi (100, 200, 400 mg/Kg BB mencit). Pemberian ekstrak dengan dosis yang lebih tinggi menyebabkan efek senyawa antagonis muncul lebih cepat. Penelitian Dipa, dkk. (2012), menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun sukun dosis 100 mg/Kg BB tikus lebih efektif menurunkan kadar glukosa darah tikus diabetes dibandingkan dengan pemberian ekstrak daun sukun dosis 200 mg/Kg BB tikus akibat adanya senyawa antagonis penyebab menurunnya efek hipoglikemik senyawa flavonoid dalam ekstrak daun sukun. Menurut Gordon (1990), aktivitas antioksidan senyawa

fenolik akan hilang dan menjadi prooksidan pada konsentrasi yang tinggi. Hal tersebut disebabkan oleh reaksi inisiasi seperti pada **Gambar 4.12**.

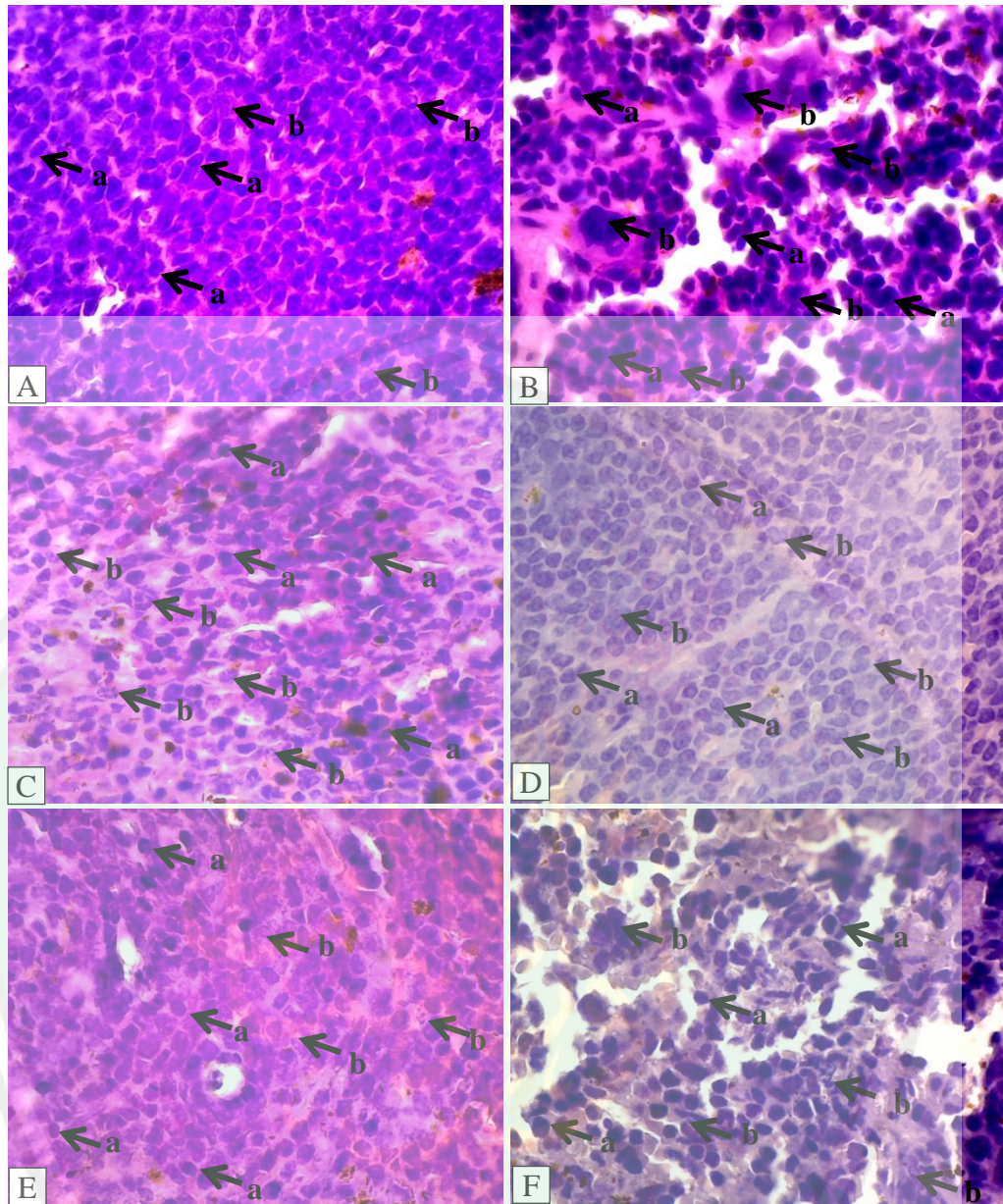


Keterangan	:
AH	: Antioksidan
A•	: Radikal antioksidan
HOO•	: Radikal hidroperoksida
ROOH	: Hiperperoksida
RO•	: Radikal bebas

Gambar 4.12 Reaksi Inisiasi Prooksidan (Gordon, 1990)

4.7.3.3 Pengamatan Histologi Limpa Mencit

Limpa merupakan organ yang banyak mengandung jaringan limfoid untuk fungsi imunologi. Peningkatan sistem imun akan meningkatkan efek protektif tubuh terhadap antigen yang dapat merusak sel. Kerusakan sel akibat radikal bebas menyebabkan memacu sistem imun (Yuliani, 2011). Namun, kondisi diabetes dapat mengurangi kapasitas respons imun, diantaranya yaitu supresi fungsi sel imun, dan atrofi (Ebaid, dkk., 2015). Perubahan histologi limpa diamati berdasarkan pewarnaan Hematoxylin-eosin. Kerusakan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 x. Kerusakan sel yang diamati yaitu nekrosis. Menurut Elmore, dkk. (2016), sel yang mengalami nekrosis dapat ditandai dengan adanya pembengkakan sel dan inti sel, sitoplasma yang pucat, inti sel yang memudar (kariolisis), fragmentasi inti sel (karioreksis), penyusutan inti sel (piknosis), dan bocornya membran sel. Histologi limpa mencit dapat dilihat pada **Gambar 4.13**.



Gambar 4.13 Histologi Limpa Mencit Setelah Terapi Ekstrak Bekatul. (A) KN, (B) K-, (C) BNF100, (D) BNF200, (E) BF100, (F) BF200, (a) Sel Normal, (b) Sel Nekrosis.

Histologi limpa mencit menunjukkan bahwa sel limfosit pada limpa mencit kelompok normal terdistribusi secara teratur. Distribusi sel limfosit pada limpa mencit kontrol negatif (K-) cenderung acak, sedangkan pada mencit kelompok BNF200 dan mencit kelompok BF100 terdapat perbaikan distribusi sel secara teratur. Ketidakteraturan distribusi limfosit menimbulkan adanya ruang

kosong yang akan diperlukan untuk pertumbuhan sel-sel limfosit muda (Yuliani, 2011). Jumlah sel limfosit normal dan nekrosis dapat dilihat pada **Tabel 4.4**.

Tabel 4.4 Jumlah Sel Limfosit Mencit Setelah Terapi

Kelompok	Rata-rata Jumlah Sel Limfosit		% Sel Nekrosis
	Normal	Nekrosis	
Kontrol Normal (KN)	215,00	11,67	5,15
Kontrol Negatif (K-)	126,00	20,33	13,90
Ekstrak Bekatul Tanpa Fermentasi 100 mg/Kg BB (BNF100)	133,33	20	13,04
Ekstrak Bekatul Tanpa Fermentasi 200 mg/Kg BB (BNF200)	211,33	11,67	5,23
Ekstrak Bekatul Terfermentasi 100 mg/Kg BB (BF100)	142,00	16	10,13
Ekstrak Bekatul Terfermentasi 200 mg/Kg BB (BF200)	163,00	11,3	6,50

Kelompok kontrol negatif (K-) memiliki jumlah limfosit terendah dan persen sel nekrosis tertinggi. Hal tersebut dikarenakan kondisi hiperglikemia pada diabetes diduga dapat memicu stress mitokondria. Khan, dkk. (2011) menyatakan bahwa penderita diabetes mellitus akut maupun yang telah mengalami komplikasi kronis memiliki hubungan terbalik antara *mitochondrial DNA content* pada limfosit dengan level *Hemoglobin Alc(HbAlc)*. Hal ini menandakan semakin tinggi kondisi hiperglikemia yang ditunjukkan dengan level HbA1c, maka semakin banyak kerusakan pada mitokondria limfosit (Khan, dkk., 2011). Mitokondria diperlukan sebagai penyedia energi untuk proses metabolisme sel termasuk metabolisme fungsi sel limfosit. Penelitian Warif, dkk. (2014) menunjukkan bahwa tikus diabetes memiliki jumlah sel limfosit $1,17 \times 10^7$ sel lebih sedikit dibandingkan dengan tikus normal yang memiliki jumlah sel limfosit $2,52 \times 10^7$ sel. Jumlah limfosit kelompok perlakuan lebih sedikit dibandingkan kelompok kontrol normal dapat disebabkan oleh adanya stres oksidatif pada

semua bagian sel, termasuk mitokondria akibat kondisi diabetes (Dewi, dkk., 2014). Tingginya radikal bebas menyebabkan peningkatan kadar sitokin pro-inflamatori dan menyebabkan terjadinya kematian sel yang terprogram (Ebaid, dkk., 2015)

Jumlah sel limfosit mencit kelompok terapi bekatul tanpa fermentasi dosis 200 mg/Kg BB mendekati jumlah sel limfosit kontrol normal dan terdapat penurunan persen jumlah sel nekrosis. Antioksidan yang terdapat pada ekstrak bekatul tanpa fermentasi dapat memulihkan regenerasi sel dan menurunkan kematian sel akibat nekrosis. Penelitian Malini, dkk. (2019) menunjukkan bahwa mencit diabetes yang diterapi dengan ekstrak etanol kulit jengkol dosis 770 mg/Kb BB mencit memiliki jumlah sel limfosit nekrosis yang lebih rendah yaitu 153,50 per 1000 sel limfosit dibandingkan dengan mencit diabetes yaitu 242,75 per 1000 sel limfosit. Antioksidan seperti senyawa flavonoid dapat mengurangi jumlah sel yang mengalami inflamasi. Selain itu, flavonoid dapat menekan pelepasan radikal O_2 dengan menekan kerusakan endothelial dengan menghambat inisiasi atau propagasi reaksi oksidasi berantai dan sebagai antiinflamasi yang dapat menghambat reaksi inflamasi dengan demikian mencegah lebih banyak makrofag (Malini, dkk., 2019). Selain itu, asam linoleat dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit sehingga meningkatkan jumlah sel limfosit (Sierra, dkk., 2005).

Jumlah sel mencit kelompok terapi bekatul terfermentasi dosis 200 mg/Kg BB dapat meningkatkan jumlah sel limfosit meskipun tidak sebanyak jumlah sel limfosit pada kelompok terapi ekstrak bekatul tanpa fermentasi dosis 200 mg/Kg BB. Hal tersebut dapat dimungkinkan bahwa proses pembebasan senyawa

antioksidan pada proses fermentasi meningkatkan kadar antioksidan dalam ekstrak. Kadar antioksidan yang terlalu tinggi dapat bersifat antagonis membentuk senyawa prooksidan yang menyebabkan turunnya sifat hipoglikemik antioksidan seiring meningkatnya radikal bebas yang terbentuk (Dewi, dkk., 2012).

Data jumlah sel limfosit dianalisis secara statistik menggunakan analisis variasi (ANOVA) dengan taraf signifikansi $\alpha = 0,05$ untuk mengetahui adanya pengaruh nyata ekstrak bekatul tanpa fermentasi dan terfermentasi terhadap jumlah sel limfosit mencit. Hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa nilai signifikan adalah ,000 (sig. < 0,05) dan nilai F_{hitung} adalah 13,065 ($> F_{tabel} = 3,11$) sehingga diketahui paling tidak terdapat satu pasang terapi yang mempengaruhi jumlah sel mencit.

Tabel 4.5 Hasil Uji Lanjut Tukey Terhadap Jumlah Sel Limfosit Mencit

Kelompok	Rata-rata \pm SD	Notasi
Kontrol Negatif (K-)	126,00 \pm 7,94	a
Ekstrak Bekatul Tanpa Fermentasi 100 mg/Kg BB (BNF100)	133,33 \pm 18,34	a
Ekstrak Bekatul Terfermentasi 100 mg/Kg BB (BF100)	142,00 \pm 7,94	a
Ekstrak Bekatul Terfermentasi 200 mg/Kg BB (BF200)	163,00 \pm 9,54	ab
Ekstrak Bekatul Tanpa Fermentasi 200 mg/Kg BB (BNF200)	211,33 \pm 23,03	bc
Kontrol Normal (KN)	215,00 \pm 36,25	c

Uji lanjut Tukey dengan taraf signifikansi $\alpha = 0,05$ dilakukan untuk mengetahui perbedaan pengaruh pada masing-masing perlakuan. Berdasarkan notasi yang terdapat pada **Tabel 4.5**, diketahui bahwa kelompok K- memiliki jumlah sel limfosit terendah dan tidak berbeda nyata dengan perlakuan BNF100 dan BF100 sehingga kedua terapi ekstrak tersebut tidak memberikan pengaruh

nyata terhadap jumlah sel limfosit dibandingkan dengan jumlah sel limfosit mencit diabetes. Sedangkan perlakuan BF200 tidak berbeda nyata dengan K- dan BNF200 tetapi berbeda nyata dengan KN sehingga perlakuan BF200 meningkatkan jumlah sel limfosit meski masih tidak berbeda signifikan dengan jumlah sel limfosit mencit diabetes (K-). Perlakuan BNF200 berbeda nyata dengan K- tetapi tidak berbeda nyata dengan KN yang memiliki jumlah rata-rata sel limfosit tertinggi, sehingga perlakuan BNF200 dapat memperbaiki kerusakan dan mengembalikan jumlah sel limfosit seperti jumlah sel limfosit mencit normal.

Penurunan kadar glukosa darah mencit tidak sejalan dengan peningkatan jumlah sel limfosit mencit yang mengalami diabetes dan telah diterapi dengan ekstrak bekatul pada masing-masing kelompok. Hal tersebut dikarenakan kondisi hiperglikemia tidak menyebabkan stress oksidatif pada limpa secara langsung, tetapi melalui perubahan kondisi tubuh mencit. Kematian sel pankreas dan adanya antigen atau zat asing berupa aloksan dan radikal bebas pada tubuh penderita diabetes menyebabkan aktifnya sistem imun. Tingginya jumlah radikal bebas menyebabkan sistem imun menghasilkan sitokin pro-inflamasi yang menyebabkan nekrosis pada sel limfosit. Sedangkan mekanisme perbaikan sel limfosit dan penurunan kadar glukosa berbeda (Warif, dkk., 2014; Yuliani, 2011).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak bekatul dapat menurunkan kadar glukosa darah dan mengembalikan jumlah limfosit ke rentang normal. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak bekatul dapat mengobati penyakit diabetes yang merupakan salah satu kuasa Allah Swt. atas makhluk-makhluk-Nya bahwa penyakit seperti penyakit diabetes memiliki obatnya masing-masing atas ridho

Allah Swt.. Kuasa tersebut tertulis sebagaimana firman Allah Swt. dalam Al-Qur'an surat Asy-Syu'ara ayat 80:

وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ ﴿٨٠﴾

Artinya: “*dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan aku*”.

Penyakit merupakan suatu kemungkinan yang pasti dalam kehidupan manusia. Penyakit dapat berupa sakit ringan maupun berat ataupun sakit fisik ataupun mental. Gaya hidup manusia yang kurang memperhatikan gizi yang dikonsumsi dan kurangnya aktivitas dapat menimbulkan berbagai penyakit salah satunya adalah penyakit diabetes mellitus. Segala hal negatif hendaknya dicari terlebih dahulu penyebabnya pada tubuh manusia sedangkan segala hal yang indah dan terpuji seperti kenikmatan sembuh dari penyakit merupakan mutlak bersumber Allah Swt. (Abdullah, 2004). Hal tersebut bukan bermaksud bahwa manusia hanya perlu menunggu tanpa berusaha meraih kesembuhan. Kesembuhan tersebut dapat melalui perantara obat sedangkan yang menyembuhkan adalah Allah Swt. Nabi Muhammad saw. memerintahkan manusia hendaknya berobat ketika sakit karena setiap penyakit memiliki obatnya masing-masing seperti pada hadis yang diriwayatkan oleh Buhkari :

حَدَّثَنَا مُحَمَّدُ بْنُ الْمُثَنَّى حَدَّثَنَا أَبُو أَحْمَدَ الرَّيِّرِيُّ حَدَّثَنَا عُمَرُ بْنُ سَعِيدِ بْنِ أَبِي حُسَيْنٍ قَالَ حَدَّثَنِي عَطَاءُ بْنُ أَبِي رِيَّاحٍ عَنْ أَبِي هُرَيْرَةَ رَضِيَ اللَّهُ عَنْهُ عَنِ النَّبِيِّ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ قَالَ مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

Artinya: “*Telah menceritakan kepada kami Muhammad bin al-Mutsanna telah menceritakan kepada kami Abu Ahmad Az Zubairi telah menceritakan*

kepada kami 'Umar bin Sa'id bin Abu Husain dia berkata; telah menceritakan kepadaku 'Atha`bin Abu Rabah dari Abu Hurairah radliallahu 'anhu dari Nabi shallallahu 'alaihi wasallam beliau bersabda: "Allah tidak akan menurunkan penyakit melainkan menurunkan obatnya juga." (HR. Bukhari).

Hadist tersebut memerintahkan manusia hendaknya berusaha mencari obat dan senantiasa berpikir obat yang sesuai dengan penyakit tertentu. Allah Swt. menurunkan suatu penyakit maka Allah Swt. juga menurunkan perantara obat untuk mencapai kesembuhan. Perantara obat dapat berupa obat kimia maupun obat herbal. Oleh sebab itu, Allah menciptakan manusia dengan akal sehingga dapat memanfaatkan hal yang ada di bumi dengan sebaik-baiknya meskipun hal tersebut berupa hasil samping atau limbah seperti ekstrak bekatul yang dapat meredakan penyakit diabetes mellitus.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi ekstrak bekatul tanpa fermentasi dan terfermentasi berpengaruh pada glukosa darah dan histologi organ limpa mencit diabetes. Penurunan kadar glukosa darah tertinggi terdapat pada perlakuan ekstrak bekatul tanpa fermentasi 200 mg/Kg BB yaitu 41,87% dan perlakuan ekstrak bekatul terfermentasi 100 mg/Kg BB yaitu 51,26%. Jumlah sel limfosit tertinggi terdapat pada perlakuan ekstrak bekatul tanpa fermentasi 200 mg/Kg BB yaitu 211 sel dan perlakuan ekstrak bekatul terfermentasi 200 mg/Kg BB yaitu 163 sel.

5.2 Saran

Perbaikan yang dapat dilakukan pada penelitian selanjutnya diantaranya:

1. Perlu dilakukan penelitian dengan variasi dosis ekstrak bekatul untuk mengetahui tren dan dosis optimum karena pada penelitian ini masih terbatas menggunakan perbandingan dua dosis dan belum diketahui dosis yang optimum dalam menurunkan kadar glukosa darah dan memperbaiki sel limfosit mencit diabetes.
2. Perlu dilakukan penelitian dengan penambahan durasi lama terapi untuk memaksimalkan efek kuratif dari ekstrak bekatul karena lama terapi 19 hari pada penelitian ini belum dapat menurunkan kadar glukosa darah ke ambang normal (<200 mg/dL) pada beberapa mencit diabetes.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah. 2004. *Tafsir Ibnu Katsir*. Terjemahan oleh M. Abdul Goffar E. M., Abdurrahim M., dan Abu I. A. Bogor: Pustaka Imam Asy-Syafi'i.
- Adi, A.A.A.M. 2015. *Teknik Immunostaining*. Denpasar: Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana.
- Adjie, D., Zuliyanti, dan Larashanty, H. 2007. Perbandingan Efektivitas Sterilisasi Alkohol 70%, Inframerah, Otoklaf, dan Ozon Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus subtilis*. *J. Sain Vet.* 25(1): 17-24.
- Aldi, Y. dan Arafat, M.Y. 2013. Uji Efek Anti Anafilaksis Kutan Aktif Dari Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) Pada Mencit Putih Jantan. *Jurnal Farmasi Higea*. 5(2): 186-197.
- Amalia, R.N. 2016. Pengaruh pH dan Suhu Pada Peningkatan Aktivitas Antioksidan Bekatul Terfermentasi oleh *Bacillus brevis*. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang .
- Andri, W.Y. 2007. Produksi Mencit Putih (*Mus musculus*) dengan Subtitusi Bawang Putih (*Allium sativum*) dalam Ransum. *Skripsi*. Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.
- Antari, N.M.R.O., Watini, N.M., dan Mulyani, S. 2015. Pengaruh Ukuran Partikel dan Lama Ekstraksi Terhadap Karakteristik Ekstrak Warna Alami Buah Pandan. *J. Rekyasa dan Manajemen Agroindustri*. 3(4): 30-40.
- Astawan, M., dan Febrinda, A.E. 2010. Potensi Dedak dan Bekatul Beras Sebagai Ingredient Pangan dan Produk Pangan Fungsional. *Artikel Pangan*. 19(1): 14-21.
- Balitbang Kemenkes. 2018. *Riset Kesehatan Dasar; RISKESDAS*. Jakarta: Balitbang Kemenkes RI 2018.
- Booolotion, R.A. 1991. *Zoologi*. New York: Macmillan Publishing Co.
- Burke, R.W., Diamondstone, B.I., Velapoldi, R.A., dan Menis, O. 1974. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol. *Glin. Chem.* 20(7): 794-801.
- Bukhari, S.S.I., Abbasi, M.H., dan Khan, M.K.A. 2015. Dose Optimization Of Alloxan For Diabetes In Albino Mice. *BIOLOGIA*. 61(2): 301-305.
- Cappuccino, J.G. dan Natalie, S. 2013. *Manual Laboratorium Biologi*. Jakarta: EGC.
- Cesta, M.F. 2006. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *Toxicol. Pathol.* 34: 455-465

- Chen, M.H., dan Bergman, C.J. 2005. A Rapid Procedure For Analysing Rice Bran Tocopherol, Tocotrienol and γ -Oryzanol Contents. *J. Food Compos. Anal.* 18: 139–151.
- Datusalia, A.K., Dora, C.P., dan Sharma, S. 2012. Acute and Chronic Hypoglycemic Activity Of *Sida Tiagii* Fruits In N5-Streptozotocin Diabetic Rats. *Acta poloniae pharmaceutica.* 69(4): 699-706.
- Depkes RI. 2005. *Pharmaceutical Care Untuk Penyakit Diabetes Mellitus.* Jakarta.
- Dewi, C, Purwoko,T., dan Pangastuti, A. 2005. Produksi Gula Reduksi oleh *Rhizopus oryzae* dari Substrat Bekatul. *Bioteknologi.* 2(1): 21-26.
- Dewi, L. 2012. Efek Ekstrak Kulit Buah Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) terhadap Peroksidasi Lipid Hepar Tikus Obesitas. *Jurnal Biologi.* Universitas Negeri Malang.
- Dewi, A.K., Rahardjo, I.B., dan Gunawan, A. 2014. Perbedaan Jumlah Limfosit Daerah PALS (*Periarterial Lymphoid Sheat*) Antara Mencit Sehat dan Mencit Diabetes. *Majalah Biomorfologi.* 27(1): 5-8.
- Dipa, I.P.A., Sudatri, N.W., dan Wiratmini, N.I. 2015. Efektivitas Ekstrak Daun Sukun (*Artocarpus communis* Forst.) dalam Menurunkan Kadar Glukosa Darah dan Mempertahankan Jumlah Sperma Pada Tikus (*Rattus norvedicus* L.). *Jurnal Simbiosis.* 3(1): 317-321.
- Djaeni, M. dan Listyadevi, Y.L. 2019. Peningkatan Kecepatan Proses dan Mutu Minyak Bekatul melalui Proses Ekstraksi Berbantuan Ultrasonik. *TEKNIK.* 40(1): 18-24.
- Ebaid, H., Al-Tamimi, J., Metwalli, A., Allam, A., Zohir, K., Ajarem, J., Rady, A., Alhazza, I.M., dan Ibrahim, K.E. 2015. Effect of STZ-Induced Diabetes on Spleen of Rats: Improvement by Camel Whey Proteins. *Pakistan J.Zool.* 47(4): 1109-1116.
- Elmore, S.A., Dixon, D., Hailey, J.R., Harada, T., Herbert, R.A., Maronpot, R.R., Nolte, T., Rehg, J.E., Rittinghausen, S., Rosol, T.J., Satoh, H., Vidal, J.D., Willard-Mack, C.L., dan Creasy, D.M. 2016. Recommendations from the INHAND Apoptosis/Necrosis Working Group. *Toxicol. Pathol.* 44(2): 173–188.
- Faizah, F., Kusnandar, F., dan Nurjanah, S. 2019. Senyawa Fenolik, Oryzanol, Dan Aktivitas Antioksidan Bekatul Yang Difermentasi Dengan *Rhizopus oryzae*. *J. Teknol. dan Ind. Pangan.* 31(1): 86–94.
- Febrina, M. dan Sari, S.F. 2019. Pengaruh Pemberian Infusa Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) Terhadap Kadar Glukosa Darah Mencit Putih (*Mus musculus*) yang Diberi Beban Glukosa. *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia.* 8(2): 60-66.

- Fikriyah, Z. 2018. Pengaruh Lama Fermentasi dan Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Antioksidan Bekatul Terfermentasi oleh *Rhizopus oryzae*. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang.
- Firdaus, Rimbawan, Marliyati, S.A., dan Roosita. Model Tikus Diabetes Yang Diinduksi Streptozotocin-Sukrosa Untuk Pendekatan Penelitian Diabetes Melitus Gestasional. *Jurnal MKMI*. 12(1): 29-34.
- Friedman, M. 2013. Rice Brans, Rice Bran Oils, and Rice Hulls: Composition, Food and Industrial Uses, and Bioactivities in Humans, Animals, and Cells. *J. Agric. Food Chem.* 61: 10626–10641
- Germain, G.S., dan Summerbell, R. 2006. *Identifying Filamentous Fungi*. London: Microbiological science.
- Gordon, M.H. 1990. *The Mechanism of Antioxidant Action In Vitro*. Dordrecht: Springer.
- Guyton, A.C. dan Hall. J. E. 2006. *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia: Saunder Elseiver.
- Harbone, J.B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: ITB.
- Hartati, S., Marsono, Y., Suparmo, dan Santoso, U. 2015. Komposisi Kimia Serta Aktivitas Antioksidan Ekstrak Hidrofilik Bekatul Beberapa Varietas Padi. *J. Agritech*. 35(1): 35-42.
- Herman, Rusli, R., Ilimu, E., Hamid, R., dan Haeruddin. 2011. Analisis Kadar Mineral Dalam Abu Buah Nipa (*Nypa fructicans*) Kaliwanggu Teluk Kendari Sulawesi Tenggara. *J. Trop. Pharm. Chem.* 1(2): 107–113.
- Hikmah, N., Yuliet, Y., dan Khaerati, K. 2016. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Salam (*Syzygium polyanthum* Wight.) Terhadap Glibenklamid Dalam Menurunkan Kadar Glukosa Darah Mencit (*Mus musculus*) Yang Diinduksi Aloksan. *Galen. J. Pharm.* 2(1): 24–30.
- Hu, W., Wells, J.H., Shin, T.-S., dan Godber, J.S. 1996. Comparison of isopropanol and hexane for extraction of vitamin E and oryzanols from stabilized rice bran. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73(12): 1653–1656.
- Husni, A., Putra, D.R., dan Lelana, I.Y.B. 2014. Aktivitas Antioksidan *Padina* sp. pada Berbagai Suhu dan Lama Pengeringan. *J. Pascapanen Dan Bioteknologi Kelaut. dan Perikanan*. 9(2): 165-173.
- Jusuf, A.A. 2009. *Histoteknik Dasar*. Jakarta: UI Press
- Karmakar, M., Ghosh, B., dan Ray, R.R., 2012. Effect of Extracellular Factors on Growth and Dimorphism of *Rhizopus oryzae* with Multiple Enzyme Synthesizing Ability. *Indian J Microbiol.* 52(2): 215-221.

- Khan, B., Raghuram, G.V., Bhargava, A., Pathak, N., Chandra, D.H., Jain, S.K., dan Mishra, P.K. 2011. Role and Clinical Significance of Lymphocyte Mitochondrial Dysfunction In Type 2 Diabetes Mellitus. *Translational Research*. 158(6): 344-359.
- Khoiriyah, S., Hanapi, A., Fasya, A.G., 2014. Uji Fitokimia Dan Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat, Kloroform Dan Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga Cokelat *Sargassum vulgare* Dari Pantai Kapong Pamekasan Madura. *ALCHEMY*. 3(2): 133-144.
- Kurniati, Y., Budijanto, S., Nuraida, L., dan Dewi, F.N.A. 2017. Peningkatan Senyawa Fenolik Bekatul dengan SSF (*Solid State Fermentation*) Sebagai Pencegah Kanker. *Iptek Tanaman Pangan*. 12(2): 97-103.
- Kurniawan, Y.D. dan Indriyani, P. 2018. Studi In Vivo Pengaruh Pemberian Bekatul Organik dan VITAMIN B-15 terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah. *Prosiding Seminar Nasional Unimus*. 1: 267-272.
- Kurniawati, D. M., Dharmana, E., Rachmawati, B., dan Pemayun, T. G. D. 2017. Pengaruh pemberian ekstrak kedelai hitam (*Glycine soja*.) berbagai dosis terhadap kadar glukosa darah, kadar insulin, dan HOMA-IR. *Jurnal Gizi Indonesia*. 6(1): 44-50.
- Kusumaningati, M.A., Nurhatika, S., dan Hakim, J.A.R., 2013. Pengaruh Konsentrasi Inokulum Bakteri *Zymomonas mobilis* dan Lama Fermentasi Pada Produksi Etanol dari Sampah Sayur dan Buah Pasar Wonokromo Surabaya. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 2(2):218-223.
- Lesmana, H.S. dan Padli. 2019. Studi Deskriptif Pemberian Larutan Glukosa Saat Pemulihan Aktif Dan Pasif Pada Mahasiswa Fakultas Ilmu Keolahragaan Universitas Negeri Padang. *Physical Education, Health, and Recreation*. 3(2): 26-36.
- Luthfianto, D., Noviyanti, R.D., dan Kurniawati, I. 2017. Karakterisasi Kandungan Zat Gizi Bekatul pada Berbagai Varietas Beras di Surakarta. ISSN: 2407-9189
- Ma, Q., Yuan, L., dan Zhuang, Y. 2018. Preparation, Characterization and in Vivo Antidiabetic Effects of Polysaccharides from *Pachyrrhizus Erosus*. *Int. J. Biol. Macromol.* (114): 97–105.
- Maftukhah, S. 2020. Aplikasi *Bacillus sp* Pada Produksi Enzim Menggunakan Metode Fermentasi Padat – Review. *Jurnal Pendidikan dan Aplikasi Industri*. 7(1): 6-9.
- Malini, D.M., Abadi, S.A., Madihah, dan Hermawan, W. 2019. The Effect of Ethanol Extract of Fruit Peel Jengkol (*Archidendron pauciflorum*) To Spleen Histological Structure Of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats (*Rattus norvegicus*). *Nusant. Biosci.* 11(2): 157-161.

- Marianne, Yuandani, dan Rosnani. 2011. Antidiabetic Activity from Ethanol Extract of Kluwih's Leaf (*Artocarpus camansi*). *Jurnal Natural*. 11(2): 64-68.
- Marliana, S.D. dan Saleh, C. 2011. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Etanol, Fraksi nHeksana, Etil asetat, dan Metanol dari Buah Labu Air (*Lagenari Siceraria* (Morliana). *J. Kimia Mulawarman*. 8(2): 39-63.
- Martati, E., Utami, T., dan Hastuti, P. 1999. Profil Gliserida, dan Kandungan EPA (Eicosapentaenoat) dan DHA (Docosaheksaenoat) Hasil Hidrolisis Minyak Hati Ikan Cod oleh Lipase Teramobil Dari *Mucor miehei*. *Agritech*. 19(1): 1-5.
- Mas'ud, F. dan Pabbenteng, P. 2016. Rasio Bekatul Padi dengan Pelarut pada Ekstraksi Minyak Bekatul Padi. *INTEK J*. 3(2): 82-86.
- Mas'ud, F., Sjafruddin, R., dan Puspitasari. 2019. Teknologi Produksi *Virgin Coconut Oil* Secara Kimiawi Menggunakan Pelarut Etanol. *Prosiding Seminar Nasional Inovasi Teknologi Hasil Perkebunan*. 2-9.
- Matheos, C., Lintong, P., dan Kairupan, C. 2013. Gambaran Histologik Jaringan Limpa Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Yang Diinfeksi *Eschericia coli* Dan Diberi Madu. *Jurnal e-Biomedik*. 1(2): 961-965.
- Melgar, G.Z., Assis, F.V.S., dan Rocha, L.C. 2013. Growth Curves of Filamentous Fungi for Utilization in Biocatalytic Reduction of Cyclohexanones. *Global Journal of Science Frontier Research*. 13(5): 13-19.
- Moko, E.M., Purnomo, H., Kusnadi, J., dan Ijong, F.G. 2014. Phytochemical Content and Antioxidant Properties Of Colored and Non Colored Varieties Of Rice Bran From Minahasa, North Sulawesi, Indonesia. *International Food Research Journal*. 21(3): 1017-1023
- Moongngarm, A., Daomukda, N., dan Khumpika, S. 2012. Chemical Compositions, Phytochemicals, and Antioxidant Capacity of Rice Bran, Rice Bran Layer, and Rice Germ. *APCBEE Procedia*. (2): 73-79.
- Nafisah, M., Tukiran, Suyatno, dan Hidayati, N. 2014. Uji Skrining Fitokimia Pada Ekstrak Heksan, Kloroform, dan Metanol Dari Tanaman Patikan Kebo (*Euphorbiae hirtae*). *Prosiding Seminar Nasional Kimia*. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya.
- Nugroho, A.E., 2006. Hewan Percobaan Diabetes Mellitus : Patologi Dan Mekanisme Aksi Diabetogenik. *Jurnal Biodiversitas*. 7(4): 378-382.
- Nugroho, R.B., Binugraheni, R., dan Rukmana, R.M., 2017. Pengaruh Ekstrak Etanolik Bekatul Beras Hitam (*Oryza sativa* L. Cv Woja Laka) terhadap Berat Badan Tikus Putih (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) Diabetik. *Jurnal Biomedika*. 10(1): 48-51.

- Oliveira, M.D.S., Feddern, V., Kupski, L., Cipolatti, E.P., Furlong, E.B., dan Soares, L.A.S. 2011. Changes In Lipid, Fatty Acids And Phospholipids Composition Of Whole Rice Bran After Solid-State Fungal Fermentation. *Bioresour. Technol.* 102: 8335–8338.
- Oliveira, M. dos S., Cipolatti, E.P., Furlong, E.B., dan Soares, L. de S., 2012. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Fermented Rice (*Oryza sativa*) Bran. *Food Sci. Technol. Camp.* 32(3): 531–537.
- Palupi, F.D., Wasita, B., dan Nuhriawangsa, A.M.P. 2019. Pengaruh Dosis dan Lama Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Kadar Gula Darah Dan Derajat Insulitis Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2. *MGMI.* 10(2): 111-124.
- Pendit, P.A.C.D, Zubaidah, E., dan Sriherfyna, F.H. 2016. Karakteristik Fisik-Kimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). *J. Pangan dan Agroindustri.* 4(1): 400-409.
- Pitriya, I.A., Rahman, N., dan Sabang, S.M. 2017. Efek Ekstrak Buah Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Penurunan Kadar Gula Darah Mencit (*Mus musculus*). *J. Akad. Kim.* 6(1): 35-42.
- Poedjiadi, A. 2012. *Dasar-Dasar Biokimia.* Jakarta: UI Press.
- Posuwan, J., Prangthip, P., Leardkamolkarn, V., Yamborisut, U., Surasiang, R., Charoensiri, R., dan Kongkachuichai, R. 2013. Long-Term Supplementation Of High Pigmented Rice Bran Oil (*Oryza sativa* L.) on Amelioration of Oxidative Stress and Histological Changes in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Fed a High Fat Diet; Riceberry Bran Oil. *Food Chem.* (138): 501–508.
- Purwanto, A., Fajriyati, A.N., dan Wahyuningtyas, D. 2014. Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Rendemen dan Aktivitas Antioksidan Dalam Ekstrak Minyak Bekatul Padi (*Rice Bran Oil*). *EKUILIBIUM.* 13(1): 29-34.
- Putri, E.P.K., Hamzah, B., dan Rahman, N. 2013. Analisis Kualitatif Zat Bioaktif Pada Ekstrak Daun Alpukat (*Persea americana* Mill) dan Uji Praktis Dalam Menurunkan Kadar Glukosa Darah Pada Mencit (*Mus musculus*). *J. Akad. Kim.* 2(3): 119-127.
- Rachmania, R.A., dan Cristina, F.A.D. 2016. Analisis Penambatan Molekul Senyawa Flavonoid Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) Pada Reseptor α -Glukosidase Sebagai Antidiabetes. *PHARMACY.* 13(2): 239-251.
- Radji, M. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi: Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran.* Jakarta: EGC.
- Rakhmadi, I., Muladno, Siregar, H.C.H., dan Siagian, P.H. 2009. Performa Mencit Jantan (*Mus musculus*) Umur 28-63 Hari Pada Alas Kendang Sekam, Pasir, Dan Zeolite Dengan dan Tanpa Sekat Alas. *Jurnal Zeolit Indonesia.* 8(2): 53-64.

- Razak, D.L.A., Rashid, N.Y.A., Jamaluddin, A., Sharifudin, S.A., Kahar, A.A., dan Long, K. 2017. Cosmeceutical Potentials and Bioactive Compounds Of Rice Bran Fermented With Single and Mix Culture Of *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae*. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 16: 127–134
- Retnaningsih, C., Widianarko, B., dan Muis, S.F. 2013. Peningkatan Aktivitas Antioksidan Superoksida Dismutase Pada Tikus Hiperglikemi Dengan Asupan Tempe Koro Benguk (*Mucuna pruriens* L.). *AGRITECH.* 33(2): 154-161.
- Rias, Y.A. dan Sutikno, E. 2017. Hubungan antara berat badan dengan kadar gula darah acak pada tikus diabetes mellitus. *Jurnal Wiyata.* 4(1): 72-77.
- Rohilla, A. dan Ali, S. 2012. Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Science.* 3(2): 819-823.
- Saropah, D.A., Jannah, A., dan Maunatin, A. 2013. Kinetika Reaksi Enzimatis Ekstrak Kasar Enzim Selulase Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi Dari Bekatul. *ALCHEMY.* 2(1): 34-45.
- Schmidt, C.G., Gonçalves, L.M., Prietto, L., Hackbart, H.S., dan Furlong, E.B. 2014. Antioxidant Activity And Enzyme Inhibition Of Phenolic Acids From Fermented Rice Bran With Fungus *Rizhopus oryzae*. *Food Chem.* 146: 371–377.
- Sembiring, B.B dan Suhirman, S. 2014. Pengaruh Cara Pengeringan dan Teknik Ekstraksi Terhadap Kualitas Simplisia dan Ekstrak Meniran. Prosiding Seminar Nasional Pengembangan Teknologi Pertanian Politeknik Negeri Lampung. ISBN 978-602-70530-0-7: 509-513.
- Setadi. 2007. *Anatomi dan Fisiologi Manusia*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Setiasih, N.L.E., Suwiti, N.K., Suastika, P., Piraksa, I.W., dan Susari, N.N.W. 2011. Studi Histologi Limpa Sapi Bali. *Buletin Veteriner Udayana.* 3(1): 9-15.
- Setiawan, B., dan Suhartono, E. 2005. Stres Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Melitus. *Majalah Kedokteran Indonesia.* 55(2): 86-91.
- Setyowati, W.A.E., Ariani, S.R.D., Rahmawati, C.P., Ashadi, dan Mulyani, B. 2014. Skrining Fitokimia dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Metanol Kulit Durian (*Durio zibethinus* Murr.) Varietas Petruk. *Semnas Kimia dan Pendidikan Kimia VI.* ISBN: 979363174-0.
- Shihab, M.Q. 2002. *Tafsir Al Misbah: pesan, kesan dan keserasian Al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati.
- Sholeha, M. 2019. Potensi Ekstrak Bekatul (*Rice bran*) Terhadap Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) Mencit (*Mus musculus*) Diabetes. *Skripsi.* Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang.

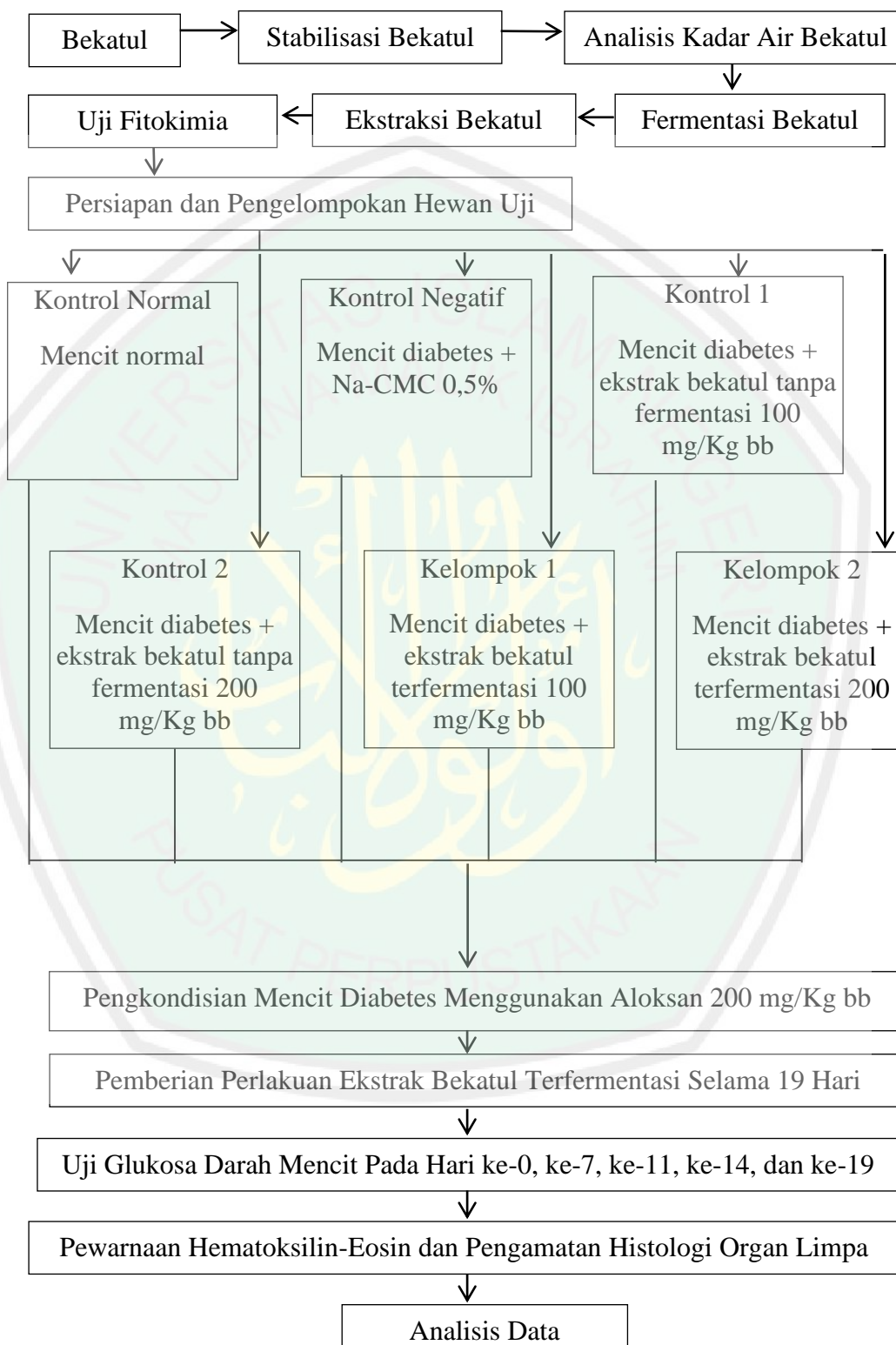
- Siadi, K. 2012. Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) Sebagai Biopestisida yang Efektif dengan Penambahan Larutan NaCl. *Jurnal MIPA*. 35(1): 77-83.
- Siddiqui, S., Khan, M.R., dan Siddiqui, W.A. 2010. Comparative hypoglycemic and nephroprotective effects of tocotrienol rich fraction (TRF) from palm oil and rice bran oil against hyperglycemia induced nephropathy in type 1 diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*. 188: 651-658.
- Sierra, S., Villoslada, F.L., Olivares, M., Jimenez, J., Boza, J., dan Xaus, J. 2005. Increased Immune Response in Mice Consuming Rice Bran Oil. *Eur. J. Nutr.* 44: 509-516.
- Sinata, N. dan Arifin, H. 2016. Antidiabetes dari Fraksi Air Daun Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk.) Terhadap Kadar Glukosa Darah Mencit Diabetes. *J. Sains Farm. Klin.* 3(1): 72-78.
- Soemardji, A.A. 2004. Penentuan Kadar Gula Darah Mencit Secara Cepat : Untuk Diterapkan dalam Penapisan Aktivitas Antidiabetes In vivo. *Acta Pharmaceutica Indonesia*. 29(3): 155-156.
- Sofia, L. 2006. *Isolasi dan Uji Bioaktifitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metoda Uji Brine Shrimp*. Medan : Universitas Sumatra Utara Press.
- Suena, N.M.D.S. 2015. Evaluasi Fisik Sediaan Suspensi Dengan Kombinasi Suspending Agent PGA (*Pulvis gummi arabici*) dan CMC-Na (Carboxymethylcellulosum Natrium). *J. Ilm. Medicam.* 1(1): 33-38.
- Sumardjo, D. 2009. *Pengantar Kimia*. Jakarta: EGC.
- Sundhani, E., Syarifah, D.C.N., Zumrohani, L.R., dan Nurlita, N.A. 2016. Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Adam Hawa (*Rhoeo discolor*) dan Daun Pucuk Merah (*Syzygium campanulatum* Korth.) Dalam Menurunkan Kadar Gula Darah Pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar Dengan Pembebanan Glukosa. *Pharmacy*. 13(2): 137-149.
- Suprihatin. 2010. *Teknologi Fermentasi*. Surabaya: UNESA Press.
- Susilawati, E., Adnyana, I.K., dan Kusuma, E.D. 2017. Aktivitas Antidiabetes Dari Ekstrak Etanol Biji Hanjeli. *Jurnal Farmasi Genetika*, 2(2): 77-82.
- Suswanto, I., Simamora, C.J.K., dan Anggorowati, D. 2018. Penggunaan Cendawan Endofit Sebagai Agens Pengendali Hayati Pada Lada (*Piper nigrum* L.). *Jurnal Agroqua*. 16(2): 143-156.
- Swarayana, I.M.I., Sudira, I.W., dan Berata, I.K. 2012. Perubahan Histopatologi Hati Mencit (*Mus musculus*) yang Diberikan Ekstrak Daun Ashitaba (*Angelica keiskei*). *Buletin Veteriner Udayana*. 4(2): 119-125.
- Szkudelski, T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res.* (50): 536-546.

- Tandi, J., Wulandari, A., dan Asrifa, A. 2017. Efek Ekstrak Etanol Daun Gendola Merah (*Basella alba* L.) terhadap Kadar Kreatinin, Ureum dan Deskripsi Histologis Tubulus Ginjal Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Diabetes yang Diinduksi Streptozotocin. *Jurnal Farmasi Galenika*. 3(2): 93–102.
- Tolistiawaty, I., Widjaja, J., dan Sumolang, P.P.F. 2014. Gambaran Kesehatan pada Mencit (*Mus musculus*) di Instalasi Hewan Coba. *Jurnal Vektor Penyakit*. 8(1): 27-32.
- Tuarita, M.Z., Sadek, N.F., Yuliana, N.D., Sukamo, dan Budjianto, S. 2017. Pengembangan Bekatul sebagai Pangan Fungsional: Peluang, Hambatan, dan Tantangan. *Artikel*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Turner, P.V., Brabb, T., Pekow, C., dan Vasbinder, M.A., 2011. Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 50 (5): 614-627.
- Ulyah, K. 2019. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 96% Bekatul (*Rice Bran*) dan Pengaruh Terapinya Terhadap Gambaran Histologi Pankreas Mencit (*Mus musculus*) Diabetes Mellitus. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang.
- Umami, S.R. 2016. Uji Penurunan Kolesterol Pada Mencit (*Mus musculus*) Secara In-Vivo Menggunakan Ekstrak Metanol Umbi Talas Sebagai Upaya Pencegahan Cardiovascular Disease. *Jurnal Pijar MIPA*. 11(2).
- Wahyuni, A.S., dan Munawaroh, R., 2015. Potensi Ekstrak Etanol Beras Hitam Sebagai Penurun Gula Darah Pada Tikus Nefropati Diabetes. *The 2nd University Research Coloquium 2015*. ISSN: 2407-9189
- Wahyuningrum, M.R. dan Probosari, E. 2012. Pengaruh Pemberian Buah Pepaya (*Carica papaya* L.) Terhadap Kadar Trigliserida Pada Tikus *Sprague Dawley* Dengan Hiperkolesterolemia. *Journal of Nutrition College*. 1(1): 192-198.
- Warif, N.A.A., Ayob, A.A., Razali, W.M.W., Budin, S.B., Zainalabidin, S., dan Mohamed, J. 2014. Kesan ekstrak akueus *Hibiscus sabdariffa* Linn. Terhadap Tekanan Oksidatif dan Populasi Limfosit T dalam Limpa Tikus Diabetes Aruhan Streptozotosin. *Jurnal Sains Kesehatan Malaysia*. 12(1): 15-21.
- Wianingsih, Prihastanti, E., dan Parman, S. 2013. Pengaruh Metode Pengeringan Terhadap Kualitas Simplisia Lempuyang Wangi (*Zingiber aromaticum* L.). *Buletin Anatomi dan Fisiologi*. 21(1): 19-25.
- Widarta, I.W.R., Nocianitri, K.A., dan Sari, L.P.I.P. 2013. Ekstraksi Komponen Bioaktif Bekatul Beras Lokal dengan Beberapa Jenis Pelarut. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 2(2): 73-79.
- Widowati, W. 2008 . Potensi Antioksidan sebagai Antidiabetes. *JKM*. 7(3): 1-11.

- Yosi, F., Sahara, E., dan Sandi, S. 2014. Analisis Sifat Fisik Bekatul dan Ekstrak Minyak Bekatul Hasil Fermentasi *Rhizopus* sp. dengan Menggunakan Inokulum Tempe. *J. Peternak. Sriwij.* 3(1): 7-13.
- Yuda, A.A.G.P., Rusli, R., dan Ibrahim, A. 2015. Kandungan Metabolit Sekunder dan Efek Penurunan Glukosa Darah Ekstrak Biji Rambutan (*Nephelium lappaceum* L) Pada Mencit (*Mus musculus*). *J. Sains Dan Kesehat.* 1(3): 120-125.
- Yuliani, S., 2011. Efek Likopen Terhadap Gambaran Mikroskopik Limpa Tikus Betina Sprague Dawley. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian.* 1(1): 9-15.
- Zhou, J., Zhou, S., Tang, J., Zhang, K., Guang, L., Huang, Y., Xu, Y., Ying, Y., Zhang, L., dan Li, D. 2009. Protective Effect Of Berberine On Beta Cells In Streptozotocin- And High-Carbohydrate/High-Fat Diet-Induced Diabetic Rats. *Eur. J. Pharmacol.* 606: 262-268.
- Zubaidah, E., dan Aldina, N., 2010. Studi Aktivitas Antioksidan Bekatul Dan Susu Skim Terfermentasi Bakteri Asam Laktat Probiotik (*Lactobacillus plantarum* J2 dan *Lactobacillus casei*). *Jurnal Teknologi Pertanian.* 11(1): 11-7.
- Zubaidah, E., Saprianti, E., dan Hindrawan, J. 2012. Studi Aktivitas Antioksidan Pada Bekatul Dan Susu Skim Terfermentasi Probiotik (*Lactobacillus plantarum* B2 dan *Lactobacillus acidophillus*). *Jurnal Teknologi Pertanian.* 13(2): 111-118.

LAMPIRAN

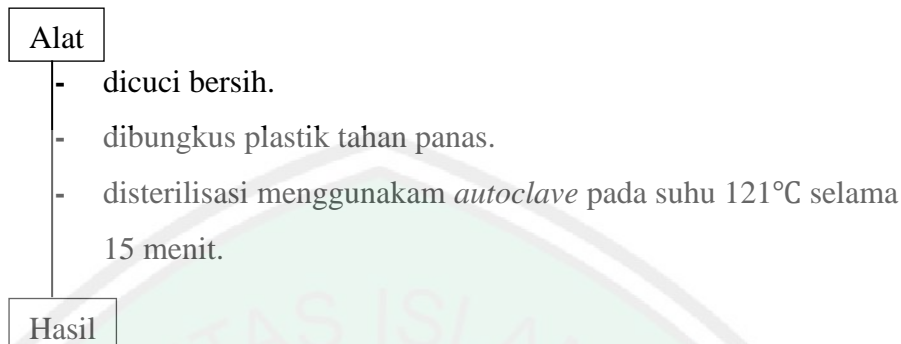
Lampiran 1. Rancangan Penelitian



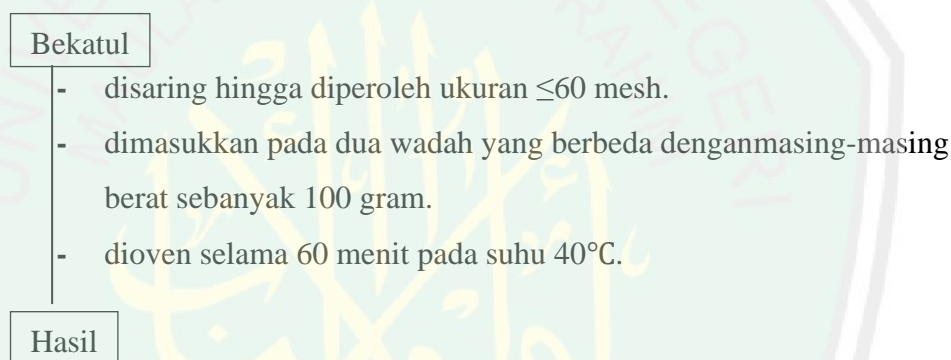
Lampiran 2. Diagram Alir

L.2.1 Preparasi Alat dan Bekatul

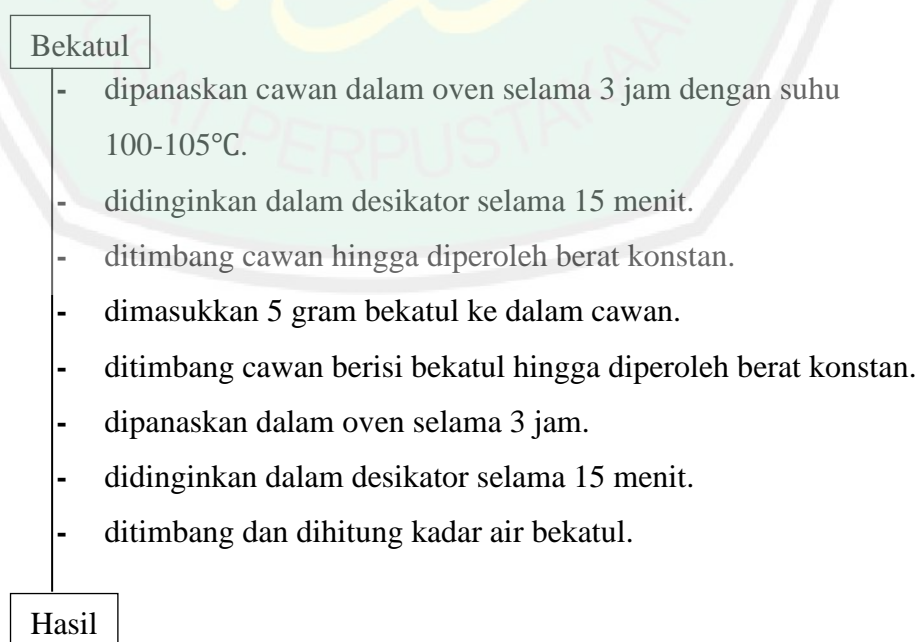
a. Sterilisasi Alat



b. Stabilisasi Bekatul



L.2.2 Analisis Kadar Air



L.2.3 Fermentasi Bekatul

a. Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

PDA

- ditimbang media PDA bubuk sebanyak 3,9 gram.
- dilarutkan pada 100 mL akuades.
- dipanaskan media PDA sambil diaduk sampai mendidih.
- dituang larutan media PDA sebanyak 5 mL tiap tabung reaksi.
- ditutup mulut tabung menggunakan kapas dan *plastic wrap*.
- disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit.
- didinginkan dalam keadaan miring hingga media memadat.

Hasil

b. Regenerasi Jamur *Rhizopus oryzae*

Jamur *Rhizopus oryzae*

- digoreskan 1 ose isolat jamur *Rhizopus oryzae* pada media miring PDA.
- didiamkan pada suhu kamar hingga bersporulasi penuh selama 72 jam.

Hasil

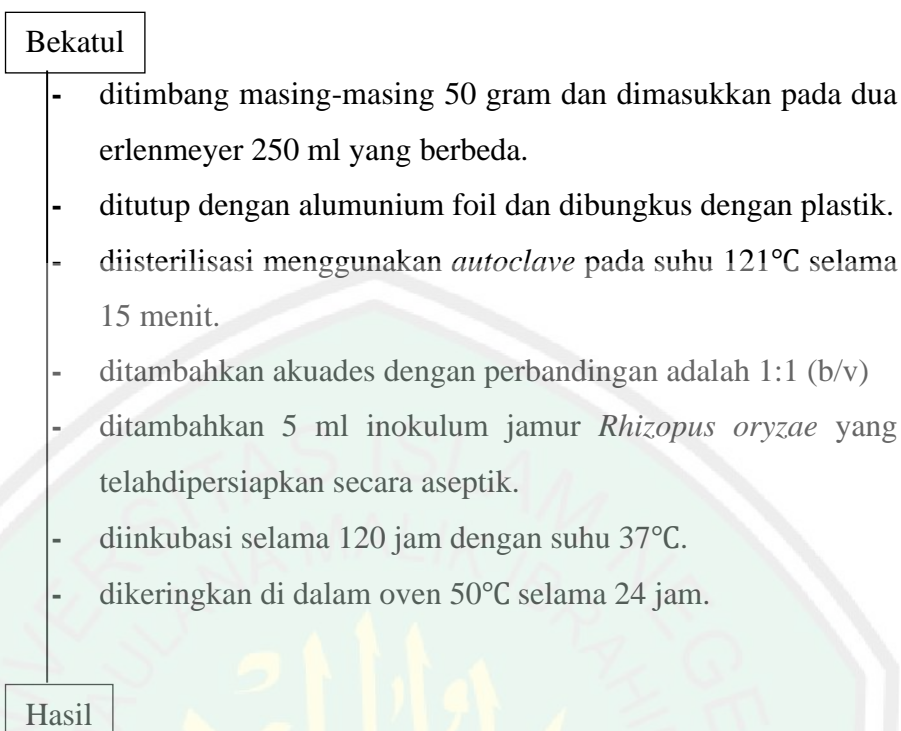
c. Pembuatan Inokulum Jamur

Jamur *Rhizopus oryzae*

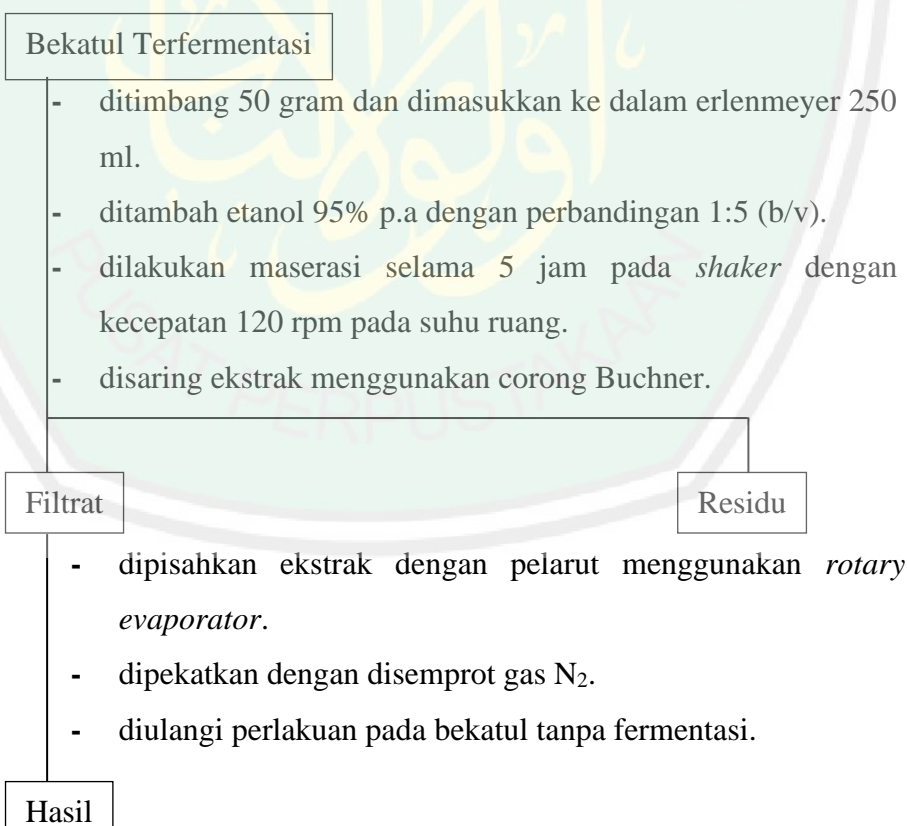
- dituangkan sedikit demi sedikit Akuades steril sebanyak 50 ml pada cawan petri yang berisi jamur *Rhizopus oryzae* yang sudah diregenerasi.
- dikerok jamur hingga miselia jamur terlepas dari media.
- disaring menggunakan kain kasa sehingga diperoleh akuades keruh yang suspensi miselia jamur.

Hasil

d. Fermentasi Bekatul Menggunakan *Rhizopus oryzae*

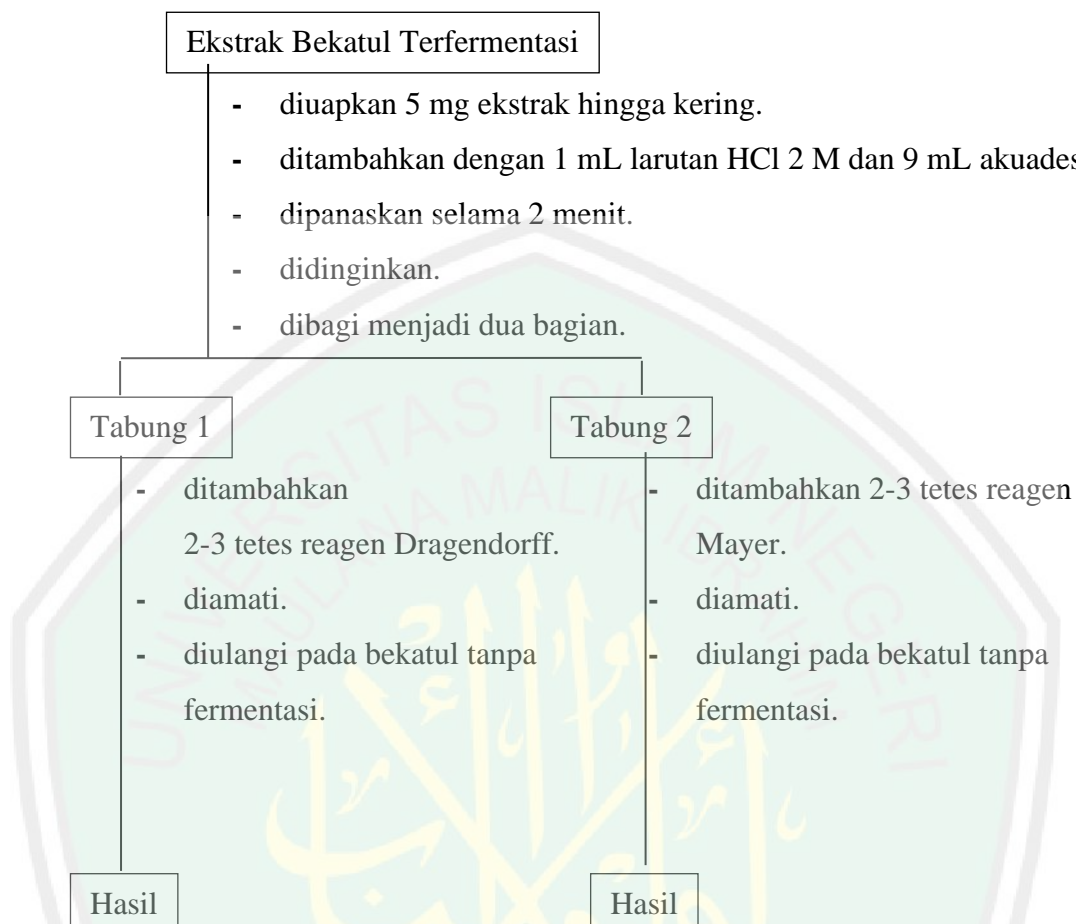


L.2.4 Ekstraksi Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi

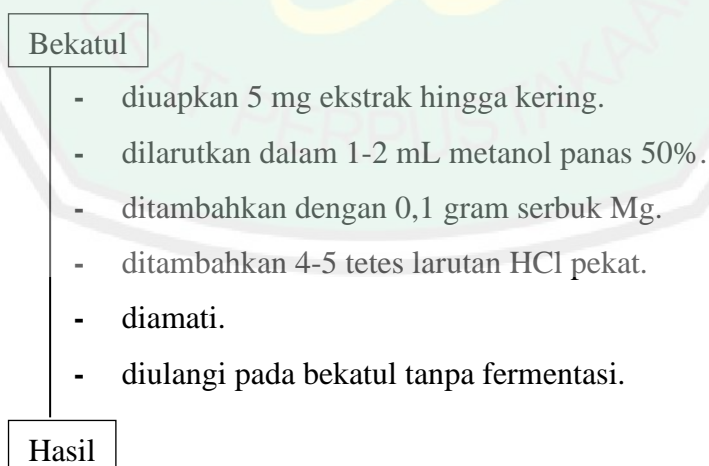


L.2.5 Uji Fitokimia

a. Uji Alkaloid



b. Uji Flavonoid



c. Uji Fenolik

Bekatul

- diuapkan 5 mg ekstrak hingga kering.
- dilarutkan dalam 1-2 mL akuades.
- ditambahkan 10 tetes larutan FeCl_3 1%..
- diamati.
- diulangi pada bekatul tanpa fermentasi.

Hasil

d. Uji Saponin

Bekatul

- diuapkan 5 mg ekstrak hingga kering.
- dilarutkan dalam 5 mL akuades.
- dikocok selama 5 menit.
- didiamkan selama 30 menit
- diamati.
- diulangi pada bekatul tanpa fermentasi.

Hasil

e. Uji Triterpenoid dan Steroid

Bekatul

- diuapkan 5 mg ekstrak hingga kering.
- dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform.
- ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat.
- ditetesi dengan 1-2 mL larutan H_2SO_4 pekat.
- diamati.
- diulangi pada bekatul tanpa fermentasi.

Hasil

L.2.6 Persiapan Mencit

18 Mencit

- diberikan pakan standard dan akuades selama satu minggu.
- dibagi menjadi 6 kelompok dengan ketentuan:
 - a. Kontrol normal tanpa induksi aloksan.
 - b. Kontrol (-) diinduksi aloksan dan diberikan akuades.
 - c. Kontrol 1 diinduksi aloksan dan diberikan ekstrak bekatul tanpa fermentasi dosis 100 mg/Kg bb.
 - d. Kontrol 2 diinduksi aloksan dan diberikan ekstrak bekatul tanpa fermentasi dosis 200 mg/Kg bb.
 - e. Kelompok 1 diinduksi aloksan dan diberikan ekstrak bekatul terfermentasi dosis 100 mg/Kg bb.
 - f. Kelompok 2 diinduksi aloksan dan diberikan ekstrak bekatul terfermentasi dosis 200 mg/Kg bb.

Hasil

L.2.7 Pengkondisian Mencit Diabetes

Mencit

- dihadapkan mencit kearah frontal hingga bagian abdomen mencit terlihat.
- disemprot dengan alkohol 70%.
- dicubit kulit hingga terasa bagian otot mencit.
- dimasukkan spuit dalam abdomen.
- diinduksikan larutan aloksan dengan dosis 200 mg/Kg bb sebanyak 0,2 mL/20 gram mencit secara perlahan.
- dilepas spuit.
- disemprot kembali bagian abdomen mencit menggunakan alkohol 70%.
- diamati selama 7 hari hingga terjadi peningkatan kadar glukosa darah mencit mencapai ≥ 200 mg/dL.
- Dilakukan induksi berikutnya apabila peningkatan kadar glukosa darah belum mencapai ≥ 200 mg/dL.

Hasil

L.2.8 Perlakuan dengan Ekstrak Bekatul Terfermentasi

Hewan Uji Mencit

- diberikan perlakuan sesuai masing-masing kelompok.
- diberikan sebanyak 0,2 mL/20 gram mencit secara oral melalui sonde lambung.
- dilakukan selama 19 hari setiap pagi.

Hasil

L.2.9 Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Hewan Uji Mencit

- dikalibrasi. *test strip* untuk uji kadar gula darah diselipkan pada tempat khusus.
- diambil darah mencit dengan bantuan *disposable syringe* yang ditusukkan pada aliran darah vena ekor mencit.
- dimasukkan darah pada celah sensor di ujung strip.

Hasil

L.2.10 Pewarnaan Hematoksilin-Eosin.

a. Pembuatan Preparat

Hewan Uji Mencit

- didiskolasi mencit dibagian leher.
- diletakkan mencit pada papan fiksasi dan dihadapkan posisi ventral.
- dibedah mencit menggunakan skalpel dan alat bedah.
- diambil organ limpa masing-masing 1 irisan limpa.
- difiksasi menggunakan formalin selama 24 jam.
- didehidrasi dengan cara dimasukkan dalam alkohol bertingkat (alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, dan alkohol 96%), toluen 1 dan toluen 2 masing-masing selama 2 jam..
- dimasukkan ke dalam parafin cair dengan suhu 56°C selama 2 jam dan dilakukan sebanyak 2 kali.
- diambil organ limpa dan diblok menggunakan blok parafin.
- dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-5 μm .
- direhidrasi dengan dimasukkan dalam air kemudian diletakkan dalam gelas objek.
- dikeringkan preparat organ limpa.

Hasil

b. Pewarnaan Preparat**Preparat Organ Limpa**

- direndam dalam xilol 1, xilol 2, xilol 3 masing-masing selama 5 menit.
- direndam dalam alkohol absolut 1 dan alkohol absolut 2 masing-masing selama 5 menit.
- dimasukkan dalam akuades dan direndam dalam Harris Hemaktosilin selama 15 menit.
- dibilas dengan akuades.
- dicelupkan dalam alkohol 1% sebanyak 7-10 celupan.
- direndam akuades selama 15 menit.
- direndam dalam eosin selama 2 menit.
- direndam dalam alkohol 96% 1 dan alkohol 96% 2 masing-masing selama 3 menit.
- direndam alkohol absolut 1 dan alkohol absolut 2 masing-masing selama 3 menit.
- dimasukkan dalam xilol 4 dan xilol 5 masing-masing selama 5 menit.
- dikeringkan.
- diamati dibawah mikroskop untuk dilakukan pengamatan histologi.

Hasil

Lampiran 3. Pembuatan dan Perhitungan Larutan

L.3.1 Pembuatan Larutan NaCl 0,9%

Padatan NaCl ditimbang sebanyak 0,9 gram dalam gelas arloji kemudian dimasukkan dalam beaker glass. Akuades sebanyak ± 10 ml dialirkan pada gelas arloji. Padatan NaCl diaduk hingga larut kemudian ditanda bataskan pada labu takar 100 ml dan dihomogenkan.

L.3.2 Pembuatan Larutan Aloksan

Dosis aloksan yang digunakan adalah 200 mg/Kg bb. Dosis pada setiap mencit dengan berat rata-rata 20 gram adalah :

$$\begin{aligned} \text{Dosis permencit} &= 200 \text{ mg} \times \frac{20 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \\ &= 4 \text{ mg}/20 \text{ g bb} \end{aligned}$$

Jumlah aloksan yang dibutuhkan adalah :

$$\begin{aligned} \text{Total g Aloksan} &= \text{dosis} \times \text{jumlah mencit} \times 1 \text{ kali induksi} \\ &= 4 \text{ mg} \times 15 \times 1 \\ &= 60 \text{ mg} \end{aligned}$$

Volume induksi permencit adalah 0,2 mL/20 g mencit sehingga volume total adalah Pembuatan larutan aloksan dilakukan dengan aloksan padatan ditimbang sebanyak 50 mg dan dimasukkan ke dalam gelas beaker. Padatan aloksan ditambahkan dengan 10 mL larutan fisiologis NaCl 0,9% dan diaduk hingga larut sempurna. Larutan dipindahkan pada labu takar 50 mL dan ditandabatkan menggunakan larutan fisiologis NaCl 0,9%.

L.3.3 Pembuatan Larutan Na-CMC 0,5%

Serbuk Na-CMC ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian dilarutkan sedikit demi sedikit pada 50 mL akuades hangat. Setelah larut dengan sempurna, larutan ditanda bataskan pada labu takar 100 mL dan dihomogenkan.

L.3.4 Perhitungan Dosis

Tabel L.3.1 Konversi perhitungan dosis untuk hewan dan manusia berdasarkan Lauraence dan Bacharach (1964):

Hewan dan BB rata-rata	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmut 400 g	Kelinci 1,5 Kg	Kucing 4 Kg	Kera 4Kg	Anjing 12Kg	Manusia 70 Kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	12,29	27,8	28,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,79	3,9	4,2	9,2	17,8	60,5
Marmut 400 g	0,06	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 Kg	0,04	0,25	0,44	1,0	2,25	2,4	4,5	14,2
Kucing 4 Kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4 Kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12Kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 Kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,76	0,16	0,32	1,0

Dosis ekstrak yang digunakan mengacu pada penelitian Wahyuni dan Munawaroh (2015) yakni 100, 200 mg/Kg bb. Namun, penelitian tersebut dilakukan pada hewan coba tikus sehingga perlu dilakukan konversi terlebih dahulu. Dosis ekstrak yang diberikan pada mencit adalah

- a. Dosis 100 mg/Kg

$$\text{Pada tikus 200 g} = 100 \text{ mg} \times \frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} = \frac{20 \text{ mg}}{200 \text{ g}}$$

Faktor konversi dari tikus 200 g ke mencit 20 g adalah 0,14.

Sehingga dosisnya menjadi: $20 \text{ mg} \times 0,14 = 2,8 \text{ mg}$

- b. Dosis 200 mg/Kg

$$\text{Pada tikus 200 g} = 200 \text{ mg} \times \frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} = \frac{40 \text{ mg}}{200 \text{ g}}$$

Faktor konversi dari tikus 200 g ke mencit 20 g adalah 0,14.

Sehingga dosisnya menjadi: $40 \text{ mg} \times 0,14 = 5,6 \text{ mg}$

L.3.5 Pembuatan Ekstrak Bekatul Tanpa Fermentasi

- a. Dosis kontrol 1

Dosis ekstrak bekatul tanpa fermentasi yang digunakan adalah 100 mg/Kg. Volume pemberian permencit 0,2 mL/20 g bb mencit sehingga konsentrasi ekstrak bekatul tanpa fermentasi yang dibuat adalah 2,8 mg/0,2 mL ~ 14 mg/mL. Massa ekstrak bekatul tanpa fermentasi yang dibutuhkan adalah :

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi ekstrak} &= \frac{\text{mg ekstrak}}{\text{mL pelarut}} \\ \text{mg ekstrak} &= \text{konsentrasi ekstrak} \times \text{mL pelarut} \\ &= 14 \text{ mg/mL} \times 10 \text{ mL} \\ &= 140 \text{ mg} \end{aligned}$$

Ekstrak bekatul tanpa fermentasi ditimbang 140 mg dan dilarutkan pada 5 mL larutan Na-CMC 0,5% hingga larut sempurna. Larutan ekstrak dipindahkan pada labu takar 10 ml kemudian ditanda bataskan menggunakan larutan Na-CMC 0,5% dan dihomogenkan.

b. Dosis kontrol 2

Dosis ekstrak bekatul tanpa fermentasi yang digunakan adalah 200 mg/Kg. Volume pemberian permencit 0,2 mL/20 g bb mencit sehingga konsentrasi ekstrak bekatul tanpa fermentasi yang dibuat adalah 5,6 mg/0,2 mL ~ 28 mg/mL. Massa ekstrak bekatul tanpa fermentasi yang dibutuhkan adalah :

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi ekstrak} &= \frac{\text{mg ekstrak}}{\text{mL pelarut}} \\ \text{mg ekstrak} &= \text{konsentrasi ekstrak} \times \text{mL pelarut} \\ &= 28 \text{ mg/mL} \times 10 \text{ mL} \\ &= 280 \text{ mg} \end{aligned}$$

Ekstrak bekatul tanpa fermentasi ditimbang 280 mg dan dilarutkan pada 5 mL larutan Na-CMC 0,5% hingga larut sempurna. Larutan ekstrak dipindahkan pada labu takar 10 ml kemudian ditanda bataskan menggunakan larutan Na-CMC 0,5% dan dihomogenkan.

L.3.6 Pembuatan Ekstrak Terfermentasi

a. Dosis kelompok 1

Dosis ekstrak bekatul terfermentasi yang digunakan adalah 100 mg/Kg. Volume pemberian permencit 0,2 mL/20 g bb mencit sehingga konsentrasi ekstrak

bekatul terfermentasi yang dibuat adalah 2,8 mg/0,2 mL ~ 14 mg/mL. Massa ekstrak bekatul terfermentasi yang dibutuhkan adalah :

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi ekstrak} &= \frac{\text{mg ekstrak}}{\text{mL pelarut}} \\ \text{mg ekstrak} &= \text{konsentrasi ekstrak} \times \text{mL pelarut} \\ &= 14 \text{ mg/mL} \times 10 \text{ mL} \\ &= 140 \text{ mg} \end{aligned}$$

Ekstrak bekatul terfermentasi ditimbang 140 mg dan dilarutkan pada 5 mL larutan Na-CMC 0,5% hingga larut sempurna. Larutan ekstrak dipindahkan pada labu takar 10 ml kemudian ditanda bataskan menggunakan larutan Na-CMC 0,5% dan dihomogenkan.

b. Dosis kelompok 2

Dosis ekstrak bekatul terfermentasi yang digunakan adalah 200 mg/Kg. Volume pemberian permencit 0,2 mL/20 g bb mencit sehingga konsentrasi ekstrak bekatul terfermentasi yang dibuat adalah 5,6 mg/0,2 mL ~ 28 mg/mL. Massa ekstrak bekatul terfermentasi yang dibutuhkan adalah :

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi ekstrak} &= \frac{\text{mg ekstrak}}{\text{mL pelarut}} \\ \text{mg ekstrak} &= \text{konsentrasi ekstrak} \times \text{mL pelarut} \\ &= 28 \text{ mg/mL} \times 10 \text{ mL} \\ &= 280 \text{ mg} \end{aligned}$$

Ekstrak bekatul terfermentasi ditimbang 280 mg dan dilarutkan pada 5 mL larutan Na-CMC 0,5% hingga larut sempurna. Larutan ekstrak dipindahkan pada labu takar 10 ml kemudian ditanda bataskan menggunakan larutan Na-CMC 0,5% dan dihomogenkan.

L.3.7 Pembuatan Alkohol 70%

$$\begin{aligned} M1 \times V1 &= M2 \times V2 \\ 96\% \times V1 &= 70\% \times 100 \text{ mL} \\ V1 &= 72,9 \text{ mL} \sim 73 \text{ mL} \end{aligned}$$

Pembuatan etanol 70 % dilakukan dengan etanol 96 % diambil 73 mL dan dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL. Labu takar ditandabataskan dengan akuades dan dihomogenkan.

L.3.8 Pembuatan Alkohol 80%

$$\begin{aligned}M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\96\% \times V_1 &= 80\% \times 100 \text{ mL} \\V_1 &= 83 \text{ mL}\end{aligned}$$

Pembuatan etanol 80 % dilakukan dengan etanol 96 % diambil 83 mL dan dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL. Labu takar ditandabatkan dengan akuades dan dihomogenkan.

L.3.9 Pembuatan Alkohol 90 %

$$\begin{aligned}M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\96\% \times V_1 &= 90\% \times 100 \text{ mL} \\V_1 &= 93,7 \text{ mL} \sim 94 \text{ mL}\end{aligned}$$

Pembuatan etanol 90 % dilakukan dengan etanol 96 % diambil 94 mL dan dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL. Labu takar ditandabatkan dengan akuades dan dihomogenkan.

Lampiran 4. Perhitungan Uji Kadar Air dan Rendemen Ekstrak

L.4.1 Perhitungan Kadar Air

Berikut rumus perhitungan kadar air, yaitu:

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

Keterangan : a = berat konstan cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum di oven

c = berat konstan + sampel setelah dikeringkan

Data Pengukuran Kadar Air Sampel Bekatul

Ulangan 1

Sampel	Cawan	Cawan+ sampel	Cawan + sampel kering
Bekatul bahan baku	65,9500	66,9504	66,8824
Bekatul distabilisasi	44,0794	45,0799	45,0142
Bekatul terfermentasi	54,2791	55,2793	55,2263

Ulangan 2

Sampel	Cawan	Cawan+ sampel	Cawan + sampel kering
Bekatul bahan baku	58,5463	59,5456	59,4720
Bekatul distabilisasi	54,2589	55,2590	55,1929
Bekatul terfermentasi	65,9694	66,9697	66,9174

Ulangan 3

Sampel	Cawan	Cawan+ sampel	Cawan + sampel kering
Bekatul bahan baku	62,4194	63,4192	63,3496
Bekatul	42,6341	43,6343	43,5725

distabilisasi			
Bekatul	62,441	63,441	63,3983
terfermentasi			

Persentase Kadar Air

Sampel	U1	U2	U3
Bekatul bahan baku	6,7973%	7,4393%	6,9614%
Bekatul distabilisasi	6,5667%	6,5569%	6,1788%
Bekatul terfermentasi	5,2989%	5,2284%	4,2700%

a. Perhitungan kadar air bekatul bahan baku

Ulangan ke 1

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \\ &= \frac{(66,9504-66,8824)}{(66,9504-65,9500)} \times 100 \% = 6,7973\% \end{aligned}$$

Ulangan ke 2

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \\ &= \frac{(59,5464-59,4720)}{(59,5464-58,5463)} \times 100 \% = 7,4393\% \end{aligned}$$

Ulangan ke 3

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \\ &= \frac{(66,9504-66,8824)}{(66,9504-65,9500)} \times 100 \% = 6,7973\% \end{aligned}$$

b. Perhitungan kadar air bekatul distabilisasi

Ulangan ke 1

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

$$= \frac{(45,0799-45,0142)}{(45,0799-44,0794)} \times 100 \% = 6,5667\%$$

Ulangan ke 2

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

$$= \frac{(55,2590-55,1929)}{(55,2590-54,2589)} \times 100 \% = 6,5569\%$$

Ulangan ke 3

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

$$= \frac{(43,6343-43,5725)}{(43,6343-42,6341)} \times 100 \% = 6,1788\%$$

c. Perhitungan kadar air bekatul terfermentasi

Ulangan ke 1

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

$$= \frac{(55,2793-55,2263)}{(55,2793-54,2791)} \times 100 \% = 5,2989\%$$

Ulangan ke 2

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

$$= \frac{(66,9697-66,9174)}{(66,9697-65,9694)} \times 100 \% = 5,2284\%$$

Ulangan ke 3

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

$$= \frac{(63,4410-63,3983)}{(63,4410-62,441)} \times 100 \% = 4,2700\%$$

Lampiran 5. Data Berat Badan Mencit

L.5.1 Berat Badan Selama Aklimatisasi

Kelompok	Mencit ke-	Berat Badan Mencit (gram)	
		Sebelum Aklimatisasi	Sesudah Aklimatisasi
Kontrol Normal (KN)	1	17,30	18,10
	2	17,70	18,00
	3	15,10	15,50
	Rata-rata	16,70	17,20
Kontrol Negatif (K-)	1	19,70	22,70
	2	17,00	19,10
	3	19,40	25,00
	Rata-rata	18,70	22,27
Kontrol 1 (BNF100)	1	17,70	22,80
	2	15,70	20,10
	3	14,30	17,00
	Rata-rata	15,90	19,97
Kontrol 2 (BNF200)	1	14,70	17,30
	2	19,90	19,90
	3	15,50	18,30
	Rata-rata	16,70	18,50
Kelompok 1 (BF100)	1	18,60	20,00
	2	16,60	15,10
	3	13,00	17,20
	Rata-rata	16,07	17,43
Kelompok 2 (BF200)	1	18,60	21,30
	2	16,30	20,00
	3	15,00	19,90
	Rata-rata	16,63	20,40

L.5.2 Berat Badan Selama Terapi

Kelompok	Mencit ke-	Berat Badan Mencit (gram)						
		H0	H3	H6	H9	H12	H15	H18
Kontrol Normal (KN)	1	18,10	25,70	27,20	28,90	28,90	32,80	33,20
	2	18,00	22,40	24,90	24,90	24,80	27,40	23,70
	3	15,50	21,40	22,80	22,60	22,30	24,60	23,00
	Rata-rata	17,20	23,17	24,97	25,47	25,33	28,27	26,63
Kontrol Negatif (K-)	1	20,50	17,00	21,70	22,30	22,90	22,80	22,60
	2	20,10	16,90	16,90	16,60	20,50	22,70	24,20
	3	26,90	26,90	26,90	30,60	30,90	30,60	34,40
	Rata-rata	22,50	20,27	21,83	23,17	24,77	25,37	27,07
Kontrol 1 (BNF100)	1	28,50	27,30	30,50	29,20	30,80	31,30	27,70
	2	17,70	16,80	16,20	18,90	20,50	20,20	20,60
	3	24,20	24,20	24,40	24,20	25,00	23,80	26,30
	Rata-rata	23,47	22,77	23,70	24,10	25,43	25,10	24,87
Kontrol 2 (BNF200)	1	15,70	15,60	18,10	18,00	18,50	20,40	19,40
	2	22,40	20,80	23,60	22,90	23,10	23,40	22,70
	3	18,20	18,30	19,00	17,20	17,10	19,20	18,60
	Rata-rata	18,77	18,23	20,23	19,37	19,57	21,00	20,23
Kelompok 1 (BF100)	1	18,40	19,70	20,20	16,10	18,50	19,60	17,10
	2	16,80	17,10	17,80	15,30	16,80	17,60	18,30
	3	23,50	22,80	22,80	20,30	21,10	21,30	19,10
	Rata-rata	19,57	19,87	20,27	17,23	18,80	19,50	18,17
Kelompok 2 (BF200)	1	19,80	18,90	21,60	17,10	19,00	20,80	20,90
	2	26,00	25,00	25,00	24,60	24,60	24,30	25,10
	3	18,90	18,20	18,20	19,40	20,10	21,30	21,30
	Rata-rata	21,57	20,70	21,60	20,37	21,23	22,13	22,43

Lampiran 6. Data Kadar Glukosa Darah Mencit

L.6.1 Kadar Glukosa Darah Mencit Setelah Induksi Aloksan

Kelompok	Mencit ke-	Kadar Glukosa darah (mg/dL)			
		Aklimatisasi	Induksi Pertama	Induksi Kedua	Induksi Ketiga
Kontrol Normal (KN)	1	120	-	-	-
	2	120	-	-	-
	3	115	-	-	-
Kontrol Negatif (K-)	1	149	102	HI	-
	2	146	152	400	-
	3	153	108	113	246
Kontrol 1 (BNF100)	1	182	157	293	-
	2	73	368	324	-
	3	122	141	180	201
Kontrol 2 (BNF200)	1	128	113	470	-
	2	134	90	370	-
	3	153	151	128	402
Kelompok 1 (BF100)	1	177	95	315	-
	2	123	174	225	-
	3	127	114	181	293
Kelompok 2 (BF200)	1	157	114	459	-
	2	151	115	118	427
	3	125	114	144	588

L.6.2 Kadar Glukosa Darah Mencit Selama Terapi

Kelompok	Mencit ke-	Kadar Glukosa darah (mg/dL)					% Penurunan
		H0	H7	H11	H15	H19	
Kontrol Normal (KN)	1	120	144	72	94	119	-6,20
	2	120	178	109	91	134	
	3	115	133	100	88	124	
	Rata-rata	118	152	94	91	126	
Kontrol Negatif (K-)	1	HI	367	310	207	583	-6,02
	2	400	157	421	162	340	
	3	246	579	420	485	398	
	Rata-rata	415	368	384	285	440	
Kontrol 1 (BNF100)	1	293	378	223	281	269	11,37
	2	324	85	288	279	284	
	3	201	144	126	362	172	
	Rata-rata	273	202	212	307	242	
Kontrol 2 (BNF200)	1	470	67	256	190	270	41,87
	2	370	181	386	171	158	
	3	402	245	343	569	294	
	Rata-rata	414	164	328	310	241	
Kelompok 1 (BF100)	1	315	155	173	127	109	51,26
	2	225	135	121	179	161	
	3	293	119	219	484	136	
	Rata-rata	278	136	171	263	135	
Kelompok 2 (BF200)	1	459	337	353	239	379	15,81
	2	427	219	391	410	443	
	3	588	149	321	145	419	
	Rata-rata	491	235	355	265	414	

Lampiran 7. Jumlah Sel Limfosit

L.7.1 Data Jumlah Sel Limfosit

Kelompok	Mencit ke-	Jumlah Sel Limfosit		% Sel Nekrosis
		Normal	Nekrosis	
Kontrol Normal (KN)	1	178	9	5,15
	2	237	11	
	3	230	15	
	Rata-rata	215,00	11,67	
Kontrol Negatif (K-)	1	132	18	13,90
	2	129	18	
	3	117	25	
	Rata-rata	126,00	20,33	
Kontrol 1 (BNF100)	1	119	15	13,04
	2	154	26	
	3	127	19	
	Rata-rata	133,33	20,00	
Kontrol 2 (BNF200)	1	189	13	5,23
	2	210	9	
	3	235	13	
	Rata-rata	211,33	11,67	
Kelompok 1 (BF100)	1	145	16	10,13
	2	133	13	
	3	148	19	
	Rata-rata	142,00	16,00	
Kelompok 2 (BF200)	1	172	16	6,50
	2	153	11	
	3	164	7	
	Rata-rata	163,00	11,33	

L.7.2 Hasil Analisis Statistik Jumlah Sel Limfosit

ANOVA

Limfosit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	23110.444	5	4622.089	13.065	.000
Within Groups	4245.333	12	353.778		
Total	27355.778	17			

Berdasarkan hasil analisis statistik, maka diperoleh $\text{sig.} < 0,05$ ($\text{sig.} = 0,000$) dan Nilai $F_{\text{hitung}} (13,065) > F_{\text{table}} (3,11)$ maka disimpulkan bahwa terapi ekstrak bekatul tanpa fermentasi dan terfermentasi berpegaruh nyata terhadap jumlah sel limfosit. Untuk mengetahui perbandingan rata-rata jumlah sel limfosit maka dilakukan uji lanjutan Tukey.

Limfosit

Tukey HSD^a

kelompok	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Diabetes	3	126.00		
BNF 100	3	133.33		
BF 100	3	142.00		
BF 200	3	163.00	163.00	
BNF 200	3		211.33	211.33
Normal	3			215.00
Sig.		.227	.071	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Lampiran 8. Dokumentasi

L.8.1 Dokumentasi Penelitian

Preparasi sampel



Bekatul



Stabilisasi Bekatul

Analisis kadar air



analisis kadar air

Fermentasi bekatul



Jamur *Rhizopus oryzae*



Suspensi Miselia Jamur



Fermentasi Bekatul



Pengeringan Bekatul



Bekatul Terfermentasi

Ekstraksi bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi



Proses Ekstraksi



Filtrat



Pemisahan Pelarut



Ekstrak

Persiapan hewan uji



Aklimatisasi Mencit

Pengkondisian mencit diabetes melitus



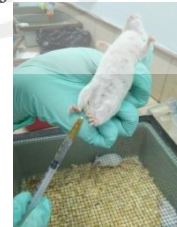
Pengambilan Sampel Darah



Uji Kadar Glukosa



Larutan Aloksan

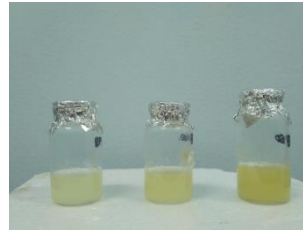


Induksi Aloksan Melalui Intraperitoneal

Perlakuan dengan ekstrak bekatul terfermentasi



Larutan Na-CMC



Suspensi Ekstrak Bekatul Tanpa Fermentasi



Suspensi Ekstrak Bekatul Terfermentasi



Terapi Ekstrak Melalui Sonde Lambung

Pembuatan preparat



Dislokasi Leher



Mencit yang telah Dibedah



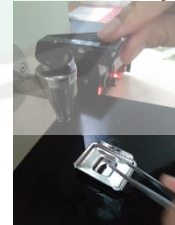
Organ Limpa



Fiksasi Limpa



Dehidrasi



Blocking



Pemotongan Blok Organ



Slide Preparat

Pewarnaan hematoksilin-eosin



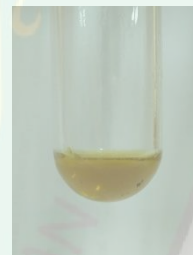
Proses Pewarnaan

L.8.2 Dokumentasi Hasil Penelitian

Uji Fitokimia



Uji Fenolik Bekatul Tanpa Fermentasi



Uji Fenolik Bekatul Terfermentasi



Uji Flavonoid Bekatul Tanpa Fermentasi



Uji Flavonoid Bekatul Terfermentasi



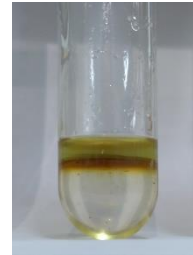
Uji Saponin Bekatul Tanpa Fermentasi



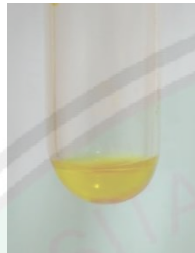
Uji Saponin Bekatul Terfermentasi



Uji Steroid dan Terpenoid Bekatul Tanpa Fermentasi



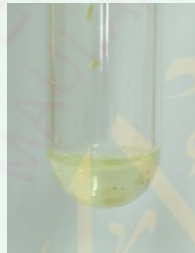
Uji Steroid dan Terpenoid Bekatul Terfermentasi



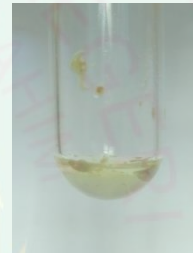
Uji Alkaloid Dragendorff Bekatul Tanpa Fermentasi



Uji Alkaloid Dragendorff Bekatul Terfermentasi

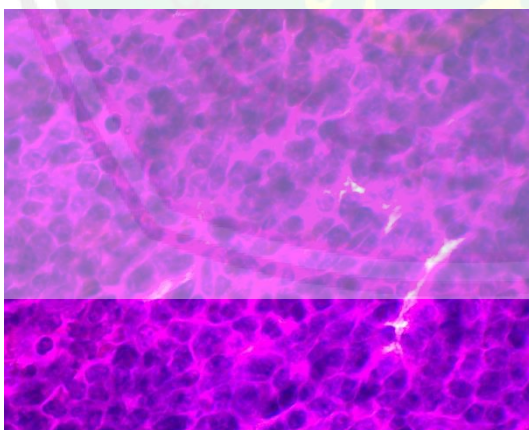


Uji Alkaloid Mayer Bekatul Tanpa Fermentasi

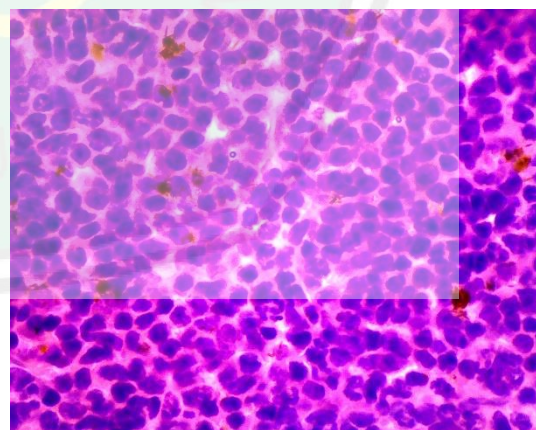


Uji Alkaloid Mayer Bekatul Terfermentasi

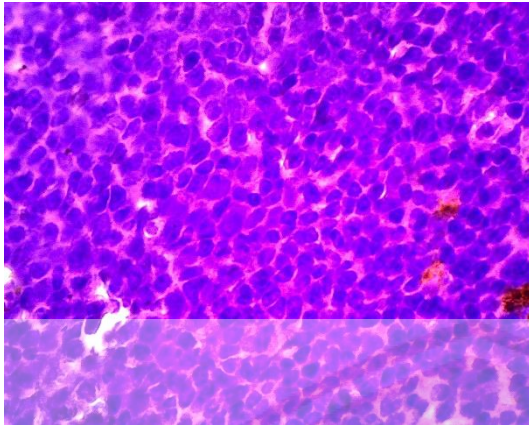
Pengamatan Histologi Limpa Mencit



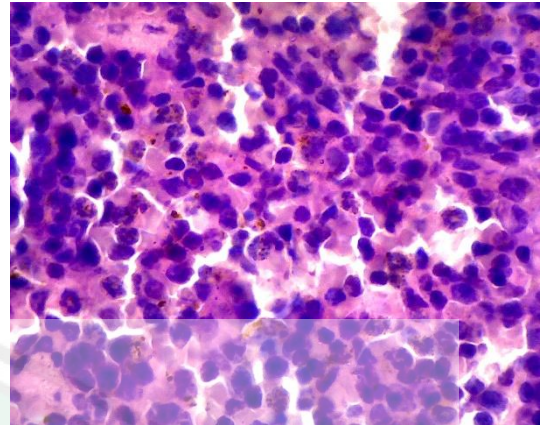
Kontrol Normal 1



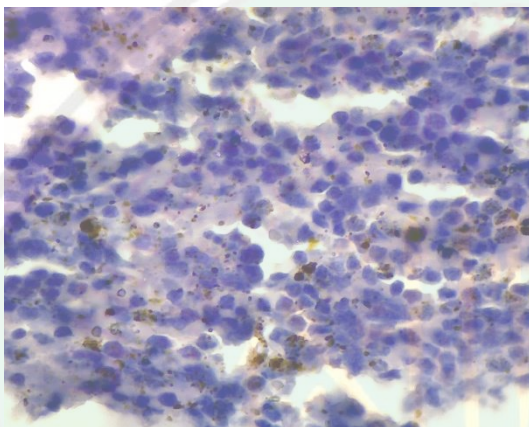
Kontrol Normal 2



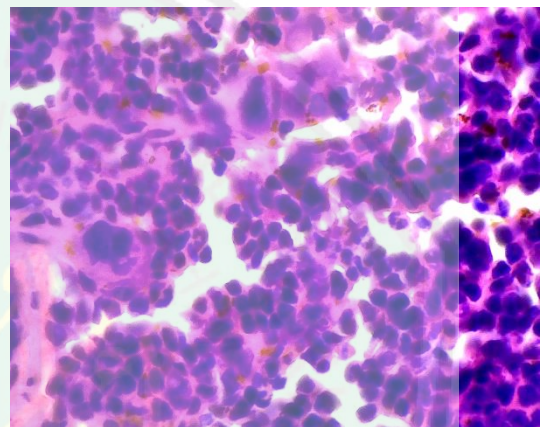
Kontrol Normal 3



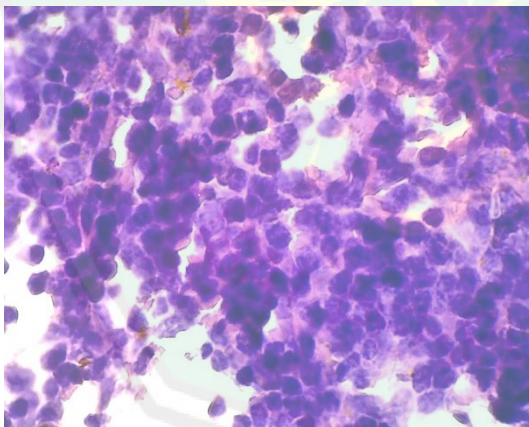
Kontrol Negatif 1



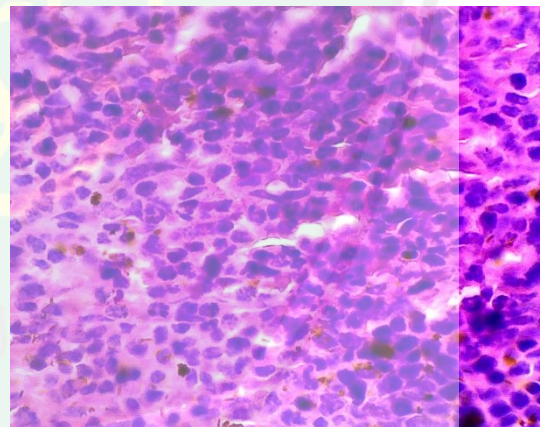
Kontrol Negatif 2



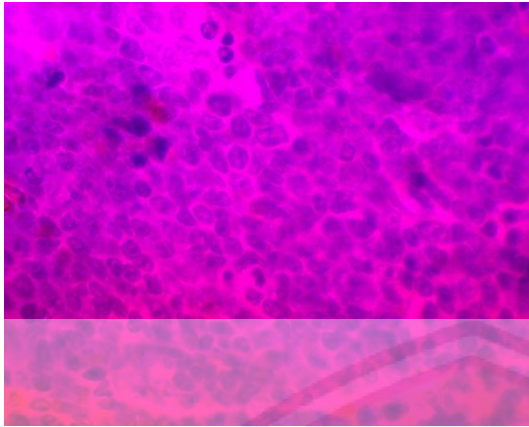
Kontrol Negatif 3



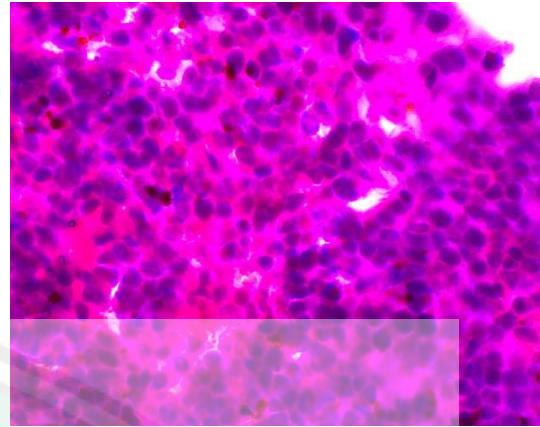
BNF100 1



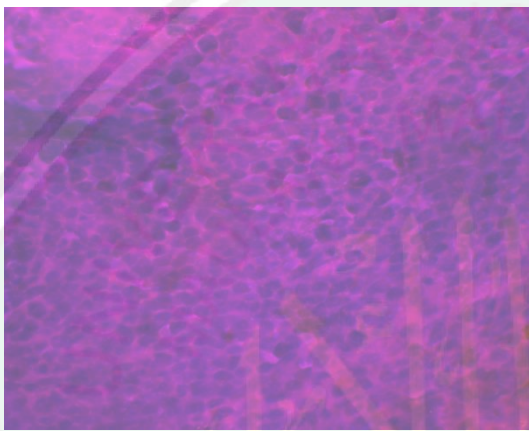
BNF100 2



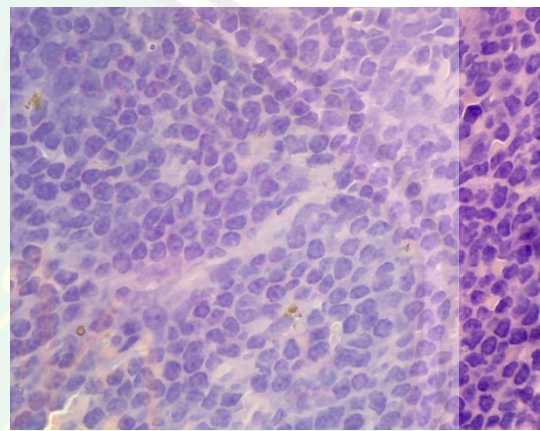
BNF100 3



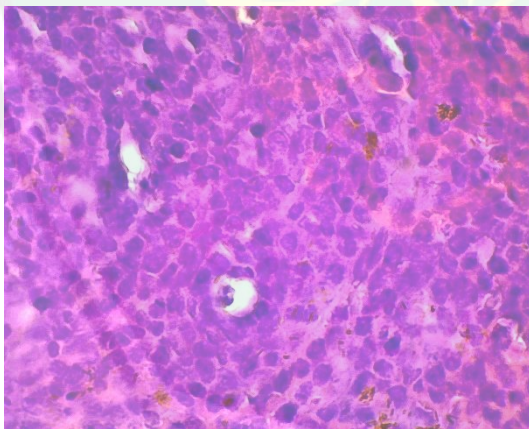
BNF200 1



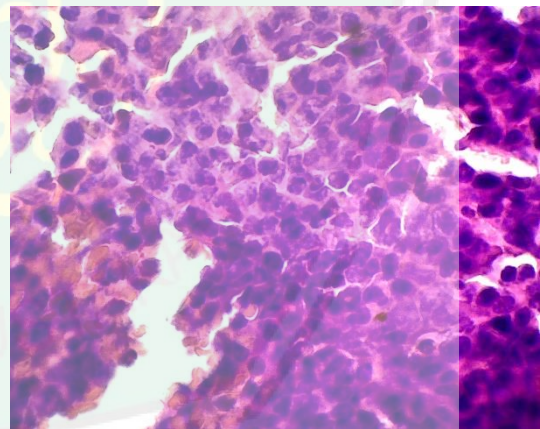
BNF200 2



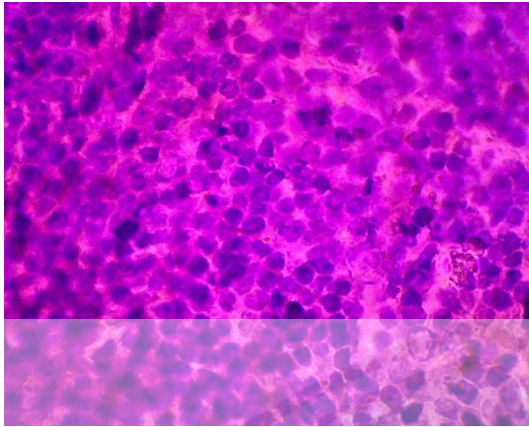
BNF200 3



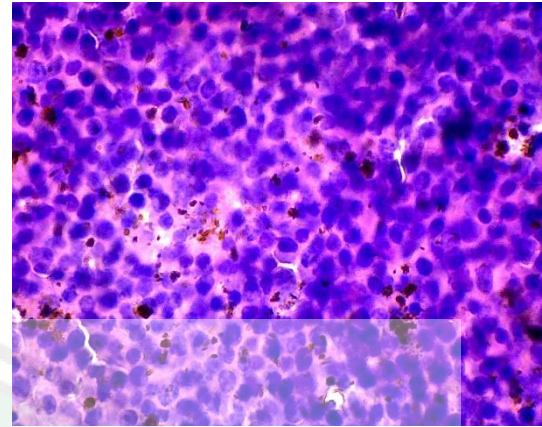
BF100 1



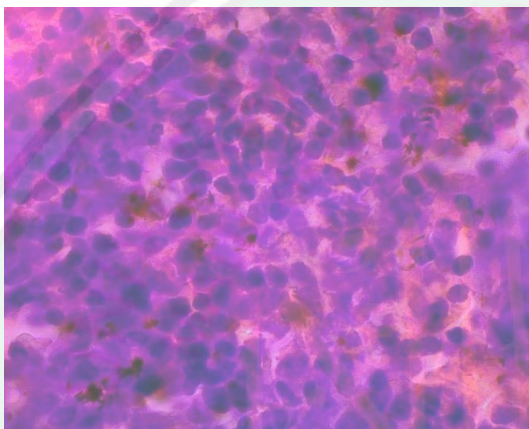
BF100 2



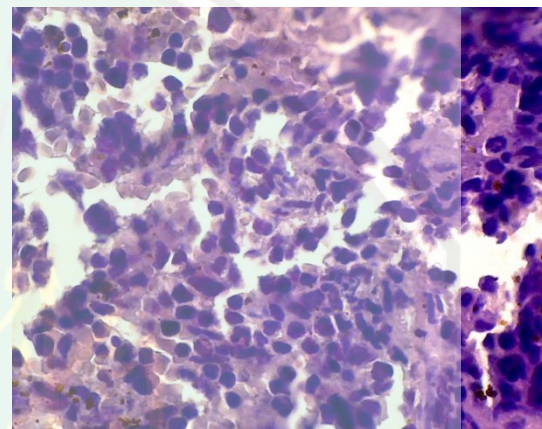
BF100 3



BF200 1



BF200 2



BF200 3

