

**PENGARUH EKSTRAK BEKATUL TERFERMENTASI DENGAN
Rhizopus oryzae TERHADAP HISTOLOGI HEPAR MENCIT
(*Mus musculus*) DIABETES**

SKRIPSI

Oleh:
MAGHFIROTUL IZZANI
NIM. 15630021



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

**PENGARUH EKSTRAK BEKATUL TERFERMENTASI DENGAN
Rhizopus oryzae TERHADAP HISTOLOGI HEPAR MENCIT
(*Mus musculus*) DIABETES**

SKRIPSI

Oleh:
MAGHFIROTUL IZZANI
NIM. 15630021

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 BEKATUL TERFERMENTASI DENGAN
Rhizopus oryzae TERHADAP HISTOLOGI HEPAR MENCIT (*Mus
musculus*) DIABETES**

SKRIPSI

Oleh:
MAGHFIROTUL IZZANI
NIM. 15630021

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 22 Desember 2020

Pembimbing I



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

Pembimbing II



A. Ghanaim Fasya, M.Si
NIP. 19820616 200604 1 002

Mengetahui,
Ketua Jurusan



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

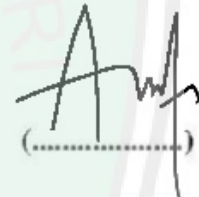
**PENGARUH EKSTRAK BEKATUL TERFERMENTASI DENGAN
Rhizopus oryzae TERHADAP HISTOLOGI HEPAR MENCIT (*Mus
musculus*) DIABETES**

SKRIPSI

Oleh:
MAGHFIROTUL IZZANI
NIM. 15630021

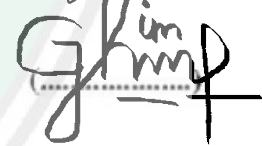
Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 22 Desember 2020

1. Penguji Utama : Suci Amalia, M. Sc
NIP. 198211012009012007
2. Ketua Penguji : Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P
NIP. 19750410 200501 2 009
3. Sekr. Penguji : Anik Maunatin, S.T., M.P
NIDT. 19760105 20180201 2 248
4. Anggota Penguji : A. Ghanaim Fasya, M.Si
NIP. 19820616 200604 1 002



(.....)


(.....)


(.....)


(.....)

Mengetahui,
Ketua Jurusan


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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Maghfirotul Izzani
NIM : 15630021
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Pengaruh Ekstrak Bekatul Terfermentasi Dengan *Rhizopus Oryzae* Terhadap Histologi Hepar Mencit (*Mus Musculus*) Diabetes

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

Malang, 29 Desember 2020
Yang membuat pernyataan,



Maghfirotul Izzani
NIM. 15630021

MOTTO

“Ilmu itu bukan yang dihafal, tetapi yang memberi kemanfaatan.”

(Imam Syafi’i)



HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah, segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan hidayah, ridhoNya dan kemudahan disetiap perjalanan dalam menimba ilmu sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Sholawat dan salam semoga selalu tercurahkan kepada nabi agung Muhammad SAW yang telah menuntun kita menuju jalan yang terang benderang yaitu agama Islam.

Teruntuk Budhe yang terus melantunkan doa-doa disepanjang malamnya, terima kasih banyak telah menjadi ibu yang terbaik. Teruntuk bunda Hj. Mufidah yang terus memberikan motivasi-motivasi dan nasehat. Terimakasih untuk doa dan nasehatnya semoga Allah SWT senantiasa memberikan ridhoNya kepada kita semua.

Kepada Ibu Anik Maunatin, Ibu Akyunul Jannah, Ibu Suci Amalia dan Bapak A. Ghanaim Fasya. Terima kasih atas bekal ilmu, dukungan, motivasi, arahan, nasehat, dan kesabaran. Terima kasih juga saya sampaikan kepada seluruh dosen jurusan Kimia, laboran jurusan kimia, dan Mas Basyaruddin selaku laboran jurusan biologi.

Teruntuk Ayyuma J. J. B. M selaku partner mengasuh mencit selama 1 tahun. Terimakasih telah memberikan warna pada cerita penelitian akhir ini, kebersamaan, perjuangan, dan bantuan-bantuan selama ini. Semoga Allah SWT senantiasa memberikanmu kemudahan disetiap langkahmu selanjutnya.

Terima kasih juga kepada Kuliner Squad, teman-teman Kimia A dan Kimia Angkatan 2015 yang luar biasa.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji syukur penulis ucapkan kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmatNya sehingga penulis mampu menyelesaikan penyusunan skripsi ini. Shalawat semoga tetap terlimpahkan kepada Nabi Muhammad SAW. Penulis menyadari bahwa dalam proses penyusunannya tidak mungkin dapat diselesaikan tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Penulis hanya mampu mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag, selaku rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Elok Kamilah Hayati, M. Si selaku ketua Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Anik Maunatin, S.T., M.P, selaku dosen pembimbing penelitian yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, nasehat serta motivasi kepada penyusun dalam menyelesaikan penelitian ini.
4. Akyunul Jannah, S.Si., M.P selaku dosen konsultan yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, nasehat serta motivasi kepada penyusun dalam menyelesaikan penelitian ini.
5. Suci Amalia, M.Sc dan A. Ghanaim Fasya, M.Si, selaku dosen penguji yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan kepada penulis.
6. Seluruh dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi yang telah memberikan ilmu, pengalaman, wawasan sebagai bekal hidup bagi penyusun.
7. Budhe dan Bapak yang telah banyak memberikan perhatian, nasehat, do'a dan dukungan baik moral maupun materi yang tak mungkin terbalaskan.
8. Teman-teman jurusan kimia khususnya di bidang biokimia sebagai motivator.

Akhirnya penulis hanya bisa berharap, di balik penulisan skripsi ini dapat memberikan manfaat dan wawasan atau bahkan hikmah bagi penulis, pembaca, dan bagi seluruh mahasiswa.

Malang, 21 Oktober 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
MOTTO	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR PERSAMAAN	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvi
مستخلص البحث	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Batasan Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Tinjauan Diabetes Mellitus	8
2.1.1 Definisi Diabetes Mellitus	8
2.1.2 Klasifikasi Diabetes Mellitus	8
2.1.3 Kriteria Diabetes Mellitus	9
2.1.4 Pengobatan Diabetes Mellitus	9
2.2 Tinjauan Organ Hepar	10
2.2.1 Organ Hepar	10
2.3 Bekatul	11
2.4 Uji Fitokimia	14
2.4.1 Alkaloid.....	14
2.4.2 Flavonoid	15
2.4.3 Steroid/Terpenoid	15
2.4.4 Saponin	16
2.4.5 Fenolik	17
2.5 Fermentasi Bekatul Menggunakan <i>Rhizopus oryzae</i>	17
2.5.1 Fermentasi Bekatul	17
2.5.2 Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	20
2.6 Radikal Bebas dan Antioksidan	23
2.6.1 Pengaruh Radikal Bebas Terhadap Histologi Hepar.....	23
2.6.2 Pengaruh Antioksidan Terhadap Histologi Hepar	24
2.7 Uji Antidiabetes pada Hewan Coba	26

2.7.1 Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	26
2.7.2 Alokasan sebagai Agen Diabetogenik	28
2.8 Ekstraksi dengan Metode Maserasi.....	30
2.9 Pewarnaan Hemaktosilin Eosin	31
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	33
3.1 Pelaksanaan Penelitian	33
3.2 Alat dan Bahan.....	33
3.2.1 Alat.....	33
3.2.2. Bahan	33
3.3 Rancangan Penelitian	34
3.4 Tahapan Penelitian.....	35
3.5 Pelaksanaan Penelitian.....	36
3.5.1 Preparasi Alat dan Bahan	36
3.5.1.1 Sterilisasi Alat	36
3.5.1.2 Stabilisasi Bekatul.....	36
3.5.2 Analisis kadar Air	36
3.5.3 Fermentasi Bekatul	37
3.5.3.1 Pembuatan Media Potato Dextrose Agar (PDA)	37
3.5.3.2 Regenerasi Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	37
3.5.3.3 Pembuatan Inokulum Jamur	37
3.5.3.4 Fermentasi Bekatul Menggunakan <i>Rhizopus oryzae</i>	38
3.5.4 Ekstraksi Senyawa Antioksidan Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi	38
3.5.5 Uji Fitokimia	39
3.5.5.1 Uji Alkaloid	39
3.5.5.2 Uji Flavonoid	39
3.5.5.3 Uji Saponin	40
3.5.5.4 Uji Steroid/Terpenoid	40
3.5.5.5 Uji Fenolik	40
3.5.6 Uji Antidiabetes	40
3.5.6.1 Persiapan Hewan Coba	40
3.5.6.2 Perlakuan Hewan Coba.....	41
3.5.7 Peningkatan Kadar Glukosa Darah pada Mencit	41
3.5.8 Perlakuan Terapi Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi pada Mencit.....	42
3.5.9 Pengukuran Kadar Glukosa Darah.....	42
3.5.10 Pewarnaan Hematoksilin-Eosin	43
3.5.10.1 Pembuatan Preparat.....	43
3.5.10.2 Pewarnaan Preparat.....	43
3.5.11 Analisis Data	44
BAB IV PEMBAHASAN.....	45
4.1 Preparasi Sampel.....	45
4.2 Kadar Air	46
4.3 Sterilisasi dan Pembuatan Media	46
4.3.1 Sterilisasi Bekatul	46
4.3.2 Pembuatan Media PDA	47

4.3.3 Regenerasi Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	47
4.4 Fermentasi Bekatul	48
4.4.1 Pembuatan Inokulum Jamur	48
4.4.2 Fermentasi Bekatul Menggunakan <i>Rhizopus oryzae</i>	49
4.5 Ekstraksi Bekatul	50
4.6 Uji Fitokimia Ekstrak Bekatul	52
4.6.1 Kandungan Senyawa Flavonoid	54
4.6.2 Kandungan Senyawa Steroid dan Terpenoid	55
4.6.3 Kandungan Senyawa Alkaloid	56
4.6.4 Kandungan Senyawa Fenolik	58
4.7 Pengaruh Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi pada Mencit Diabetes Mellitus	59
4.7.1 Persiapan Hewan Coba	59
4.7.2 Pengondisian Mencit Diabetes Mellitus	61
4.7.3 Terapi Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi pada Mencit Diabetes Mellitus	62
4.7.3.1 Perubahan Berat Badan Mencit Diabetes Mellitus Setelah Terapi	63
4.7.3.2 Penurunan Kadar Glukosa Darah Mencit Diabetes Mellitus	65
4.7.4 Pengaruh Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi pada Histologi Hepar Mencit Diabetes	67
4.7.4.1 Pengaruh Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi pada Sel Hepatosit Mencit Diabetes Mellitus	68
4.8 Pemanfaatan Bekatul dalam Perspektif Islam	73
BAB V PENUTUP	75
5.1 Kesimpulan	75
5.2 Saran	75
DAFTAR PUSTAKA	76
LAMPIRAN	86

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Organ Hepar	10
Gambar 2.2 Histologi Hepar Mencit	11
Gambar 2.3 Penampang Padi	12
Gambar 2.4 Struktur Inti Alkaloid	14
Gambar 2.5 Struktur Dasar Flavonoid	15
Gambar 2.6 Struktur Steroid	16
Gambar 2.7 Struktur Triterpenoid	16
Gambar 2.8 Struktur Saponin	17
Gambar 2.9 Struktur Fenolik	17
Gambar 2.10 Kurva Pertumbuhan Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	21
Gambar 2.11 Mekanisme Kerja Enzim Selulase Terhadap Selulosa	22
Gambar 2.12 Fotomikrograf Hepar Tikus Normal dan Diabetes	23
Gambar 2.13 Reaksi Peredaman Radikal Bebas oleh Tokoferol	25
Gambar 2.14 Fotomikrograf Hepar Tikus Diabetes dan Setelah Terapi Antioksidan	26
Gambar 2.15 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	26
Gambar 2.16 Struktur Alokсан	28
Gambar 2.17 Reaksi Redoks antara Alokсан dan Asam Dialurat	29
Gambar 4.1 Inokulum Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	48
Gambar 4.2 Bekatul Fermentasi dan Tanpa Fermentasi	49
Gambar 4.3 Reaksi Dugaan Flavonoid dengan Serbuk Mg	55
Gambar 4.4 Reaksi Dugaan Steroid/Terpenoid dengan Pereaksi Liebermen Bunchard	56
Gambar 4.5 Reaksi Dugaan Reagen Dragendorff dengan Alkaloid	57
Gambar 4.6 Reaksi Dugaan Reagen Mayer dengan Alkaloid	58
Gambar 4.7 Reaksi Dugaan Reagen FeCl ₃ dengan Fenol	59
Gambar 4.8 Reaksi Prooksidan	67
Gambar 4.9 Histologi Hepar Mencit Setelah Terapi Ekstrak Bekatul	69

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Klasifikasi Diabetes Mellitus	8
Tabel 2.2 Penentuan Kriteria Penderita Diabetes Mellitus	9
Tabel 2.3 Komponen Bioaktif Bekatul	13
Tabel 2.4 Peningkatan Komponen Fenolik Bekatul dengan Fermentasi	18
Tabel 2.5 Data Biologis Mencit di Laboratorium	27
Tabel 2.6 Konstanta Dielektrum dan Tingkat Kelarutan pada Pelarut	31
Tabel 4.1 Rendemen Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi	52
Tabel 4.2 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi	53
Tabel 4.3 Perubahan Berat Badan Mencit Sebelum dan Setelah Aklimatisasi	60
Tabel 4.4 Perubahan Berat Badan Mencit Diabetes Setelah Terapi Ekstrak Bekatul	63
Tabel 4.5 Kadar Glukosa darah Mencit Diabetes Setelah Terapi Ekstrak Bekatul	65
Tabel 4.6 Jumlah Sel Hepatosit Normal Setelah Terapi Ekstrak Bekatul	70
Tabel 4.7 Hasil Analisis Statistik ANOVA	72

DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 3.1 Penentuan Kadar Air.....	37
--	----



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian	85
Lampiran 2 Skema Kerja	86
Lampiran 3 Perhitungan Pembuatan Larutan.....	96
Lampiran 4 Perhitungan Pembuatan Dosis	100
Lampiran 5 Perhitungan Kadar Air dan Rendemen Ekstrak Bekatul	102
Lampiran 6 Perhitungan Berat Badan	105
Lampiran 7 Data Kadar Glukosa Darah.....	108
Lampiran 8 Data Perhitungan Jumlah Sel Hepatosit Normal Mencit Diabetes...112	
Lampiran 9 Hasil Analisis ANOVA	113
Lampiran 10 Dokumentasi	115
Lampiran 11 Hasil Pengamatan Histologi	120



ABSTRAK

Izzani, Maghfirotul. 2020. **Pengaruh Ekstrak Bekatul Terfermentasi dengan *Rhizopus oryzae* terhadap Histologi Hepar 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: A. Ghanaim Fasya, M.Si. Konsultan: Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P

Kata kunci : bekatul, maserasi, senyawa aktif, fermentasi, fitokimia, antidiabetes, histologi hepar

Bekatul merupakan hasil samping dari proses penggilingan padi yang mengandung beberapa komponen bioaktif diantaranya tokoferol, orizanol, dan tokotrienol yang berpotensi sebagai antidiabetes. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae* terhadap histologi hepar mencit (*Mus musculus*) diabetes.

Penelitian ini dilakukan dengan fermentasi bekatul menggunakan *Rhizopus oryzae* kemudian diekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 95% dan diuji fitokimia. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan mencit galur BALB/C jantan dan dibagi menjadi 6 kelompok: kontrol normal (tanpa terapi), kontrol negatif (induksi aloksan dosis 200 mg/KgBB) secara intraperitoneal, kontrol 1 (bekatul tanpa fermentasi dosis 100 mg/KgBB), kontrol 2 (bekatul tanpa fermentasi dosis 200 mg/KgBB), kelompok 1 (bekatul terfermentasi dosis 100 mg/KgBB), kelompok 2 (bekatul terfermentasi dosis 200 mg/KgBB). Terapi ekstrak bekatul dilakukan selama 19 hari dengan parameter pengamatan berat badan yang diamati setiap 3 hari sekali, kadar glukosa darah yang diamati pada hari ke-0,1,7,11,15,19 dan jumlah sel hepatosit. Pengambilan organ hepar dilakukan pada hari ke 20 untuk pengamatan histologi organ hepar dan dihitung sel hepatosit secara mikroskopik.

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi mengandung senyawa golongan alkaloid, steroid/terpenoid, fenolik dan flavonoid. Terapi ekstrak bekatul terfermentasi dosis 100 mg/KgBB (BF 100) menunjukkan penurunan kadar glukosa darah paling tinggi sebesar 49% mencapai kadar glukosa darah normal yaitu 135 mg/dL dan peningkatan perbaikan jumlah sel hepatosit normal yaitu 30 sel.

ABSTRACT

Izzani, Maghfirotul. 2020. **Effect of Fermented Rice Bran Extract by *Rhizopus oryzae* on the Histology of Liver Diabetic Mice (*Mus musculus*)**. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology State Islamic University Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: Anik Maunatin, S.T, M.P.; SupervisorII: A. Ghanaim Fasya, M.Si.; Consultant: Dr. Akyunul Jannah, S. Si, M.P.

Key words:Rice bran, maceration, solid-state fermentation, bioactive compound, antidiabetic, histology of liver organs.

Rice bran is a byproduct of rice milling process that contains several bioactive components including tocopherol, orizanol, and tootrienols has the potential to be antidiabetic. This study aimed to determine the effect of fermented rice bran extract by *Rhizopus oryzae* on the histology of liver diabetes mice (*Mus musculus*).

In the present study rice bran was fermented with *Rhizopus oryzae* and extract maceration with 95% ethanol and phytochemical identified. This study an experimental study using mice BALB/C strain with 6 treatments: normal control (without treatment), negative control (induced by alloxan at a dose of 200mg/Kg BB) intraperitoneally, control I (nonfermented rice bran 100 mg/KgBB), control II (nonfermented rice bran 200 mg/KgBB), group I (fermented rice bran 100 mg/KgBB), group II (fermented rice bran 200 mg/KgBB). The treatment was given orally for 19 days with the parameters measured were body weight on every 3 days, blood glucose on day-1, 7, 11, 15, 19 and count hepatocyte cells. The liver organ was taken in the day-20 for histology observation and the hepatocyte cells were counted microscopically.

The result shows that fermented rice bran and nonfermented rice bran extract was containing alkaloids, steroid/terpenoids, fenolic and flavonoids. The treatment of fermented rice bran 100 mg/Kg BW was giving best highest decreasing of blood glucose level that was 49% reach normal blood glucose that was 135 mg/dL and the highest increasing of hepatocytes that was 30 cells.

مستخلص البحث

عزني، مغفرتول. ٢٠٢٠. تأثير استخراج بيكاتول المخمرة مع *Rhizopus oryzae* على الأنسجة الجهاز كبد (*Mus musculus*) السكري. قسم الكيمياء كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرفة الأولى: أنيك معونتين، الماجستير، المشرف الثاني: أ. غانيم فاشا، الماجستير، المستشار: الدكتور أكيونو الجنة، الماجستير.

الكلمات الرئيسية: بيكاتول، مركب نشط، الماكرز، التخمير، الكيمياء النباتية، مضادات مرض السكري، الكبد الأنسجة بيكاتول هو منتج من نواتج عملية طحن الأرز التي تحتوي على العديد من المكونات النشطة بيولوجيا بما في ذلك توكوفيرول، أوريزانول، و توكوترينول. هذه المركبات هي مركبات مضادة للأكسدة التي يمكن أن تكون مضادات مرض السكري. يهدف هذا البحث إلى معرفة تأثير استخراج بيكاتول *Rhizopus oryzae* المخمرة على الأنسجة من (*Mus musculus*) السكري. وقد أجريت هذا البحث عن طريق تخمير بيكاتول باستخدام *Rhizopus oryzae* ثم استخراج باستخدام طريقة التكرار مع ٩٥ من المذيبات الإيثانول والمواد الكيميائية النباتية اختبارها. منسوخة أن يكون داء السكري مع aloksan التعريفي جرعة من ٢٠٠ ملغ / كغ BB. المينسيست المعالجة المخمرة وغير المخمرة استخراج الباكاتول بجرعات من ١٠٠، و ٢٠٠ ملغ / كغ BB. يتم إجراء العلاج استخراج بيكاتول لمدة ١٩ يوما مع العلامات من مراقبة الوزن، مستويات السكر في الدم وعدد خلايا الكبد. لوحظت تغيرات في الوزن كل ٣ أيام والتغيرات في مستويات السكر في الدم لوحظ على ١٠، ٧، ١١، ١٥، ١٩ اليوم. يتم استرجاع أعضاء الهيبار في اليوم العشرين للمراقبة المجهرية لعلم الأنسجة الجهاز كبد. وأظهرت النتائج المخمرة وغير المخمرة مقتطفات تحتوي على مركبات من قلويدات، المنشطات / تيريبينويد الفينولي والفلافونويدات. المخمرة بيكاتول جرعة العلاج استخراج ١٠٠ ملغ / كغم (BF ١٠٠) KGBB أظهرت أعلى انخفاض في مستويات السكر في الدم بنسبة ٤٩% الوصول إلى مستويات السكر في الدم الطبيعية من ١٣٥ ملغ / ديسيليل. و أعلى زيادة في عدد خلايا الكبد في بيكاتول المخمرة استخراج جرعة العلاج ١٠٠ ملغ / كغم (BF ١٠٠) أي ٣٠ خلية .

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perubahan gaya hidup dan sosial ekonomi akibat modernisasi menyebabkan peningkatan prevalensi penyakit degeneratif, salah satunya adalah diabetes mellitus. Data *World Health Organization* (WHO) menunjukkan jumlah pasien diabetes mellitus tipe dua di dunia pada tahun 2030 diperkirakan melebihi 300 juta orang (Pathel dkk, 2012). *Internasional Diabetes Federation* (IDF) pada tahun 2017 menempatkan Indonesia pada posisi ke tujuh di dunia sebagai negara dengan jumlah penderita diabetes mencapai 10,7 juta jiwa dan diperkirakan meningkat menjadi 13,7 juta jiwa pada tahun 2030 (Hasim dkk, 2020).

Diabetes mellitus merupakan penyakit metabolik yang ditandai dengan peningkatan konsentrasi glukosa darah (hiperglikemia). Diabetes terjadi akibat gangguan atau defisiensi insulin pada sel-sel β langerhans kelenjar pankreas. Insulin merupakan hormon yang berperan dalam proses pemecahan glukosa yang diserap ke dalam tubuh. Insulin juga berperan dalam proses metabolisme glukoneogenesis pada jaringan hepar. Resistensi insulin menyebabkan penurunan kemampuan insulin dalam menghambat proses tersebut sehingga terjadi peningkatan kadar glukosa darah dalam hepar (Baqarizky, 2015). Kondisi tersebut menyebabkan terjadinya autooksidasi glukosa, glikasi protein, dan aktivasi jalur poliol yang mengakibatkan peningkatan produksi radikal bebas (Triandita dkk, 2016). Pembentukan senyawa oksigen reaktif dapat meningkatkan modifikasi lipid, DNA dan protein pada berbagai jaringan sehingga terjadi ketidakseimbangan

antara antioksidan dengan peningkatan radikal bebas yang mengakibatkan stress oksidatif (Setiawan dkk, 2005).

Stress oksidatif dapat diatasi dan dicegah dengan senyawa antioksidan. Antioksidan berperan menetralkan radikal bebas dan melindungi jaringan biologis dari kerusakan yang diakibatkan oleh senyawa radikal bebas (Kumalaningsih, 2007). Senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antioksidan diantaranya golongan flavonoid, alkaloid, steroid/terpenoid, saponin, dan tanin. Flavonoid berperan sebagai *radical scavenger* yang menghambat pembentukan senyawa *Reactive Oxygen Species* (ROS) dengan cara menekan kerja peroksidase (Rahmawati dkk, 2014). Senyawa alkaloid berpotensi menurunkan glukosa darah dengan cara menghambat absorpsi glukosa di usus (Tachibana dkk, 2001). Senyawa antioksidan banyak ditemukan pada bahan alam salah satunya bekatul. Allah SWT berfirman dalam surat Luqman ayat 10:

خَلَقَ السَّمَاوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا وَالْأَرْضِ رَوَاسِيَ أَنْ تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ ثَوْبٍ كَرِيمٍ ﴿١٠﴾

Artinya: "Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang dan Kami turunkan air hujan dan air langit lalu Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuhan yang baik." QS. Luqman ayat 10.

Kata (كريم) digunakan untuk segala sesuatu yang baik. Rezeki yang *kariim* adalah yang banyak, halal dan bermanfaat. Pasangan tumbuhan yang *kariim* adalah yang tumbuh subur dan menghasilkan apa yang diharapkan dari penanamnya (Shihab, 2002). Allah SWT menciptakan tumbuhan untuk memenuhi

kebutuhan hidup makhluknya. Bagian-bagian tanaman mulai dari daun, akar, batang, buah, dan bunga bahkan limbah yang dihasilkan dapat dimanfaatkan oleh manusia salah satunya sebagai obat.

Bekatul merupakan hasil samping dari proses penggilingan padi yang banyak mengandung senyawa antioksidan dan berpotensi sebagai antidiabetes. Selain mengandung senyawa antioksidan, bekatul yang umumnya digunakan sebagai bahan pakan ternak, memiliki kandungan zat gizi antara lain protein (13,11-17,19 %), lemak (2,52-5,05 %), karbohidrat (67,58-72,74 %), dan vitamin B, terutama vitamin B1 (thiamin) (Luthfiono dkk, 2017). Friedman (2013) melaporkan bahwa komponen bioaktif pada bekatul terdiri dari senyawa γ -orizanol 3681 $\mu\text{g/g}$, α -tokoferol 71 $\mu\text{g/g}$ dan asam fenolik 2101 $\mu\text{g/g}$. Rashid dkk. (2015) juga melaporkan komponen bioaktif pada bekatul yang berperan sebagai antioksidan diantaranya adalah flavonoid, tokotrienol, dan β -sitosterol.

Salah satu cara untuk memaksimalkan penggunaan ekstrak bekatul sebagai antidiabetes yaitu menggunakan metode bioteknologi fermentasi. Fermentasi merupakan proses pemecahan senyawa organik menjadi senyawa sederhana melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme (Yosi dkk, 2014). Proses fermentasi bertujuan untuk menurunkan kadar serat bekatul, sehingga senyawa fenolik yang terikat pada serat tersebut dapat terlepas. Serat terbagi menjadi 2 yaitu serat larut dan serat tidak larut. Serat larut diantaranya pektin dan gum, sedangkan serat tidak larut yaitu selulosa, lignin dan hemiselulosa (Mursalina dkk, 2012). Proses fermentasi menghasilkan enzim yang dapat melepaskan senyawa bioaktif pada serat tidak larut. Semakin banyak senyawa bioaktif yang terlepas maka aktivitas senyawa antioksidan akan semakin

meningkat (Zubaidah dkk, 2012). Schmidt dkk. (2013) melaporkan fermentasi bekatul oleh *Rhizopus oryzae* meningkatkan kandungan senyawa fenolik sebesar 765 mg/g dari 33 mg/g. Razak dkk. (2017) juga menunjukkan peningkatan kandungan asam ferulat pada bekatul setelah difermentasi menggunakan *A. oryzae* dan *R. oryzae* dari 1,88 µg/mL menjadi 43,19 µg/mL. Selain itu Chaiyasut dkk. (2017) melaporkan kandungan senyawa fenolik pada bekatul meningkat setelah difermentasi menggunakan *Saccharomyces cerevesiae* dari 26,74 mg/g menjadi 29,07 mg/g. Peningkatan senyawa fenolik mengakibatkan peningkatan senyawa antioksidan yang dapat menekan terjadinya stress oksidatif yang mengarah pada kerusakan oksidatif.

Kerusakan oksidatif akibat hiperglikemia dapat ditinjau pada histologi organ hepar. Organ hepar pada kondisi diabetes akan mengalami degenerasi baik bersifat reversibel dan ireversibel. Degenerasi merupakan tanda awal kerusakan sel hepar yang ditunjukkan dengan adanya sel hepar berwarna lebih gelap dan mengalami pembengkakan. Hal ini disebabkan oleh peningkatan degradasi glikogen dan glukoneogenesis karena pemanfaatan glukosa terhambat (Hussaain dkk, 2008). Degenerasi yang terjadi secara terus menerus dapat mengakibatkan kerusakan sel berupa nekrosis (kematian sel). Lailatul dkk. (2015) melaporkan adanya kerusakan pada organ hepar tikus diabetes berupa perlemakan sel hepatosit yaitu 108 sel lebih banyak dibandingkan kelompok normal yaitu 26 sel dan ditemukan hipertrofi pada hepatosit, sinusoid tidak teratur, dan adanya infiltrasi sel radang.

Penelitian Diana (2017) melaporkan bahwa kandungan senyawa flavonoid pada ekstrak daun sirsak dapat membantu perbaikan kerusakan sel hepatosit

mencit diabetes sebesar 90,6%. Arif (2016) juga menunjukkan bahwa kandungan senyawa triterpenoid pada ekstrak buah pare dapat memperbaiki kerusakan sel hepatosit tikus diabetes sebesar 5,6 unit/34,57 cm² dari 3 unit/34,57 cm². Nurhidayah dkk. (2017) melaporkan bahwa kandungan senyawa fenolik dalam beras merah mampu menurunkan kadar glukosa darah tikus diabetes sebesar 57,82%. Penelitian Wahyuni dkk. (2016) menyatakan ekstrak bekatul beras hitam mempunyai efek inhibit aktivitas enzim α -glukosidase dengan nilai IC₅₀ sebesar 121 mg% dan dapat menurunkan kadar glukosa darah tikus diabetes pada hari ke-10 (152,67 mg/dL menjadi 131,33 mg/dL).

Proses ekstraksi senyawa bioaktif pada bekatul menggunakan pelarut dengan kepolaran yang sesuai dapat meningkatkan keefektifan mengekstrak senyawa-senyawa antioksidan lebih banyak. Ekstraksi bekatul dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol. Prinsip ekstraksi maserasi yaitu mengekstrak senyawa aktif berdasarkan tingkat kepolaran dan kemampuan pelarut dalam mengikat metabolit sekunder pada sampel (Khopkar, 2010). Pelarut etanol memiliki kemampuan lebih banyak menarik kandungan kimia senyawa metabolit sekunder dibandingkan metabolit primer (Saputra dkk, 2016). Widarta dkk. (2013) melaporkan bahwa ekstraksi bekatul menggunakan pelarut etanol menghasilkan rendemen paling tinggi sebesar 5,00% dibandingkan dengan pelarut metanol sebesar 3,91%. Ulfa (2016) juga menyatakan bahwa aktivitas antioksidan bekatul dengan metode DPPH menunjukkan aktivitas terbaik pada ekstrak etanol. Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan penelien tentang pengaruh ekstrak bekatul terfermentasi dengan *Rhizopus oryzae* terhadap kadar glukosa darah dan histologi hepar mencit diabetes mellitus.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, rumusan masalah yang dapat diangkat pada penelitian ini yaitu bagaimana pengaruh pemberian ekstrak bekatul terfermentasi dengan *Rhizopus oryzae* terhadap penurunan kadar glukosa darah dan gambaran histologi hepar pada mencit (*Mus musculus*) diabetes yang diinduksi aloksan?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bekatul terfermentasi dengan *Rhizopus oryzae* terhadap penurunan kadar glukosa darah dan gambaran histologi hepar pada mencit (*Mus musculus*) diabetes yang diinduksi aloksan.

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini diantaranya sebagai berikut:

1. Bekatul yang digunakan adalah bekatul beras putih yang diambil dari daerah Singosari, Malang Jawa Timur.
2. Mencit yang digunakan adalah mencit galur BALB/c.
3. Pelarut yang digunakan adalah etanol 95% menggunakan metode ekstraksi maserasi.
4. Bahan untuk menginduksi diabetes adalah aloksan 200 mg/kgBB.
5. Dosis ekstrak yang diinduksikan adalah 100 mg/KgBB dan 200 mg/KgBB.
6. Parameter yang diamati adalah berat badan, kadar glukosa darah dan histologi hepar mencit.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan memiliki manfaat sebagai dasar penelitian selanjutnya sehingga dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan dalam mengatasi penyakit diabetes mellitus.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Diabetes Mellitus

2.1.1 Definisi Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus merupakan penyakit gangguan metabolik yang ditandai dengan kondisi hiperglikemia. Diabetes mellitus disebabkan karena sel β pankreas tidak berfungsi secara maksimal sehingga produksi insulin terganggu yang mengakibatkan glukosa tidak disimpan dalam bentuk glikogen dan glukosa tidak dapat masuk ke dalam sel sehingga glukosa darah mengalami peningkatan (Setiawan dkk, 2005).

2.1.2 Klasifikasi Diabetes Mellitus

Penyakit diabetes mellitus berhubungan dengan insulin. Insulin berfungsi menurunkan kadar glukosa dengan cara merangsang sel tubuh untuk mengambil glukosa dari darah, memperlambat perombakan glikogen dalam hepar dan menghambat perubahan asam amino dan asam lemak menjadi gula (Campbell, 2004). Berdasarkan patologinya diabetes mellitus dibedakan menjadi 4 yaitu:

Tabel 2.1 Klasifikasi diabetes mellitus

No	Diabetes mellitus	Keterangan
1	Tipe 1	Kerusakan sel β pankreas karena faktor genetik yang dapat menyebabkan defisiensi insulin
2	Tipe 2	Resistensi insulin dan penurunan respon sel β pankreas
3	Tipe lain	Kelainan karena infeksi obat atau zat-zat kimia, penyakit eksokrin pankreas dan endokrinopati
4	Gestasional	Kelainan pada masa kehamilan

(Sumber: Depkes RI, 2005)

2.1.3 Kriteria Diabetes Mellitus

Pemeriksaan diabetes mellitus dilakukan dengan memeriksa kadar glukosa darah ketika puasa, pemeriksaan darah sewaktu (*at random*), atau kadar glukosa darah dua jam sesudah makan (*post prandial*) dengan metode enzimatik (Dalimartha, 2007). Hasil pemeriksaan kadar glukosa darah kemudian disesuaikan dengan Tabel 2.

Tabel 2.2 Penentuan kriteria penderita diabetes mellitus berdasarkan kadar glukosa darah sewaktu dengan metode enzimatik

	Bukan DM	Belum pasti DM	DM
Kadar glukosa darah plasma vena	<110 mg/dL	110-199 mg/Dl	≥ 200 mg/dL
Kadar glukosa darah kapiler	<90 mg/dL	90-199 mg/dL	≥ 200 mg/dL

(Sumber: Dalimartha, 2007)

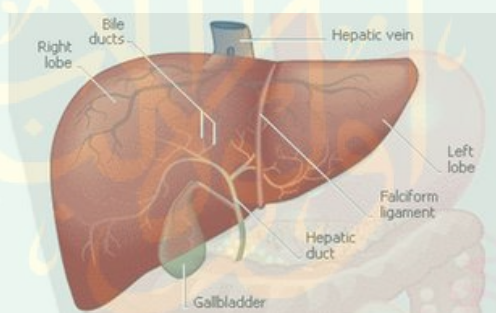
2.1.4 Pengobatan Diabetes

Pengobatan diabetes bertujuan untuk mengontrol kadar glukosa darah dalam tubuh berada dalam kisaran normal dan mengurangi resiko terjadinya komplikasi. Ada 2 macam obat hiperglikemik, yaitu berupa suntikan insulin dan berupa tablet yang dapat diminum. Obat yang berupa tablet biasa disebut obat hipoglikemik oral (OHO) atau antidiabetes (OAD). Obat hiperglikemik oral terbagi menjadi 2 golongan yaitu golongan sulfonilurea dan binguanid atau yang lebih dikenal dengan *Glibenclamid*. Turunan sulfonilurea dapat merangsang pengeluaran insulin dari sel β islet pankreatik, menurunkan pemasukan insulin endogen ke hati dan menekan secara langsung pengeluaran glukagon contohnya glipzid, gliburid, tolbumid, dan klorppropamid (Dalimartha, 2007).

2.2 Tinjauan Organ Hepar

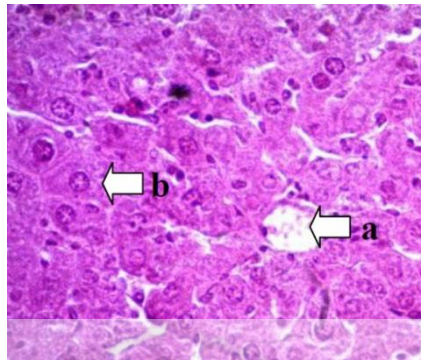
2.2.1 Organ Hepar

Hepar merupakan kelenjar terbesar dalam tubuh yang memiliki permukaan superior yang cembung dan terletak di bawah diafragma bagian kanan dan sebagian di bawah kiri diafragma (Price dan Wilson, 2012). Hepar memiliki 4 lobus yaitu lobus kanan yang berukuran besar dan lobus kiri yang berukuran lebih kecil. Lobulus-lobulus hepatis merupakan penyusun hepar. Vena sentralis pada masing-masing lobus bermuara ke vena hepatica dan diantara lobulus-lobulus terdapat canalis hepatis, yang berisi cabang-cabang arteri hepatica, vena porta, dan sebuah cabang dari ductus choledochus (trias hepatis). Darah arteri dan vena berjalan diantara sel-sel hepatosit melalui sinusoid dan dialirkan ke vena sentralis (Maulina, 2018).



Gambar 2.1 Organ Hepar

Fungsi hepar yang utama adalah membentuk dan mengekskresi empedu, saluran empedu mengangkut empedu sedangkan kandung empedu menyimpan dan mengeluarkan empedu ke usus halus sesuai kebutuhan. Hepar menyekresi sekitar 500 hingga 1000 ml empedu setiap hari. Hepar juga berperan penting dalam metabolisme karbohidrat, protein, dan lemak. Semua protein plasma (kecuali gama globulin) disintesis oleh hepar. Protein tersebut antara lain albumin, protrombin, dan faktor pembekuan lainnya (Guyton dkk, 1997).



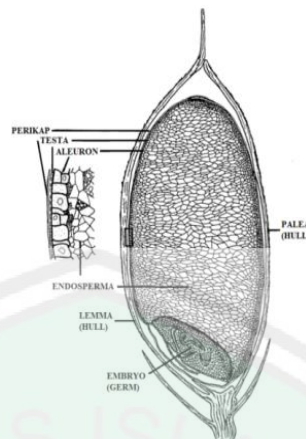
Gambar 2.2 Histologi hepar mencit (pewarnaan HE dan perbesaran 400x). Keterangan: a. Vena sentralis, b. Sel hepatosit

Unsur utama struktur hepar adalah sel hepatosit. Struktur sel hepatosit normal ditandai dengan bentuk bulat dengan inti jelas ditengah (Rarangsari, 2015). Susunan hepatosit dipisahkan oleh sinuoid yang merupakan saluran berkelu-liku dan melebar, diameternya tidak teratur, dan kebanyakan dilapisi sel endotel bertingkat yang tidak utuh. Sinusoid hepar mengandung sel-sel fagosit dari sel retikulendotel (sel Kupffer) dan sel-sel endotel. Sel Kupffer mempunyai inti besar, pucat dan sitoplasmanya lebih banyak dengan cabang-cabang meluas dan melintang di dalam ruang-ruang sinusoid (Maulina, 2018).

2.3 Bekatul

Bekatul merupakan hasil samping dari penggilingan padi pada proses penyosohan. Proses penggilingan padi menjadi beras menghasilkan 16-28% sekam, 6-11% dedak, 2-4% bekatul, dan 60% endosperma (Astawan dkk, 2010). Secara morfologi, bekatul terdiri dari jaringan perikap, kulit biji, nuselus, lapisan aleuron, bubuk germ (embrio), dan sekam endosperma (Orthoefer, 2011). Bekatul memiliki komponen protein, mineral, lemak, karbohidrat kompleks, vitamin, asam lemak esensial, dan lebih dari 120 senyawa antioksidan (Kahlon, 2009).

Penampakan bagian-bagian dari biji padi ditunjukkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Penampang padi (Saunders, 2012)

Ketersediaan bekatul di Indonesia cukup melimpah, namun pemanfaatannya hanya sebatas pakan untuk hewan ternak dan pengolahan untuk kebutuhan obat herbal sangat terbatas. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa bekatul memiliki banyak manfaat. Hal ini sesuai dengan firman Allah SWT dalam surat Qaf ayat 9:

وَنَزَّلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً مُّبَارَكًا فَأَنْبَتْنَا بِهِ جِبْتًا وَخَبَّ الْأَخْيِيدُ ﴿٩﴾

“Dan Kami turunkan dari langit air yang banyak manfaatnya. Lalu, Kami tumbuhkan dengan air itu pohon-pohon dari biji-biji tanaman yang diketam” (QS. Qaf:9)

Tafsir Shihab (2002) menjelaskan bahwa ayat ini diawali dengan rahmat Allah SWT berupa air hujan yang membawa kebaikan dan manfaat serta ditumbuhkannya kebun yang mempunyai pohon-pohonan, bunga-bunga, buah-buahan dan biji tumbuhan yang dapat dipanen seperti padi, gandum, jagung dan sebagainya. Manusia sebagai hamba yang beriman dan dibekali akal oleh Allah SWT mempunyai kewajiban untuk berfikir dan mencari manfaat dari yang diciptakan oleh Allah SWT, salah satunya dengan memanfaatkan tumbuhan sebagai pengobatan alternatif.

Bekatul merupakan sumber serat pangan. Serat pangan pada bekatul dibedakan atas serat pangan larut dan serat pangan tidak larut. Serat pangan larut bermanfaat untuk menurunkan kolesterol, mencegah diabetes, mengurangi resiko penyakit jantung koroner dan serat pangan tidak larut dapat mencegah terjadinya kanker kolon (Astawan, 2010). Selain itu, asam ferulat pada bekatul berfungsi sebagai antidiabetes, anti-inflamasi, antiatherogenik, antipenuaan neuroprotektif, radioprotektif, memperbaiki tekanan darah dan metabolisme glukosa (Adom dkk, 2002).

Serat pangan yang ditemukan pada bekatul antara lain selulosa, hemiselulosa, pektin, arabinosilan, lignin, dan β -glucan. Selain itu, bekatul mengandung asam amino esensial (triptofan, histidin, sistein, arginin) dan senyawa bioaktif. Komponen senyawa bioaktif pada bekatul yaitu γ -oryzanol, asam ferulat, asam kafeat, trisin, asam kumarat, asam fitat, vitamin E (α -tokoferol, γ -tokoferol, dan tokotrienol), fitosterol (β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol), dan karotenoid (α -karoten, β -karoten, lutein) (Kurniati dkk, 2017).

Tabel 2.3 Komponen bioaktif bekatul

Komponen	Jumlah (% bobot kering)
Lemak	16,96
Protein	12,07
Karbohidrat	45,54
Serat	11,77
Abu	10,78
Senyawa bioaktif (mg GAE/g)	1,96
Asam fitat (mg/g)	48,12
γ -oryzanol	1,52
α -tokoferol (μ g/g)	41,36
γ -tokoferol (mg/g)	37,97

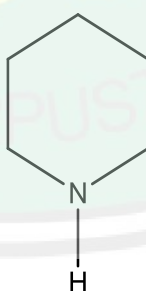
(Sumber : Moongngarm dkk, 2012)

2.4 Uji Fitokimia

Skринing fitokimia merupakan tahap pendahuluan yang dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif yang terkandung dalam bahan alam. Metode ini dilakukan dengan cara melihat adanya perubahan warna pada sampel yang direaksikan dengan reagen tertentu. Menurut Harborne (1984) senyawa metabolit sekunder yang umum terdapat pada tanaman adalah alkaloid, flavonoid, steroid/terpenoid, tanin dan saponin.

2.4.1 Alkaloid

Alkaloid merupakan golongan senyawa yang dapat ditemukan pada biji, daun, ranting, dan kulit kayu dari tumbuh-tumbuhan yang mengandung paling sedikit satu atom nitrogen yang bersifat basa dan membentuk cincin heterosiklik (Harborne, 1984). Pereaksi Dragendorff digunakan untuk mendeteksi alkaloid karena pereaksi ini mengandung bismut (logam dengan berat atom tinggi) (Sirait, 2007). Senyawa alkaloid tersusun dari atom nitrogen yang digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam (Marliana dkk, 2005).

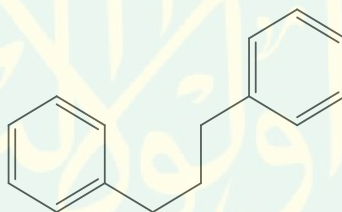


Gambar 2.4 Struktur inti alkaloid (Sumardjo, 2009)

Menurut Harborne (1984) menyatakan ekstrak yang positif akan membentuk endapan putih dengan reagen Meyer dimana endapan terbentuk karena pembentukan senyawa kompleks antara ion dari reagen dengan senyawa alkaloid.

2.4.2 Flavonoid

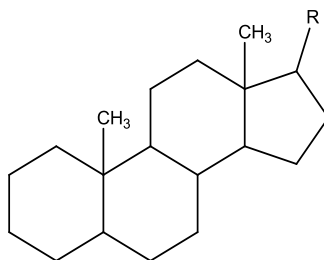
Flavonoid merupakan golongan senyawa polifenol dengan kerangka dasar 15 atom karbon yang terdiri dari dua cincin benzen (C₆) yang terikat pada propana (C₃) sehingga membentuk suatu susunan C₆-C₃-C₆ (Lenny, 2006). Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah hidroksil sehingga dapat larut dalam pelarut polar seperti etanol. Etanol berfungsi sebagai pembebas flavonoid dari bentuk garamnya. Penambahan asam klorida pekat berfungsi untuk protonasi flavonoid hingga terbentuk garam flavonoid. Setelah penambahan bubuk magnesium, hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna larutan menjadi hitam kemerahan. Warna hitam kemerahan yang dihasilkan menandakan adanya flavonoid akibat dari reduksi oleh asam klorida pekat dan magnesium (Harborne, 1984).



Gambar 2.5 Struktur dasar flavonoid (Sumardjo, 2009)

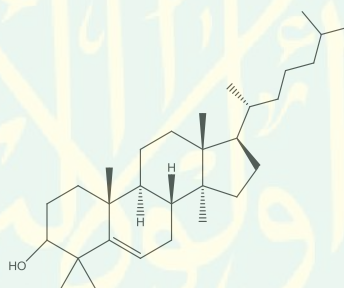
2.4.3 Steroid/Triterpen

Steroid merupakan terpenoid yang kerangka dasarnya terbentuk dari sistem cincin siklopentana. Steroid termasuk golongan lipid yang mempunyai struktur dasar yang sama dan merupakan derivat dari perhidrosiklopentanofenantrena, yang terdiri dari 3 cincin sikloheksana dan 1 cincin siklopentana yang tergabung pada ujung cincin sikloheksana (Poedjiadi, 2012).



Gambar 2.6 Struktur steroid ((Poedjiadi, 2012)

Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari 6 satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C₃₀ asiklik yaitu skualena. Senyawa ini berstruktur siklik yang kebanyakan berupa alkohol, aldehida atau asam karboksilat (Harborne, 1984). Senyawa triterpenoid/steroid dapat mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat dan membentuk garam yang memberikan jumlah reaksi warna (Robinson, 1995).

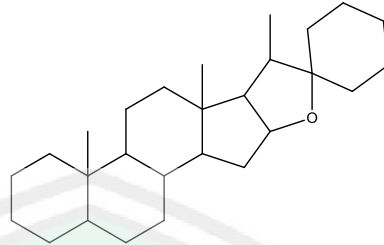


Gambar 2.7 Struktur triterpenoid (Robinson, 1995)

2.4.4 Saponin

Saponin merupakan senyawa yang memiliki glikosil yang berfungsi sebagai gugus polar dan gugus steroid dan triterpenoid sebagai gugus nonpolar. Senyawa yang memiliki gugus polar dan nonpolar bersifat aktif permukaan sehingga saat dikocok dengan air saponin dapat membentuk busa. Busa yang terbentuk dikarenakan adanya struktur misel gugus polar menghadap ke luar sedangkan gugus nonpolarnya menghadap ke dalam (Sangi dkk, 2008). Saponin merupakan senyawa yang larut dalam air tetapi tidak larut dalam eter dan memiliki sifat khas

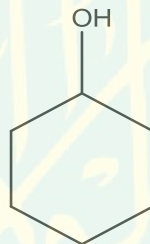
antara lain berasa pahit, berbusa dalam air dan beracun bagi binatang berdarah dingin (Mutiah dkk, 2011).



Gambar 2.8 Struktur saponin (Robinson, 1995)

2.4.5 Fenolik

Senyawa fenol merupakan senyawa yang memiliki struktur cincin aromatik dan mengandung satu atau dua hidroksil. Senyawa fenol cenderung mudah larut karena berikatan dengan gula sebagai glikosida (Harborne, 1984).



Gambar 2.9 Struktur fenol

2.5 Fermentasi Bekatul Menggunakan *Rhizopus oryzae*

2.5.1 Fermentasi Bekatul

Fermentasi merupakan suatu proses pemecahan senyawa organik menjadi senyawa sederhana dengan bantuan enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Proses fermentasi menyebabkan terjadinya penguraian senyawa-senyawa organik untuk menghasilkan energi serta terjadi perubahan substrat menjadi produk baru dengan bantuan mikroba (Yosi dkk, 2014). Senyawa fenolik pada tanaman secara alami berikatan dengan gula sederhana dalam bentuk glikosida dan terikat dengan lignin sebagai ester. Pada proses fermentasi mikroba mensintesis enzim yang

mampu memecah ikatan ester dan melepaskan fenolik terikat, sehingga meningkatkan senyawa fenolik bebas. Senyawa fenolik dalam bentuk glikosida dihidrolisis oleh enzim β -glukosidase bersama enzim esterase untuk membebaskan aglikon fenolik dari glikon. Sedangkan senyawa fenolik yang terikat dengan lignin sebagai ester didegradasi oleh enzim laktase membentuk fenolik bebas terakumulasi dalam vakuola sel. Selain itu, selama proses fermentasi enzim ferulik esterase berperan membebaskan asam ferulat dari komponen dinding sel seperti hemiselulosa dan lignin (Kurniati, 2017).

Proses fermentasi dapat meningkatkan kandungan nutrisi dari bahan pangan dan juga meningkatkan kandungan antioksidan. Hasil penelitian Fikriyah (2018) menyatakan bahwa aktivitas antioksidan pada bekatul terfermentasi menggunakan *Rhizopus oryzae* meningkat sebesar 13,37% (dari 70,7% menjadi 84,43%). Komponen fenolik pada bekatul terbentuk karena terjadinya dekomposisi lignin, selulosa, dan hemiselulosa selama proses fermentasi (Oliveira dkk, 2012). Mikroba yang digunakan pada proses fermentasi mampu menghidrolisis ikatan ester antara asam lemak dan polisakarida pada dinding sel tanaman, sehingga memaksimalkan kadar asam ferulat selama proses fermentasi (Kurniati, 2017).

Tabel 2.4 Peningkatan komponen fenolik bekatul dengan fermentasi

Mikroba	Jumlah Fenolik		Peningkatan fenol	Lama fermentasi	Referensi
	Sebelum fermentasi	Setelah fermentasi			
<i>Aspergillus niger</i>	1,8 mg/g dry	2,4 mg/g dry	33,3 %	24 jam	Hedge, 2006
<i>Rhizopus oryzae</i>	88 μ g/ml	160 μ g/ml	81 %	120 jam	Oliveira, 2011
<i>Pediococcus acidilactici</i>	6,19 mg/g dry	8,56 mg/g dry	38 %	48 jam	Rashid, 2015
<i>A. niger dan R.oryzae</i>	1,88 μ g/ml	14,70 μ g/ml	681 %	288 jam	Razak, 2015

Menurut Kunaepah (2008) menyatakan ada beberapa faktor yang memengaruhi proses fermentasi antara lain substrat, suhu, pH, oksigen, dan mikroba yang digunakan.

1. Substrat

Substrat merupakan bahan baku fermentasi yang memiliki kandungan nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroba untuk tumbuh dan menghasilkan produk fermentasi. Nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroba untuk tumbuh dan menghasilkan produk adalah karbohidrat. Karbohidrat merupakan sumber karbon yang berfungsi sebagai penghasil energi bagi mikroba, sedangkan nutrient lain seperti protein dibutuhkan dalam jumlah lebih sedikit daripada karbohidrat. Syarat-syarat media dapat digunakan untuk pertumbuhan mikroba yaitu (Jannah, 2010):

- a. Media mengandung nutrisi untuk pertumbuhan sel dan sumber energi bagi sel
- b. Media tidak mengandung zat yang menghambat pertumbuhan sel
- c. Tidak mengandung kontaminan

2. Suhu fermentasi

Suhu fermentasi memengaruhi lama fermentasi karena pertumbuhan mikroba dipengaruhi oleh suhu lingkungan fermentasi. Kapang dan khamir tergolong sebagai mikroorganisme bersifat mesofilik yang dapat tumbuh pada suhu rata-rata 30°C. Kapang dan khamir dapat tumbuh baik pada suhu 35-37°C, sebagian dapat tumbuh pada suhu rendah dan suhu pembekuan (Paggara, 2009).

3. Derajat keasaman (pH)

Derajat keasaman (pH) merupakan faktor penting yang memengaruhi beberapa aktivitas dari mikroorganisme dan berpengaruh terhadap proses

pemecahan bahan organik. Derajat keasaman yang mendukung pertumbuhan mikroorganisme adalah pH dengan sifat asam (rendah). *Rhizopus sp.* tumbuh baik pada kisaran pH 3,4-6 (Pangastuti, 1996).

4. Oksigen

Mikroorganisme jamur bersifat aerobik sehingga memerlukan oksigen.

5. Mikroba

Pemilihan mikroorganisme bertujuan mendapat mikroorganisme yang dapat tumbuh dengan cepat sesuai dengan medium yang digunakan.

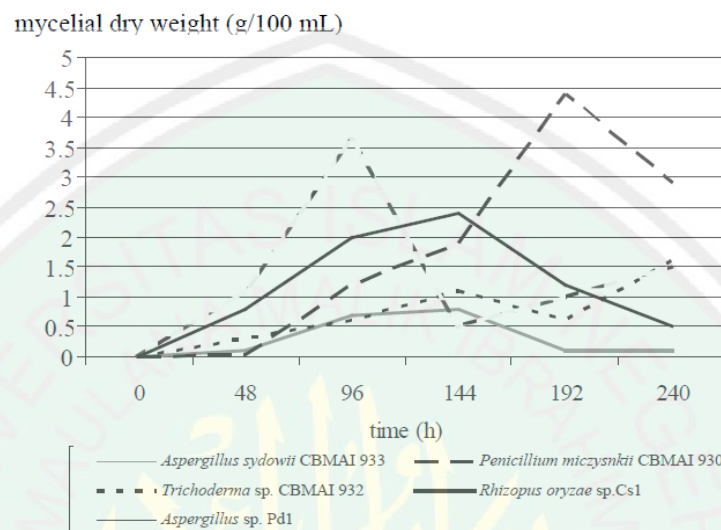
2.5.2 Jamur *Rhizopus Oryzae*

Rhizopus oryzae merupakan jamur berfilamen yang membentuk benang-benang hifa dalam pertumbuhannya. Menurut Germain dkk. (2006) menyatakan bahwa klasifikasi *Rhizopus oryzae* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Fungi
Devisio	: Zygomycota
Class	: Zygomycotes
Ordo	: Mucorales
Familia	: Mucoraceace
Genus	: <i>Rhizopus</i>
Spesies	: <i>R. Oryzae</i>

Metabolisme *Rhizopus oryzae* melalui jalur glikolisis yaitu memecah glukosa menjadi asam piruvat melalui 10 enzim yang terdapat di dalam selnya, kemudian asam piruvat akan diubah menjadi etanol oleh enzim PDC dan ADH (Buyukkilecci dkk, 2006). Suhu optimum untuk pertumbuhan *Rhizopus oryzae* adalah 35°C, suhu minimal pertumbuhan adalah 5-7°C dan suhu maksimal pertumbuhan adalah 44°C (Saropah dkk, 2012). Koloni *Rhizopus oryzae* dapat tumbuh dengan cepat pada cawan petri dalam waktu 4 hari dengan proses

reproduksi *Rhizopus sp.* dalam bentuk zygospora diawali dengan dua gamentangia melebur kemudian akan berkembang menjadi zigot, selanjutnya dinding akan menebal dan berubah menjadi zygospora (Moore, 1996). Berikut merupakan gambaran kurva pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae* (Melgar dkk, 2013) :



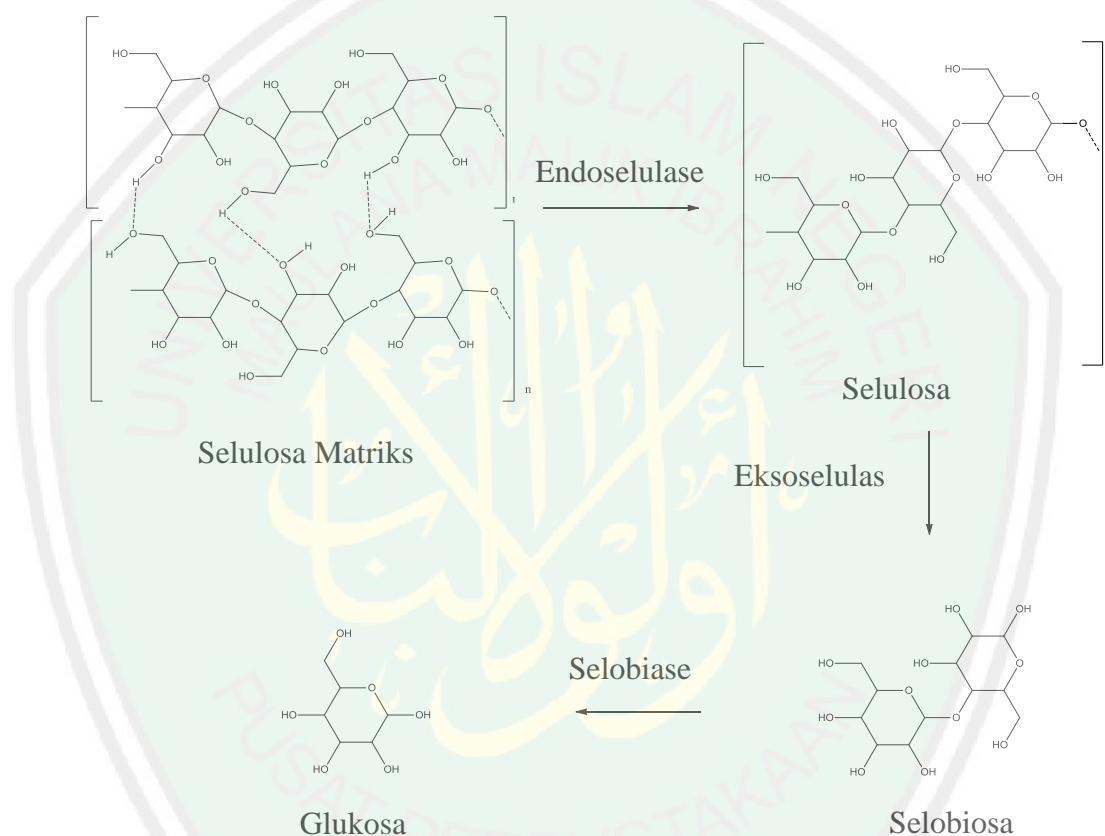
Gambar 2.10 Kurva pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae* (Melgar dkk, 2013)

Strain *Rhizopus oryzae* menunjukkan fase log terpendek, dimana produksi miselium tertinggi terjadi dari 48 sampai 96 jam inkubasi. Setelah waktu ini, penurunan masa miselium diamati sampai 144 jam. Jika masa inkubasi jamur diperpanjang dan laju pertumbuhan tetap diamati setelah 144 jam maka jumlah miselium yang ada lebih rendah dibandingkan dengan fase log. Berdasarkan kurva tersebut diketahui fase pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae* yaitu fase lag (0), fase akselerasi (0-48), fase eksponensial (48-96), fase deselerasi (96-144), fase stasioner (144-192) dan fase kematian (192-240) (Melgar dkk, 2013).

Jamur dari genus *Rhizopus* merupakan kelompok fungi selulolitik yang menghasilkan enzim selulase untuk mendegradasi selulosa. Selulosa merupakan polimer glukosa berbentuk rantai linier yang dihubungkan oleh ikatan β -1,4

glukosida, bersifat kristalin dan tidak mudah larut. Enzim selulase dapat mendegradasi selulosa menjadi glukosa melalui reaksi hidrolisis enzimatik. Sebagian glukosa yang dihasilkan digunakan oleh jamur sebagai sumber karbon dan sebagian terkandung dalam media tumbuh (Larasati dkk, 2012).

Adapun dugaan reaksi hidrolisis enzimatik selulosa adalah sebagai berikut (Saropah dkk, 2012):



Gambar 2.11 Mekanisme kerja enzim selulase (Saropah dkk, 2012)

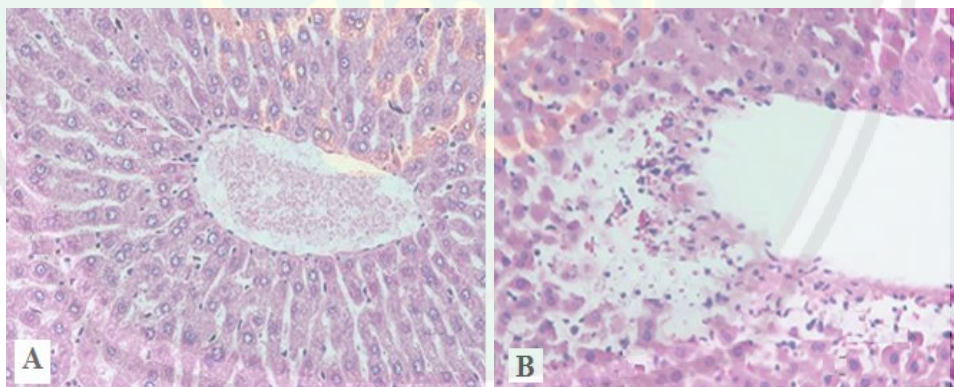
Hidrolisis selulosa terdiri dari dua tahap yaitu degradasi selulosa menjadi selobiosa oleh endo-1,4-glukanase dan ekso-1,4-glukanase kemudian dilanjutkan dengan pemecahan selobiosa oleh β -1,4 glukosidase. Enzim endo-1,4-glukanase dapat menghidrolisis polimer secara acak dan menghasilkan molekul selulosa sederhana. Sedangkan enzim ekso-1,4-glukanase menghidrolisis dua subunit glukosa pada bagian ujung sehingga menghasilkan selobiosa sederhana. Enzim β -

1,4 glukosidase menghidrolisis selobiosa menghasilkan glukosa (Saropah dkk, 2012).

2.6 Radikal Bebas dan Antioksidan

2.6.1 Pengaruh Radikal Bebas Terhadap Histologi Hepar

Radikal bebas atau senyawa oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species*) adalah sebuah molekul atau atom yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya sehingga bersifat tidak stabil, sangat reaktif dan dapat merebut elektron dari molekul lain dalam upaya mendapatkan pasangan elektronnya (Astuti, 2008). Hepar merupakan organ yang terlibat dalam proses metabolisme, detoksifikasi zat toksik dan memelihara kadar glukosa darah dalam batas normal. Kondisi hiperglikemia menyebabkan ketidakseimbangan reaksi oksidasi dan reduksi pada proses detoksifikasi sehingga menyebabkan peningkatan radikal bebas (Lailatul dkk, 2015).



Gambar 2.12 Fotomikrograf hepar tikus (pewarnaan HE). Keterangan: A. Normal, B. Diabetes (Faddladdeen dkk, 2020)

Histologi hepar tikus normal menunjukkan sel hepatosit normal tersusun radier dekat dengan vena sentralis, sinusoid tampak teratur dan menunjukkan sel endotel serta sel Kupffer sedangkan pada tikus diabetes ditemukan adanya sel

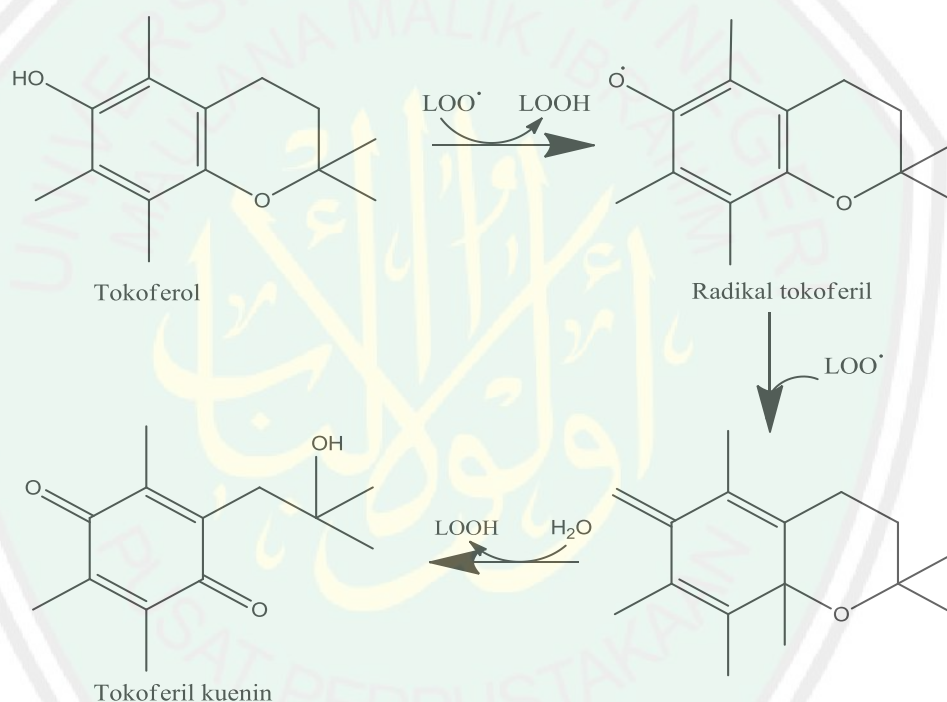
nekrosis, terjadinya dilatasi disekitar vena sentralis, apoptosis yang ditandai dengan sitoplasma berwarna gelap, inti kecil dan gelap (piknotik) (Faddladdeen dkk, 2020). Fitmawati (2018) menyatakan bahwa paparan zat toksik secara terus menerus pada organ hepar dapat menyebabkan sel mengalami degenerasi hingga kematian sel (nekrosis) yang ditandai dengan ciri-ciri kromatin inti menggumpal (piknosis), pecah (karioreksis), dan menghilang (kariolisis).

2.6.2 Pengaruh Antioksidan Terhadap Histologi Hepar

Tubuh secara alami memiliki sistem pertahanan terhadap radikal bebas, yaitu antioksidan endogen intrasel. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi molekul-molekul penting seperti protein, lemak, dan DNA dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Sumber antioksidan berdasarkan mekanisme kerjanya digolongkan menjadi tiga kelompok yaitu antioksidan primer, antioksidan sekunder, dan antioksidan tersier.

Antioksidan primer berfungsi untuk mencegah terbentuknya radikal bebas, meliputi enzim *superoksida dismutase* (SOD), katalase dan *glutation peroksidase* (GSH-Px). Antioksidan sekunder memiliki sistem pertahanan secara preventif dengan memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas. Antioksidan ini bersumber dari komponen non nutrisi dan komponen nutrisi dari sayuran dan buah-buahan meliputi vitamin E, vitamin C, karoten, bilirubin dan albumin. Antioksidan tersier adalah senyawa yang dapat memperbaiki sel dan jaringan yang rusak karena serangan radikal bebas. Antioksidan ini meliputi DNA-*repair* dan *metionin superoksida reduktase* (Winarsi, 2007).

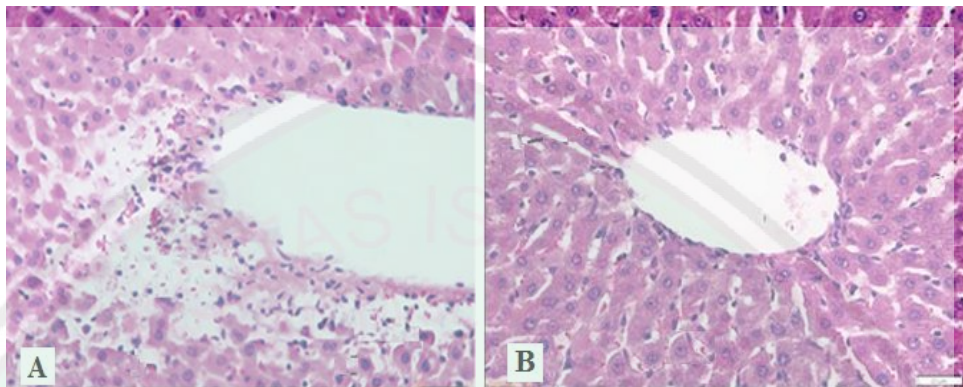
Vitamin E merupakan antioksidan golongan steroid yang terkandung dalam bekatul. Vitamin E terdiri dari struktur tokoferol dengan berbagai gugus metil pada strukturnya dan sebuah rantai sisi fitil. Vitamin ini berfungsi menghentikan penyebaran radikal bebas pada membran lemak karena bentuk radikal bebas distabilkan oleh resonansi. Radikal vitamin E dapat berinteraksi secara langsung dengan radikal peroksi lemak dan menjadi tokoferil kuinon yang teroksidasi sempurna (Marsk, 2000). Reaksi peredaman radikal bebas oleh tokoferol ditunjukkan pada Gambar 2.13 (Marsk, 2000).



Gambar 2.13 Reaksi peredaman radikal bebas oleh tokoferol (Marsk, 2000)

Antioksidan yang terdapat dalam tubuh harus terdapat dalam jumlah yang memadai. Keadaan patologik terjadi akibat terbentuknya radikal bebas dalam jumlah berlebihan sehingga enzim-enzim yang berfungsi sebagai antioksidan endogen dapat menurun aktivitasnya. Histologi hepar pada Gambar 2.14 setelah terapi (B) dengan senyawa fenolik menunjukkan adanya perbaikan sel hepatosit

normal yang ditandai dengan inti aktif vesikuler yang berbentuk sentral bulat, dan sinusoid darah terlihat teratur (Faddladdeen dkk, 2020). Senyawa fenolik merupakan senyawa antioksidan yang dapat mengurangi stress oksidatif dan menekan terjadinya kerusakan sel β pankreas (Widowati, 2008).



Gambar 2.14 Fotomikrograf hepar tikus (pewarnaan HE). Keterangan: A.Diabetes, B. Setelah terapi antioksidan (Faddladdeen dkk, 2020)

2.7 Uji Antidiabetes pada Hewan Coba

2.7.1 Mencit (*Mus musculus*)

Mencit merupakan salah satu hewan percobaan di laboratorium yang biasa disebut tikus putih. Mencit adalah hewan pengerat yang termasuk golongan mamalia. Berbeda dengan hewan-hewan lainnya, mencit tidak memiliki kelenjar keringat. Pada umur empat minggu berat badannya mencapai 18-20 gram. Hewan ini memiliki karakter lebih aktif pada malam hari daripada pada siang hari.



Gambar 2.15 Mencit (*Mus musculus*)

Mencit dipilih menjadi subyek eksperimental sebagai bentuk relevansinya pada manusia. Hewan ini mempunyai struktur fisik dan anatomi yang jelas berbeda dengan manusia, tetapi mencit merupakan hewan mamalia yang mempunyai beberapa ciri fisiologi dan biokimia yang hampir menyerupai manusia terutama dalam aspek metabolisme glukosa melalui perantara hormon insulin. Selain itu mencit memiliki banyak keunggulan sebagai hewan percobaan yaitu siklus hidup relatif pendek, jumlah anak setiap kelahiran banyak, variasi sifatnya tinggi dan mudah dalam penanganan. Adapun taksonomi mencit sebagai berikut (Kusumawati, 2004):

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Cordata
Sub phylum	: Vertebrata
Class	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Sub ordo	: Myomorpha
Family	: Muridae
Sub family	: Murinae
Genus	: Mus
Spesies	: <i>Musculus</i>

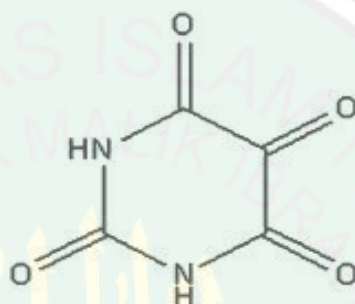
Tabel 2.5 Data biologis mencit di Laboratorium

Lama hidup	: 1-2 tahun, bisa sampai 3 tahun
Lama hamil	: 19-21 hari
Lama disapih	: 21 hari
Umur dewasa	: 35 hari
Umur dikawinkan	: 8 minggu (jantan dan betina)
Berat dewasa	: 20-40 g jantan; 18-35 g betina
Berat lahir	: 0,5-1,0 g
Jumlah anak	: rata-rata 6-15
Suhu (rektal)	: 35-39°C (rata-rata 37,4°C)
Konsumsi oksigen	: 2,38-4,48 ml/g/jam
Volume darah	: 75-80 ml/kg
Sel darah merah	: 7,7-12,5 x 10 ⁶ /mm ³
Sel darah putih	: 6,0-12,6 x 10 ³ /mm ³
Trombosit	: 150-400 x 10 ³ /mm ³
Hb	: 13-16 g/100 ml
Kecepatan tumbuh	: 1 g/ hari

Sumber: Smith dkk. (1987)

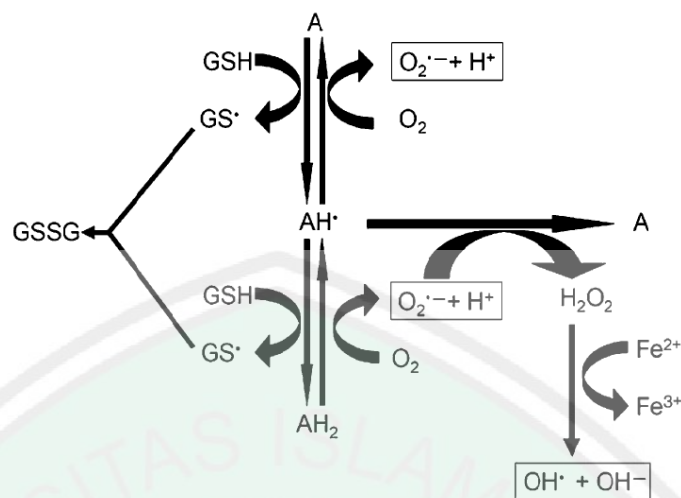
2.7.2 Aloksan sebagai Agen Diabetogenik

Aloksan ($C_4H_2N_2O_4$) merupakan suatu senyawa turunan pirimidin yang dapat menyebabkan diabetes pada hewan percobaan. Aloksan merusak sel β pankreas dengan pembentukan reaksi reduksi oksidasi yang menghasilkan peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Aloksan merupakan senyawa hidrofilik dan tidak stabil (Watkins dkk, 1964).



Gambar 2.16 Struktur aloksan (Lenzen, 2008)

Aloksan dapat menjalankan aksi diabetogeniknya ketika diberikan secara parental, intravena, intraperitonium dan subkutan (Szkudelski, 2001). Tingginya konsentrasi aloksan tidak berpengaruh pada jaringan yang lain. Efek diabetogeniknya bersifat antagonis terhadap glutathion yang bereaksi dengan gugus -SH. Aloksan bereaksi dengan merusak substansi esensial di dalam sel β pankreas sehingga menyebabkan berkurangnya granula-granula pembawa insulin. Aloksan meningkatkan pelepasan insulin dan protein dari sel β pankreas tetapi tidak memberikan pengaruh pada sekresi glukagon. Aksi sitotoksik aloksan dimediasi oleh radikal bebas yang dibentuk oleh reaksi redoks. Aloksan dan produk reduksinya (asam dialurat) membentuk siklus redoks dengan formasi radikal superoksida (Watkins dkk, 1964). Berikut merupakan reaksi redoks antara aloksan dan asam dialurat (Lenzen, 2008).



Gambar 2.17 Reaksi redoks antara aloksan dan asam dialurat. A, aloksan; $AH\cdot$, radikal aloksan; AH_2 , asam dialurat; $GS\cdot$, radikal glukokinase; GSSG, disulfida teroksidasi; $OH\cdot$, radikal hidroksil; $O_2\cdot^-$, radikal superoksida (Lenzen, 2008)

Reduksi aloksan di dalam sel β membutuhkan agen pereduksi seperti senyawa seluler yang mengandung gugus -SH, glutation (GSH), sistein, asam askorbat dan senyawa sulfhidril terikat protein (misalnya *SH-containing enzyme*). Hasil dari proses reduksi aloksan adalah asam dialurat yang dapat teroksidasi kembali menjadi aloksan. Reaksi autooksidasi asam dialurat menghasilkan senyawa intermediet radikal aloksan ($AH\cdot$) dan membentuk senyawa radikal superoksida ($O_2\cdot^-$) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Radikal superoksida dapat membebaskan ion ferri dari ferinitin, dan mereduksi menjadi ion ferro. Ion ferro dan hidrogen peroksida membentuk radikal hidroksil yang sangat reaktif melalui reaksi fenton. Radikal hidroksil merupakan salah satu senyawa ROS yang sangat reaktif dan dapat merusak sel β pankreas (Lenzen, 2008). Efek agen diabetogenik senyawa aloksan menyebabkan 40-50% sel beta pankreas pada tikus mengalami nekrosis dan degenerasi (Kim dkk, 2006). Hasil penelitian Boudreau dkk. (2006)

menunjukkan bahwa inti sel β mengalami kariolisis, komponen sitoplasma mengalami disintegrasi, dan batas-batas antar sel tidak jelas.

2.8 Ekstraksi dengan Metode Maserasi

Ekstraksi merupakan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Senyawa aktif yang terdapat dalam simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, flavonoid, alkaloid dan lain-lain. Simplisia yang lunak seperti rimpang dan daun mudah ditembus oleh pelarut, karena itu pada proses ekstraksi tidak perlu di serbuk sampai halus. Simplisia yang keras seperti biji, kulit kayu dan kulit akar sulit untuk di tembus oleh pelarut sehingga perlu diserbuk sampai halus (Depkes RI, 2000).

Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang dilakukan melalui proses perendaman serbuk bahan dalam larutan pengeksrak. Metode ini digunakan untuk mengekstrak zat aktif yang mudah larut dalam cairan pengeksrak, tidak mengembang dalam pengeksrak, serta tidak mengandung benzoin. Keuntungan dari metode ini adalah peralatannya mudah ditemukan dan pengerjaannya sederhana (Hargono dkk, 1986). Menurut Voight (1994) menyatakan bahwa metode maserasi akan lebih efektif jika proses pengadukan dilakukan secara berkala sehingga diperoleh suatu keseimbangan konsentrasi bahan ekstraktif yang lebih cepat masuk ke dalam cairan pengeksrak. Kelebihan metode maserasi yaitu sederhana, relatif murah, tidak membutuhkan peralatan yang rumit, menghindari kerusakan komponen senyawa yang tidak tahan panas, dan kontak yang terjadi antara sampel dan pelarut cukup lama.

Pemilihan pelarut organik yang akan digunakan dalam proses ekstraksi komponen aktif merupakan faktor penting untuk mencapai tujuan dan sasaran ekstraksi komponen. Semakin tinggi nilai konstanta dielektrik, titik didih dan kelarutan dalam air, maka pelarut akan bersifat polar (Sax dkk, 1998).

Tabel 2.6 Konstanta dielektrum dan tingkat kelarutan pada pelarut

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

(Sumber : Sax dkk, 1998)

2.9 Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

Prinsip pewarnaan jaringan adalah berdasarkan afinitas antara bahan cat (zat warna) dengan bahan yang diwarnai (sel/jaringan). Hematoksilin merupakan zat yang diambil dari ekstrak getah pohon *haematoxylon campehianus* yang memiliki afinitas sangat kecil yang perlu dikombinasikan dengan bahan lain agar mempercepat pewarnaan sel inti. Eosin merupakan zat warna pembanding (*counter stain*) yang digunakan untuk mewarnai sitoplasma (Putra, 2012).

Hematoksilin berperan sebagai pewarna dasar. Hematoksilin bersifat basa yang khusus mewarnai unsur asam pada sel sehingga tampak kebiruan, karena unsur asam pada sel sehingga tampak kebiruan, karena unsur yang paling asam adalah asam deoksiribonukleat (DNA) dan asam ribonukleat (RNA), maka inti dan lingkungan sitoplasma yang banyak terdapat ribosom akan tampak berwarna biru tua sehingga disebut basofilik. Eosin bersifat asam yang mewarnai unsur basa

dari sel pada jaringan seperti mitokondria, granula sekretoris, dan kolagen berwarna merah muda, unsur-unsur ini disebut asidofilik (Setiawan, 2016). Eosin berperan sebagai pewarna asam yang mewarnai komponen jaringan yang tidak berinti sehingga berwarna merah sampai merah muda (Ariyadi dkk, 2017).



BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Pelaksanaan Penelitian

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

3.2 Alat dan Bahan

1.2.1 Alat

Alat pada penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, ayakan 60 mesh, jarum ose, cawan, vortex, kertas saring, bola hisap, oven, desikator, *autoclave*, inkubator, corong *Buchner*, *rotary evaporator*, kapas, timbangan analitik, alat sonde, kandang mencit, tempat makan mencit, botol minum mencit, spuit 1 mL, glukometer *Gluco DR*, aluminium foil, plastik *wrap*, meja preparat, mikrotom, gelas objek, dan mikroskop.

1.2.2 Bahan

Bahan pada penelitian ini adalah bekatul (diperoleh dari penggilingan padi di daerah Singosari, Malang), inokulum *Rhizopus oryzae*, media *Potato Dextrose Agar* (PDA), Na-CMC, asam sulfat (H_2SO_4) pekat, alkohol, hewan coba, pakan standar, aloksan, etanol 95%, akuades, larutan $FeCl_3$ 1%, HCl pekat, methanol 50%, serbuk Mg, larutan HCL 2 M, reagen Dregendorff, reagen Mayer, NaCl, formaldehid, parafin, xylol, alkohol bertingkat, Hematoksilin, dan eosin.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari satu faktor, yaitu hubungan antara ekstrak bekatul terfermentasi terhadap kadar glukosa darah dan histologi hepar mencit (*Mus musculus*) diabetes. Sampel berupa bekatul yang disaring dengan ayakan 60 mesh kemudian distabilisasi di dalam oven. Bekatul kemudian dibagi menjadi 2 yaitu bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi. Selanjutnya bekatul disterilisasi di dalam *autoclave*. Bekatul fermentasi ditambahkan dengan *Rhizopus oryzae* dan difermentasi selama 5 hari. Sedangkan bekatul tanpa fermentasi ditambahkan akuades. Bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi diekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 95%. Setelah itu ekstrak dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* dan dipekatkan menggunakan gas N₂.

Ekstrak bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi dilanjutkan dengan uji fitokimia menggunakan uji reagen untuk mengetahui adanya senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, dan steroid/triterpenoid. Setelah itu dilakukan uji antidiabetes secara *in vivo*. Setiap perlakuan menggunakan 3 ekor mencit dengan pengelompokan sebagai berikut:

- a. 3 ekor kontrol normal yaitu mencit tanpa induksi aloksan.
- b. 3 ekor kontrol negatif (-) yaitu mencit diinduksi aloksan diberikan Na CMC.
- c. 3 ekor kontrol 1 yaitu mencit diinduksi aloksan dengan diberikan ekstrak bekatul tanpa fermentasi dosis 100 mg/KgBB.
- d. 3 ekor kontrol 2 yaitu mencit diinduksi aloksan dengan diberikan ekstrak bekatul tanpa fermentasi dosis 200 mg/KgBB.

- e. 3 ekor kelompok 1 yaitu mencit diinduksi aloksan dengan diberikan ekstrak bekatul terfermentasi dosis 100 mg/KgBB.
- f. 3 ekor kelompok 2 yaitu mencit diinduksi aloksan dengan diberikan ekstrak bekatul terfermentasi dosis 200 mg/KgBB.

Pengkondisian mencit diabetes mellitus dilakukan dengan induksi aloksan dosis 200mg/KgBB secara intraperitoneal. Mencit hiperglikemia diberikan perlakuan sesuai kelompok selama 19 hari. Kadar glukosa darah diuji sebelum induksi aloksan pada hari ke-0 dan setelah induksi aloksan (pasca diabetes) pada hari ke-1,7,11,14, dan 19. Pada hari ke-20 organ hepar diambil dan dilakukan pewarnaan Hematoksilin-eosin serta pengamatan sel hepatosit menggunakan mikroskop. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA* dengan signifikansi $\alpha=0,05$.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Preparasi alat dan bekatul.
2. Analisis kadar air bekatul.
3. Fermentasi bekatul.
4. Ekstraksi bekatul fermentasi dan tanpa fermentasi dengan metode maserasi.
5. Uji fitokimia dengan uji warna menggunakan reagen pereaksi.
6. Uji antidiabetes.
7. Peningkatan kadar glukosa darah.
8. Perlakuan dengan ekstrak bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi.
9. Pengukuran kadar glukosa darah.

10. Pengambilan organ dan pengamatan histologi hepar
11. Analisis Data

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Preparasi Alat dan Bahan

3.5.1.1 Sterilisasi Alat (Fikriyah, 2018)

Sterilisasi alat dilakukan sebelum proses fermentasi. Alat-alat yang disterilisasi berupa peralatan gelas dicuci bersih dan dibungkus dengan plastik tahan panas. Alat yang sudah siap disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.1.2 Stabilisasi Bekatul (Sholeha, 2019)

Sampel berupa bekatul diayak dengan ayakan 60 mesh. Setelah itu bekatul ditimbang sebanyak 100 gram dan dibungkus menggunakan aluminium foil. Setelah itu, bekatul distabilisasi menggunakan oven pada suhu 40°C selama 60 menit, kemudian didinginkan pada suhu ruang. Sampel kering disimpan untuk analisis lebih lanjut.

3.5.2 Analisis Kadar Air (Sholeha, 2019)

Analisis kadar air dilakukan metode thermogravimetri atau pemanasan. Cawan yang digunakan dipanaskan terlebih dahulu dalam oven pada suhu 100-105°C sekitar 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya, kemudian cawan disimpan dalam desikator sekitar 10 menit. Cawan tersebut selanjutnya ditimbang. Sampel bekatul dimasukkan ke dalam cawan yang telah diketahui beratnya. Sampel ditimbang sekitar 5 gram, selanjutnya dikeringkan di dalam oven pada suhu 100-105°C sekitar 1 jam. Sampel yang kering didinginkan dalam desikator

dan ditimbang. Sampel dipanaskan kembali dalam oven ± 20 menit, didinginkan dalam desikator kembali. Perlakuan diulang sampai tercapai berat konstan.

Kadar air dihitung menggunakan rumus berikut:

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

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

3.5.3 Fermentasi Bekatul

3.5.3.1 Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Pembuatan media PDA dilakukan dengan cara melarutkan 3,9 gram media PDA bubuk dalam 100 mL akuades dan dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk. Larutan tersebut dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 4 mL dan ditutup mulut tabung reaksi dengan kapas dan *plastic wrap*. Selanjutnya, media PDA disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C. Kemudian, didinginkan dalam keadaan miring hingga memadat.

3.5.3.2 Regenerasi Jamur *Rizhopus oryzae* (Fikriyah, 2018)

Media miring *Potato Dextrose Agar* (PDA) disiapkan pada suhu 4°C di dalam tabung reaksi yang sudah disterilisasi. Regenerasi dilakukan dengan cara mengambil 1 ose isolat jamur digoreskan pada media miring *Potato Dextrose Agar* (PDA). Kemudian media didiamkan pada suhu kamar hingga bersporulasi penuh selama kurang lebih 3 hari.

3.5.3.3 Pembuatan Inokulum Jamur (Fikriyah, 2018)

Suspensi jamur diperoleh dari pemanenan isolat yang berumur ± 5 hari setelah inkubasi pada media PDA. Sebanyak 5 mL akuades steril dimasukkan dalam

cawan petri kemudian jamur yang sudah diregenerasi dalam media PDA dikerok kemudian diinokulasikan ke dalam 5 mL akuades steril. Media akuades yang telah diinokulasi dengan jamur divortex selama ± 5 menit sehingga sel jamur tersuspensi sempurna pada media akuades.

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

Sebanyak 30 gram bekatul dimasukkan dalam 2 buah erlenmeyer 250 mL. Selanjutnya bekatul ditambahkan dengan air dengan perbandingan 1:1 (b/v). Erlenmeyer kemudian ditutup dengan aluminium foil dan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C. Bekatul terfermentasi ditambah dengan inokulum jamur *Rhizopus oryzae* sebanyak 5 mL dan dikocok dengan spatula steril. Sedangkan pada kontrol bekatul tanpa fermentasi, ditambahkan 5 mL akuades steril. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 hari. Setelah proses fermentasi selesai, bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi dikeringkan di dalam oven pada suhu 50°C selama 1 hari.

3.5.4 Ekstraksi Senyawa Antioksidan Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi (Oliviera dkk, 2012)

Ekstraksi senyawa antioksidan dilakukan dengan metode maserasi. Bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi ditimbang sebanyak 30 gram dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL. Kemudian dilakukan ekstraksi maserasi menggunakan etanol 95% p.a (1:5,b/v) sebanyak 150 mL dan ditutup mulut Erlenmeyer dengan aluminium foil. Ekstraksi maserasi dilakukan menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 30°C selama 24 jam.

Filtrat disaring menggunakan corong *Bunchner* dan dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* kemudian dipekatkan menggunakan gas N₂.

3.5.5 Uji Fitokimia (Harborne, 1984)

Uji fitokimia merupakan uji kualitatif untuk mengetahui kandungan senyawa antioksidan golongan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan triterpenoid pada bahan alam. Uji ini dilakukan pada ekstrak bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi.

3.5.5.1 Uji Alkaloid

Ekstrak bekatul terfermentasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambah 0,5 mL HCl 2% dan larutan dibagi menjadi 2 tabung. Tabung pertama larutan ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorff dan tabung kedua larutan ditambah 2-3 tetes reagen Mayer. Apabila pada tabung kedua terbentuk endapan jingga dan pada tabung ketiga terbentuk endapan kekuningan, hal ini menunjukkan terdapat golongan senyawa alkaloid dalam sampel. Perlakuan diulang pada ekstrak bekatul tanpa fermentasi.

3.5.5.2 Uji Flavonoid

Ekstrak bekatul terfermentasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dalam 1-2 mL metanol 50% panas. Kemudian ditambahkan logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat. Apabila larutan membentuk warna merah atau jingga menunjukkan terdapat golongan senyawa flavonoid dalam sampel. Perlakuan diulang pada ekstrak bekatul tanpa fermentasi.

3.5.5.3 Uji Saponin

Ekstrak bekatul terfermentasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL akuades dan dikocok 1 menit, diamati perubahan yang terjadi. Jika menimbulkan busa ditambahkan 2 tetes HCl 1 N. Apabila terbentuk busa yang mantap (tidak hilang selama 30 detik) maka identifikasi menunjukkan adanya senyawa golongan saponin dalam sampel. Perlakuan diulang pada ekstrak bekatul tanpa fermentasi.

3.5.5.4 Uji Steroid/Triterpenoid

Ekstrak bekatul terfermentasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya, campuran ditetesi dengan 1-2 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung reaksi tersebut. Apabila terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut maka menunjukkan adanya triterpen, sedangkan munculnya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid. Perlakuan diulang pada ekstrak bekatul tanpa fermentasi.

3.5.5.5 Uji Fenolik

Ekstrak bekatul terfermentasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan larutan FeCl₃ 10% dalam akuades. Apabila terjadi perubahan warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam yang kuat maka menunjukkan uji positif. Perlakuan diulang pada ekstrak bekatul tanpa fermentasi.

3.5.6 Uji Antidiabetes

3.5.6.1 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*) galur Balb/C jenis kelamin jantan dengan berat ± 20 gram. Sebelum perlakuan, dilakukan

aklimatisasi selama 7 hari, mencit dipelihara dalam kandang yang diberi alas serbuk kayu dan anyaman kawat sebagai penutup. Pemberian makan dan minum dilakukan setiap hari. Pada akhir aklimatisasi dilakukan pemeriksaan kadar glukosa darah puasa pada hewan percobaan.

3.5.6.2 Perlakuan Hewan Coba

Penelitian ini dilakukan dengan 6 kelompok perlakuan dengan 3 sediaan mencit untuk setiap kelompok dengan ketentuan sebagai berikut:

Kontrol normal yaitu mencit normal tanpa induksi aloksan.

Kontrol negatif (-) yaitu mencit diinduksi aloksan diberikan Na CMC.

Kontrol 1 yaitu mencit diinduksi aloksan dengan diberikan ekstrak bekatul tanpa fermentasi dosis 100 mg/Kg BB.

Kontrol 2 yaitu mencit diinduksi aloksan dengan diberikan ekstrak bekatul tanpa fermentasi dosis 200 mg/Kg BB.

Kelompok 1 yaitu mencit diinduksi aloksan dengan diberikan ekstrak bekatul terfermentasi dosis 100 mg/Kg BB.

Kelompok 2 yaitu mencit diinduksi aloksan dengan diberikan ekstrak bekatul terfermentasi dosis 200 mg/Kg BB.

3.5.7 Peningkatan Kadar Glukosa Darah pada Mencit (Sohiyah, 2017)

Mencit diinduksi dengan aloksan dosis 200 mg/kgBB melalui intraperitoneal. Aloksan monohidrat dilarutkan dalam larutan fisiologis (NaCl 0,9% b/v) dengan konsentrasi 200 mg/mL. Mencit dipuasakan selama 18 jam, kemudian diinjeksi sesuai berat badan. Mencit diposisikan terlentang hingga terlihat bagian

abdomennya. Pada bagian abdomen disemprotkan alkohol 70% agar tidak terjadi infeksi. Mencit diinkubasi selama 7 hari, kemudian dilakukan pengukuran kadar glukosa darah. Mencit yang memiliki kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dL ditandai sebagai mencit hiperglikemia.

3.5.8 Perlakuan Terapi Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi pada Mencit

Hewan coba diberikan perlakuan berbeda sesuai masing-masing kelompok. Pada kontrol normal mencit diberikan pakan standar. Pada kontrol negatif (-) mencit diinduksi aloksan dan diberikan Na CMC. Pada kontrol 1 dan kontrol 2, mencit diabetes diberikan pakan standar dengan terapi ekstrak bekatul tanpa fermentasi. Pada kelompok 1 dan kelompok 2, mencit diabetes diberikan pakan standar dengan induksi ekstrak bekatul terfermentasi. Perlakuan tersebut dilakukan secara berulang selama 19 hari. Kemudian masing-masing mencit diuji kadar glukosa darahnya pada hari ke-1, 7, 11, 15, dan 19 namun terlebih dahulu mencit dipuasakan selama 18 jam.

3.5.9 Pengukuran Kadar Glukosa Darah (Susilawati, 2017)

Pengukuran kadar glukosa darah mencit dilakukan dengan alat Glukometer *GlucoDr*. Alat terlebih dahulu dikalibrasi. Test strip untuk uji kadar gula darah diselipkan pada tempat khusus pada alat kemudian akan muncul gambar tetesan darah. Darah mencit diambil dengan bantuan *disposable syringe* yang ditusukkan pada aliran darah vena ekor mencit. Volume minimal darah yang dapat diukur adalah 0,5 μ L yang kemudian dimasukkan pada celah sensor di ujung strip.

3.5.10 Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (Suryani, 2013)

3.5.10.1 Pembuatan Preparat

Sebelum dilakukan pembedahan, mencit dipuasakan selama 18 jam, kemudian didislokasi leher. Selanjutnya skalpel dan alat bedah disiapkan untuk pengambilan organ hepar. Dislokasi leher merupakan cara untuk membuat hewan coba mati, dengan memegang buntut mencit kemudian menariknya dengan kuat ke arah belakang dan ditahan, secara bersamaan menekan leher mencit ke arah depan. Setelah itu mencit dibedah dan diambil organ hepar. Organ hepar dicuci menggunakan NaCl steril. Kemudian difiksasi menggunakan formalin 10% selama 24 jam. Setelah itu organ hepar diiris dan dimasukkan dalam cetakan. Kemudian didehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (70%, 80%, dan 96%) masing-masing selama 30 menit. Setelah itu, dimasukan ke dalam xylol selama 30 menit. Organ hepar yang sudah didehidrasi dimasukkan ke dalam parafin cair dengan suhu 70°C selama 24 jam. Organ hepar diambil dan diblok menggunakan blok parafin. Organ hepar dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-5 μm . Kemudian organ hepar dimasukkan dalam air hangat suhu 60°C dan diletakkan pada gelas objek. Preparat organ hepar dikeringkan dan diwarnai menggunakan Hematoksilin-Eosin.

3.5.10.2 Pewarnaan Preparat

Preparat dalam gelas objek direndam dalam xylol selama 2 menit. Kemudian preparat direndam dalam alkohol absolut, alkohol 96%, alkohol 80% masing-masing selama 2 menit. Setelah itu, preparat direndam dalam Hematoksilin selama 3 menit kemudian dibilas dengan akuades. Selanjutnya preparat direndam dalam eosin selama 1 menit. Preparat yang sudah diwarnai kemudian direndam

dalam alkohol bertingkat (70%, 80% dan 96%) selama 2 menit. Tahap selanjutnya adalah *clearing* yaitu memasukkan ke dalam xylol 1 dan xylol 2 masing-masing selama 2 menit. Tahap terakhir adalah *mounting* yaitu menutup gelas objek dengan cover glass. Preparat yang sudah diwarnai kemudian dikeringkan dan diamati dibawah mikroskop untuk dilakukan pengamatan histologi. Jumlah sel hepatosit dihitung pada sel yang telah dipilih per lapang pandang pada perbesaran 400x.

3.5.11 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

PEMBAHASAN

Penelitian ini berjudul “Pengaruh Ekstrak Bekatul Terfermentasi dengan *Rhizopus oryzae* terhadap Histologi Hepar Mencit (*Mus musculus*) Diabetes”. Sampel bekatul diperoleh dari hasil penggilingan padi di daerah Singosari, Malang. Tahapan pada penelitian ini diantaranya preparasi sampel, analisis kadar air, fermentasi bekatul menggunakan jamur *Rhizopus oryzae*, ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 95% dan uji fitokimia. Tahapan selanjutnya uji *in vivo* ekstrak bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi terhadap penurunan kadar glukosa darah dan perbaikan sel hepatosit mencit diabetes yang diinduksi aloksan. Tahapan terakhir pengambilan organ hepar dan pengamatan histologi hepar secara mikroskopik.

4.1 Preparasi Sampel

Proses preparasi diawali dengan pengayakan bekatul menggunakan ayakan berukuran ≤ 60 mesh untuk mensekagamkan ukuran serbuk. Semakin kecil ukuran serbuk maka semakin besar luas permukaan sampel sehingga mempermudah kelarutan komponen bioaktif. Interaksi antara pelarut dan sampel semakin besar sehingga proses ekstraksi lebih efektif dan senyawa aktif yang terekstrak semakin banyak (Baraja, 2008).

Bekatul yang telah diayak distabilisasi dalam oven pada suhu 40°C selama satu jam. Proses ini bertujuan menginaktifkan aktivitas enzim lipase sebagai katalis reaksi hidrolisis lemak yang dapat menyebabkan ketengikan (Kusumawati dkk, 2013). Bekatul hasil stabilisasi disimpan dalam wadah yang tertutup rapat

dan kedap udara agar bekatul lebih tahan lama, dan tidak mudah mengalami kerusakan.

4.2 Kadar Air

Sampel bekatul dianalisis kadar air menggunakan metode termogravimetri. Penentuan kadar air berfungsi untuk menghindari pengaruh aktivitas mikroba terhadap perubahan sifat fisik kimia bahan. Kandungan kadar air yang rendah dapat meningkatkan umur simpan dan mencegah kontaminasi pertumbuhan mikroba. Kadar air terbaik berkisar antara 3-7% karena dapat menghambat pertumbuhan mikroba, dan mengurangi reaksi kimiawi yang menyebabkan munculnya bau tengik pada bekatul (Luthfianto dkk, 2017). Hasil pengukuran kadar air pada bekatul bahan baku dan bekatul stabilisasi yaitu 7,07% dan 6,43%. Hasil ini menunjukkan bahwa sampel yang dianalisis mempunyai kadar air yang baik. Semakin kecil nilai kadar air maka proses penarikan senyawa aktif oleh pelarut akan lebih maksimal karena tidak terhalang oleh air yang terdapat pada sampel.

4.3 Sterilisasi dan Pembuatan Media

4.3.1 Sterilisasi Bekatul

Proses sterilisasi bertujuan membunuh pertumbuhan mikroorganisme untuk menghindari terjadinya kontaminasi pada bahan dan alat. Bekatul yang telah distabilisasi kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 15-17,5 psi (2 atm). Pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi air sebagai media pensteril akan mendidih. Uap dalam *autoclave* dapat mendenaturasi

protein pada mikroorganisme hidup, sehingga akan mematikan organisme tersebut (Adji dkk, 2007).

4.3.2 Pembuatan Media PDA

Media adalah zat yang mengandung nutrisi untuk menumbuhkan dan memperbanyak jumlah mikroorganisme. Media *Potato Dextrose Agar* (PDA) merupakan media umum untuk pertumbuhan jamur. PDA mengandung dekstrosa dan ekstrak kentang sebagai sumber nutrisi yang baik untuk pertumbuhan jamur (Putri, 2016). Jamur *Rhizopus oryzae* ditumbuhkan dalam media PDA miring dalam tabung reaksi. Pembuatan media PDA dilakukan dengan melarutkan bubuk PDA dalam akuades dengan pemanasan dan pengadukan untuk membantu pelarutan media. Media disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi. Media PDA kemudian digunakan untuk regenerasi jamur *Rhizopus oryzae*.

4.3.3 Regenerasi jamur *Rhizopus oryzae*

Regenerasi jamur dilakukan pada media PDA miring sebagai media pertumbuhannya. Media PDA mengandung nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan jamur. Regenerasi merupakan tindakan pembaharuan, pertumbuhan dalam memperbanyak sel, menjaga ketersediaan nutrisi dan menghindari adanya perubahan karakteristik dari kultur murni yang ditanam. Peremajaan dilakukan secara aseptis untuk menghindari adanya kontaminan yang dapat mempengaruhi pertumbuhan jamur. Jarum ose dipijarkan di atas api sebelum dan sesudah melakukan proses pemindahan jamur serta melewati tabung tempat biakan di

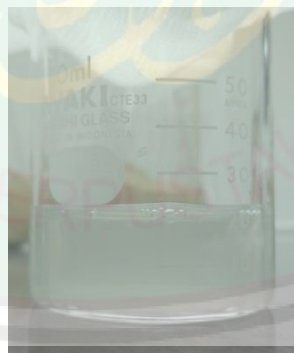
atas api sebelum dan sesudah memasukkan jarum dan segera menutup tabung (Saropah dkk, 2012).

Peremajaan dilakukan dengan mengambil 1 ose jamur *Rhizopus oryzae* dan digoreskan secara aseptis pada media PDA miring kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 5 hari. Penelitian Melgar dkk. (2013) menyatakan bahwa fase lag (adaptasi) jamur *Rhizopus oryzae* berada pada masa inkubasi 0-2 hari, fase logaritmik (eksponensial) pada masa inkubasi 2-4 hari, fase stasioner berada pada masa inkubasi 4-6 hari, dan fase kematian berada pada masa inkubasi 6 hari.

4.4 Fermentasi Bekatul

4.4.1 Pembuatan Inokulum Jamur

Inokulum merupakan kultur mikroba yang diinokulasikan ke dalam sebuah medium pada saat kultur mikroba berada pada fase pertumbuhan. Pembuatan inokulum bertujuan memperpendek fase lag dengan cara mengadaptasikan sel ke dalam media fermentasi (Siburian, 2015).



Gambar 4.1 Inokulum jamur *Rhizopus oryzae*

Pembuatan inokulum dilakukan dengan menambahkan akuades ke dalam jamur yang ditumbuhkan pada cawan petri. Kemudian dilakukan pengerokan badan jamur sehingga diperoleh suspensi miselia jamur *Rhizopus oryzae*. Suspensi

miselia yang berupa larutan berwarna putih keruh disaring dengan kasa steril. Suspensi miselia jamur tersebut siap digunakan pada proses fermentasi bekatul.

4.4.2 Fermentasi Bekatul Menggunakan *Rhizopus oryzae*

Proses fermentasi bertujuan memecah atau merenggangkan kompleks selulosa dalam bekatul dengan bantuan mikroorganisme jamur *Rhizopus oryzae*. Bekatul untuk fermentasi dan tanpa fermentasi ditambahkan akuades steril dengan perbandingan 1:1 (bekatul:akuades). Fermentasi bekatul dilakukan dengan teknik *Solid State Fermentation* (SSF) menggunakan kadar air yang sedikit karena dapat meminimalisasi kontaminan, produktivitas tinggi, dan menghindari adanya senyawa aktif pada bekatul yang ikut terlarut dan terbuang dalam akuades selama proses fermentasi (Kurniati dkk, 2017). Inkubasi dilakukan selama 5 hari yang merupakan fase log menuju fase stasioner dimana terjadi peningkatan jumlah sel (Melgar dkk, 2013). Fase log merupakan fase dimana mikroba membelah dengan cepat dan konstan sampai pada fase stasioner yaitu fase ketika jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati (Setyati, 2015).



A

B

Gambar 4.2. A. Bekatul tanpa fermentasi, B. Bekatul terfermentasi

Sifat fisik bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi menunjukkan adanya perubahan warna dan aroma. Aroma bekatul terfermentasi lebih harum

dibandingkan bekatul tanpa fermentasi. Aroma tersebut berasal dari asam lemak hasil degradasi lemak oleh enzim lipase yang bereaksi dengan alkohol sehingga membentuk senyawa ester yang menghasilkan aroma harum (Svendsen, 2000). Warna bekatul terfermentasi lebih gelap dibandingkan warna bekatul tanpa fermentasi. Hal ini disebabkan oleh aktivitas metabolisme *Rhizopus oryzae* yang memanfaatkan bekatul sebagai sumber zat makanan untuk hidup dan berkembang (Yosi dkk, 2014). Jamur memanfaatkan sumber karbon dan nitrogen dari substrat bekatul untuk menghasilkan energi (Sukma, 2010).

4.5 Ekstraksi Bekatul

Ekstraksi merupakan metode pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kelarutan terhadap dua cairan yang tidak saling larut (Khopkar, 2008). Ekstraksi senyawa antioksidan pada bekatul menggunakan metode maserasi. Ekstraksi maserasi merupakan proses penyaringan simplisia dengan cara perendaman menggunakan pelarut dengan pengadukan pada temperatur kamar. Maserasi merupakan metode ekstraksi dingin karena pengerjaannya tidak membutuhkan suhu tinggi (Depkes RI, 2000). Kelebihan proses ekstraksi maserasi adalah mencegah kerusakan senyawa antioksidan pada sampel, lebih sederhana, mudah dan murah untuk diterapkan secara komersial.

Pelarut yang digunakan adalah etanol 95%. Etanol memiliki dua gugus yang berbeda kepolarannya yaitu gugus hidroksil yang bersifat polar dan gugus alkil yang bersifat non polar. Gugus pada etanol tersebut menyebabkan senyawa-senyawa yang memiliki tingkat kepolaran berbeda (bersifat polar, semi polar dan non polar) dapat terekstrak (Effendy, 2006).

Ekstraksi bekatul dengan pelarut etanol menggunakan perbandingan 1:5 (bekatul:etanol). Proses ekstraksi dilakukan dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang selama 5 jam yang bertujuan untuk memaksimalkan interaksi sampel dengan pelarut. Plasmolisis sel (pemecahan dinding sel) terjadi pada proses perendaman sampel, pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang menyebabkan senyawa aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan senyawa aktif di dalam dan di luar sel, cairan hipertonis akan masuk ke cairan yang hipotonis sehingga terjadi keseimbangan (Hayati dkk, 2012).

Filtrat dan residu dipisahkan melalui proses penyaringan menggunakan corong *Buchner* dan kertas saring. Prinsip penyaringan corong *Buchner* dengan tekanan vakum berdasarkan ukuran molekul, dimana molekul yang berukuran lebih besar akan tetap bertahan pada kertas saring (Vogel, 1987). Pompa vakum akan memperkecil tekanan dalam erlenmeyer yang secara otomatis memperbesar tekanan di luar (sekitar erlenmeyer), sehingga tekanan di luar akan mendorong filtrat masuk ke dalam erlenmeyer. Filtrat yang diperoleh berwarna kuning kehijauan. Filtrat hasil penyaringan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* yang bertujuan untuk memisahkan pelarut dengan senyawa aktif. Suhu pada *rotary evaporator* adalah 50°C yang merupakan suhu dibawah titik didih pelarut etanol dan bertujuan melindungi senyawa yang terkandung dalam pelarut. Prinsip *rotary evaporator* adalah adanya penurunan tekanan dan dipercepatnya putaran labu alas bulat sehingga pelarut akan menguap pada suhu dibawah titik didih (Vogel, 1987). Proses pemekatan dihentikan ketika ekstrak yang diperoleh cukup pekat dan ditandai dengan berhentinya tetesan pelarut pada labu alas bulat.

Ekstrak hasil *rotary evaporator* dipisahkan dengan pemberian gas N₂ untuk menghilangkan sisa-sisa pelarut. Rendemen ekstrak kemudian ditimbang untuk mengetahui perbandingan hasil timbangan yang diperoleh setiap ekstrak. Hasil rendemen ekstrak etanol 95% bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Rendemen ekstrak bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi

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

Tabel 4.1 menunjukkan rendemen bekatul terfermentasi dengan *Rhizopus oryzae* lebih besar dibandingkan rendemen sampel tanpa fermentasi. Hal tersebut dimungkinkan pada proses fermentasi senyawa bioaktif yang terikat pada serat kasar terputus karena adanya enzim selulase, sehingga senyawa antioksidan terekstrak secara maksimal. Hasil ini sesuai dengan penelitian Fikriyah (2018) yang menunjukkan bahwa rendemen tertinggi diperoleh pada ekstrak bekatul terfermentasi 5 hari menggunakan *Rhizopus oryzae* yaitu sebesar 12,33% dibandingkan ekstrak bekatul tanpa fermentasi yaitu 8,46%.

4.6 Uji Fitokimia Ekstrak Bekatul

Senyawa fitokimia merupakan senyawa bioaktif metabolit sekunder yang diproduksi tumbuhan sebagai salah satu cara untuk kelangsungan hidupnya atau sebagai alat pertahanan diri. Uji fitokimia yang dilakukan pada penelitian ini adalah uji alkaloid, saponin, terpenoid/steroid, alkaloid, dan fenolik. Tahap yang

dilakukan yaitu mengambil ekstrak bekatul dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan reagen yang sesuai dengan senyawa aktif yang diidentifikasi. Hasil uji fitokimia dari ekstrak bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil uji fitokimia ekstrak bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi

Analisis	Hasil Uji Ekstrak Bekatul		Warna Sampel
	Bekatul Tanpa Fermentasi (Kontrol)	Bekatul Terfermentasi 5 Hari	
Flavonoid	+	++	Kekuningan
Saponin	-	-	Tidak terbentuk busa
Steroid	++	+++	Hijau
Terpenoid	+	++	Coklat
Alkaloid	Dragendorff	+++	Endapan jingga
	Mayer	+++	Kekuningan
Fenolik	+	+++	Kuning Kemerahan
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	

Berdasarkan Tabel 4.2 menunjukkan hasil uji fitokimia ekstrak bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi positif mengandung senyawa flavonoid, steroid/terpenoid, alkaloid dan fenolik. Ekstrak bekatul terfermentasi menghasilkan perubahan warna yang lebih pekat yang menunjukkan kandungan senyawa aktif pada ekstrak bekatul terfermentasi lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak bekatul tanpa fermentasi. Aruben (2016) menyatakan bahwa pada proses fermentasi jamur *Rhizopus oryzae* menghasilkan enzim selulase yang mampu membuka serat selulosa pada bekatul sehingga terjadi penurunan serat yang mengakibatkan senyawa antioksidan yang didapat lebih banyak. Hasil ini

sesuai dengan Prabhu dkk. (2014) yang menyatakan kandungan senyawa polifenol dan flavonoid meningkat sebesar 24% dan 18% setelah di fermentasi selama 48 jam.

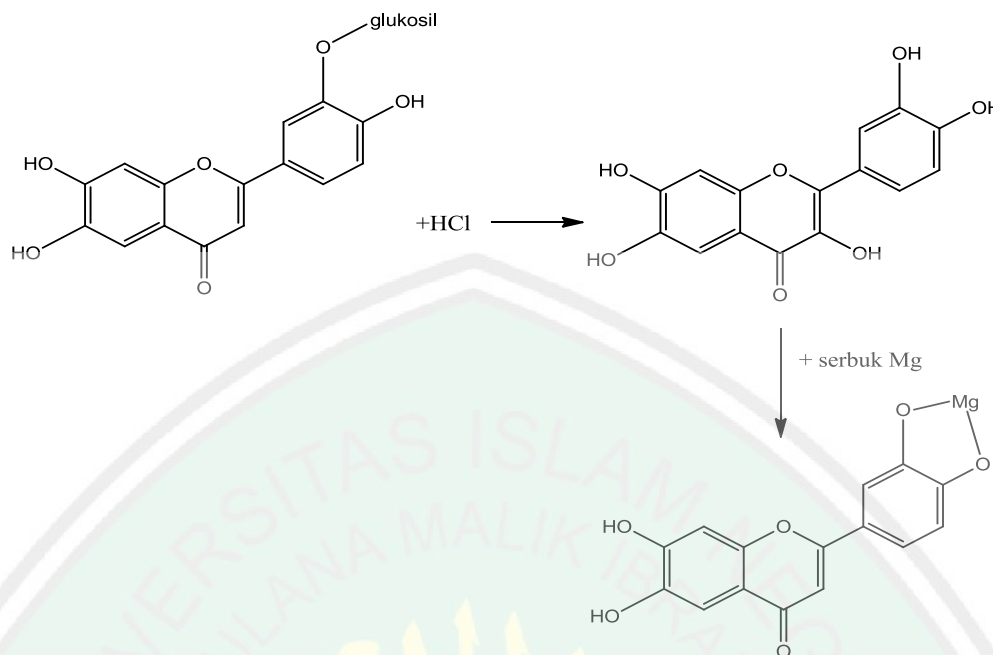
Identifikasi senyawa saponin tidak menunjukkan hasil positif karena buih yang terbentuk setelah pengocokan tidak bertahan lama, hanya bertahan beberapa detik. Saponin bersifat polar (dapat larut dalam air) dan non polar karena memiliki gugus hidrofob yaitu aglikon (sapogenin). Busa yang dihasilkan pada uji saponin disebabkan karena adanya glikosida yang dapat membentuk busa dalam air dan terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Sangi dkk, 2008).

4.6.1 Kandungan Senyawa Flavonoid

Skrining fitokimia untuk mengidentifikasi kandungan flavonoid diuji dengan penambahan HCl pekat yang berfungsi untuk menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya, yaitu menghidrolisis O-glikosil dan logam Mg untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat dalam senyawa flavonoid sehingga terbentuk warna merah tua jingga pada senyawa tersebut. Reduksi dengan Mg dan HCl pekat menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah atau jingga pada flavonol, flavon, flavononol, dan xanton (Robinson, 1985).

Hasil uji fitokimia menunjukkan ekstrak bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi menunjukkan adanya warna kekuningan yang mengindikasikan positif uji flavonoid. Ekstrak bekatul terfermentasi menunjukkan perubahan warna kekuningan yang lebih pekat dibandingkan dengan ekstrak bekatul tanpa fermentasi yang mengindikasikan senyawa flavonoid pada ekstrak bekatul terfermentasi lebih banyak dibandingkan pada ekstrak bekatul tanpa fermentasi.

Reaksi dugaan flavonoid dengan serbuk Mg ditunjukkan pada Gambar 4.3.



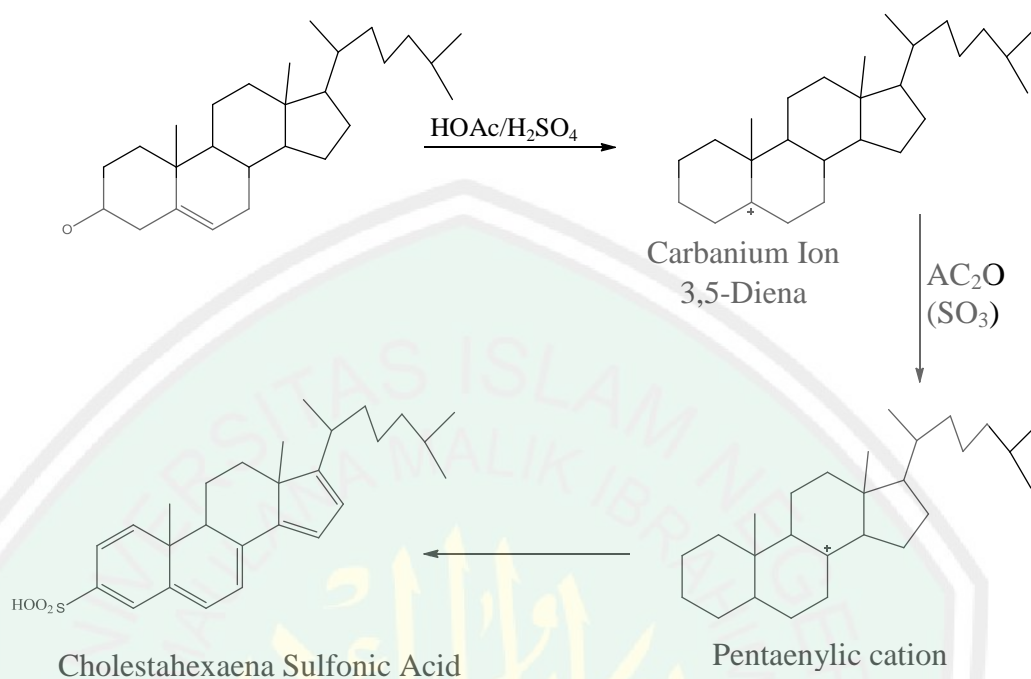
Gambar 4.3 Reaksi dugaan flavonoid dengan serbuk Mg (Arum dkk, 2012)

4.6.2 Kandungan Senyawa Steroid dan Terpenoid

Skринing fitokimia untuk menganalisis kandungan steroid/terpenoid diuji dengan menggunakan metode Liebermann-Buchard dengan pereaksi asetat anhidrat dan penambahan H_2SO_4 pekat yang bertujuan untuk mendekstruksi kompleks steroid (Harborne, 1984).

Kandungan steroid dan terpenoid dapat dideteksi berdasarkan perubahan warna akibat pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi pada golongan senyawa steroid atau terpenoid. Reaksi diawali dengan proses asetilasi gugus hidroksil oleh asetat anhidrat. 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 coklat. Reaksi dugaan yang terjadi ditunjukkan pada Gambar 4.4.



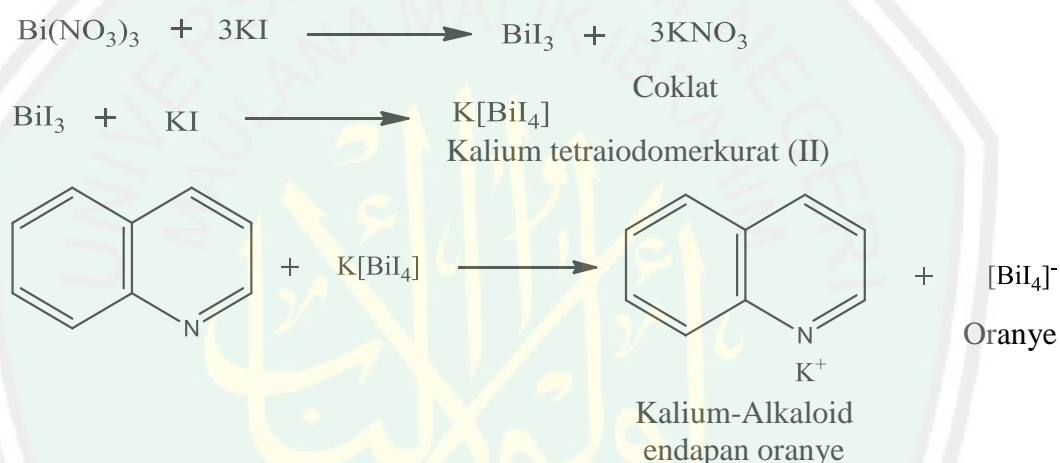
Gambar 4.4 Reaksi dugaan senyawa steroid/terpenoid dengan pereaksi Liebermann-burchard

Hasil pengujian fitokimia menunjukkan ekstrak bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi positif uji terpenoid dengan adanya cincin coklat diantara dua larutan dan positif steroid dengan terbentuknya lapisan hijau. Friedman (2014) menyatakan bahwa bekatul mengandung beberapa jenis steroid diantaranya tokotrienol, tokoferol, β -sitosterol ferulat, γ -oryzanol, dan sikloartenol ferulat. Ekstrak bekatul terfermentasi menunjukkan terbentuknya cincin coklat dan lapisan hijau yang lebih pekat dibandingkan dengan ekstrak bekatul tanpa fermentasi.

4.6.3 Kandungan Senyawa Alkaloid

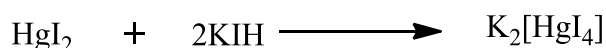
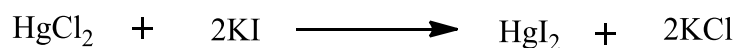
Senyawa alkaloid dengan uji Dragendorff ditandai dengan endapan jingga kecoklatan. Endapan tersebut merupakan kalium-alkaloid. Reagen Dragendorff

terbuat dari bismut nitrat yang dilarutkan dalam HCl agar keseimbangan tidak bergeser ke arah kiri sehingga bismut nitrat tidak terhidrolisis menjadi bismutil (BiO^+) (Vogel, 1987). 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^+ . Kedua ekstrak menghasilkan endapan jingga yang mengindikasikan positif uji alkaloid. Reaksi dugaan yang terbentuk ditunjukkan pada Gambar 4.5.

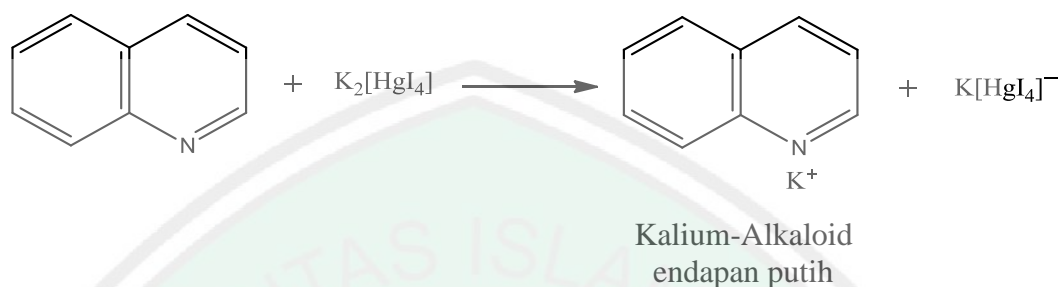


Gambar 4.5 Reaksi dugaan reagen Dragendorff dengan alkaloid (Nafisah, 2014)

Senyawa alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas untuk mengganti ion iodo dalam reagen tersebut sehingga membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan ion logam (Agustina, 2017). Pada uji alkaloid dengan reagen Mayer atom nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Agustina, 2018). Kedua ekstrak memberikan hasil positif dengan terbentuknya endapan. Reaksi dugaan antara reagen Mayer dan alkaloid ditunjukkan pada Gambar 4.6.



Kalium tetraiodomerkurat (II)



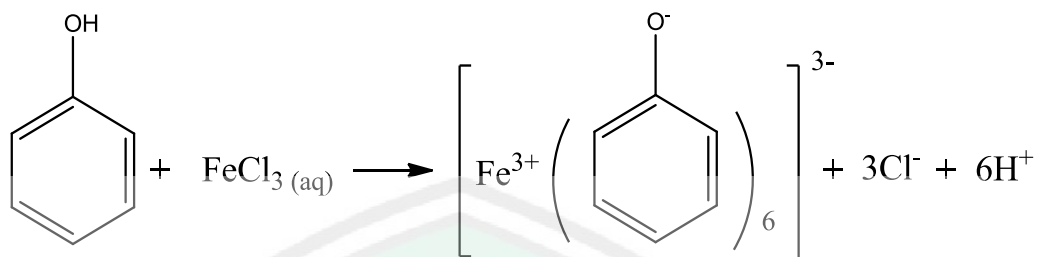
Gambar 4.6 Reaksi dugaan reagen mayer dengan alkaloid
(Agustina, 2018)

Uji alkaloid menggunakan reaksi Mayer dan Dragendorff menunjukkan hasil positif pada ekstrak bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi. Warna yang terbentuk pada kedua ekstrak menunjukkan kepekatan yang sama. Hasil ini sesuai dengan penelitian Sholeha (2019) yang menyatakan bahwa ekstrak bekatul positif mengandung senyawa alkaloid.

4.6.4 Kandungan Senyawa Fenolik

Senyawa fenolik pada ekstrak bekatul dilarutkan dalam air dan direaksikan dengan FeCl_3 . Senyawa fenolik membentuk kompleks dengan pewarnaan biru atau biru ungu dengan besi (III) klorida. Kompleks yang terbentuk merupakan besi (III) heksafenolat, sehingga uji ini memberikan indikasi gugus OH aromatik. Ion Fe^{3+} mengalami hibridisasi orbital d^2sp^3 dimana berdasarkan hasil hibridisasi ion Fe^{3+} ($4s^03d^5$) memiliki 6 orbital kosong yang diisi oleh pendonor pasangan elektron yang berasal dari atom oksigen pada senyawa fenolik yang memiliki elektron bebas (Marliana, 2011). Uji positif ditunjukkan dengan perubahan warna

hijau, merah, coklat, ungu, biru, dan hitam (Harborne, 1987). Reaksi dugaan ditunjukkan pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Reaksi dugaan antara reagen FeCl_3 dengan fenol (Arum dkk, 2012)

Uji fenolik menggunakan reagen FeCl_3 menunjukkan hasil positif pada ekstrak bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi dengan perubahan warna kuning kemerahan. Warna yang terbentuk pada ekstrak bekatul terfermentasi lebih pekat dibandingkan ekstrak bekatul tanpa fermentasi. Hasil ini sesuai dengan penelitian Rashid dkk. (2015) yang melaporkan bahwa kandungan senyawa fenolik pada bekatul meningkat sebesar $8,56 \mu\text{g/mL}$ dari $6,19 \mu\text{g/mL}$ akibat degradasi senyawa fenolik oleh enzim β -glukosidasi.

4.7 Pengaruh Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi pada Mencit Diabetes Mellitus

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba pada penelitian ini adalah mencit putih jantan galur Balb/C. Mencit jantan secara hormonal lebih stabil dan tidak dipengaruhi oleh hormon estrogen yang dapat memicu efek stres serta tidak mengalami fase estrus yang mengakibatkan peningkatan kadar glukosa darah (Yusuf dkk, 2019). Aklimatisasi mencit dilakukan selama satu minggu untuk mengadaptasikan hewan coba dengan lingkungan baru. Secara keseluruhan rata-rata berat badan mencit sebelum

aklimatisasi adalah 15-18 gram dan setelah diaklimatisasi mengalami peningkatan sebesar 17-22 gram.

Tabel 4.3 Rata-rata perubahan berat badan mencit sebelum dan setelah aklimatisasi

Kelompok	Berat Badan Mencit (gram)	
	Sebelum Aklimatisasi	Setelah Aklimatisasi
KN	16,7	17,2
K-	18,7	22,27
BNF 100	15,9	19,97
BNF 200	16,7	18,5
BF 100	16,07	17,43
BF 200	16,63	20,4

KN:kontrol normal;K-:kontrol negatif (Na-CMC);BNF 100:bekatul tanpafermentasi dosis 100 mg/kg BB;BNF 200:bekatul tanpafermentasi dosis 200 mg/kg BB BF 100: bekatul fermentasi dosis 100 mg/kg BB;BF 200:bekatul fermentasi dosis 200 mg/kg BB

Berat badan mencit setelah aklimatisasi pada semua kelompok perlakuan mengalami kenaikan. Hal ini disebabkan adanya asupan nutrisi dari pakan dan minuman yang diberikan secara terus menerus. Asupan nutrisi tersebut menjadi simpanan lemak berlebih dalam bentuk triasilgliserol pada sel-sel adiposit yang digunakan untuk kebutuhan energi tubuh (Rias, 2017). Susanty dkk. (2014) menyatakan hewan uji dinyatakan sehat apabila tidak menunjukkan deviasi berat badan (>10%). Rakmadi dkk. (2009) melaporkan peningkatan berat badan terjadi karena adanya peningkatan aktivitas makan dari masing-masing mencit selama masa aklimatisasi dan merupakan indikasi mencit telah beradaptasi dengan lingkungannya dan siap digunakan sebagai hewan percobaan.

Pengukuran kadar glukosa darah mencit dilakukan setelah proses aklimatisasi untuk memastikan bahwa mencit dalam keadaan normal. Mencit dikelompokkan menjadi 6 kelompok. Kelompok kontrol normal (KN) adalah kelompok yang tidak diinduksi aloksan untuk mengetahui kadar glukosa darah normal. Kelompok

negatif (-) adalah kelompok mencit yang diinduksi aloksan dengan terapi Na-CMC. Kelompok BNF 100 dan 200 adalah kelompok mencit diabetes dan diberikan terapi ekstrak bekatul tanpa fermentasi dosis 100 dan 200 mg/kg BB. Kelompok BF 100 dan 200 adalah kelompok mencit diabetes dan diberikan terapi ekstrak bekatul terfermentasi dosis 100 dan 200 mg/kg BB.

4.7.2 Pengkondisian Mencit Diabetes Mellitus

Hewan coba dikondisikan diabetes dengan induksi larutan aloksan. Aloksan merupakan agen diabetogenik yang diperantarai oleh oksidasi senyawa dengan gugus SH, penghambatan glukokinase, pembentukan oksigen reaktif dan gangguan homeostatis ion kalsium intraseluler (Nugroho, 2006). Aloksan menyebabkan penurunan glikogen hepatic dalam 24-72 jam dan efek sitotoksiknya dapat merusak sel β pankreas sehingga terjadi penurunan kadar insulin (Husna dkk, 2019).

Induksi aloksan dilakukan secara intraperitoneal yaitu pada daerah rongga abdomen yang sejajar dengan kaki. Hal ini memungkinkan aloksan dengan cepat menembus membran plasma memasuki sel β melalui perantara glukosa transporter GLUT2 (Lenzen, 2008). Dosis aloksan yang diberikan yaitu 200mg/kg BB karena dapat meningkatkan kadar glukosa darah pada mencit dengan induksi secara intraperitoneal (Song dkk, 2007).

Kondisi diabetes pada mencit dapat diketahui dengan mengukur kadar glukosa darah menggunakan glukometer strip. Prinsip pemeriksaan pada metode ini adalah strip test diletakkan pada alat, ketika darah diteteskan pada zona reaksi tes strip, katalisator glukosa akan mereduksi glukosa dalam darah. Intensitas dari

elektron yang terbentuk dalam alat setara dengan konsentrasi glukosa dalam darah (Nugroho, 2006). Penginjeksian aloksan dilakukan pada mencit kontrol negatif dan kelompok perlakuan terapi. Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa setelah induksi aloksan kemudian ditunggu selama 7 hari mencit belum mengalami gejala diabetes dengan kadar gula darah <200 mg/dL. Sehingga dilakukan injeksi aloksan tahap kedua dengan dosis yang sama. Sebagian mencit mengalami gejala diabetes yang ditandai dengan kadar glukosa >200 mg/dL. Mencit yang belum mengalami gejala diabetes diinjeksi ulang dengan dosis yang sama sampai keseluruhan kadar glukosa darah mencit >200 mg/dL (Lampiran 7). Proses induksi aloksan dilakukan sebanyak 3 kali dengan dosis sama yaitu 200 mg/KgBB. Daya tahan tubuh mencit yang berbeda terhadap aloksan menyebabkan kondisi awal keadaan diabetes tidak seragam (Suarsana dkk, 2010). Pada kondisi genetik dan internal hewan yang stabil mengakibatkan mekanisme kerja reseptor aloksan berjalan lambat untuk merusak sel β pankreas sehingga tidak terjadi peningkatan kadar glukosa darah (Kendran dkk, 2013).

4.7.3 Terapi Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi pada Mencit Diabetes Mellitus

Perlakuan terapi pada mencit diabetes dilakukan dengan metode sonde atau biasa disebut oral. Terapi diberikan selama 19 hari dengan pengamatan berat badan, kadar glukosa darah dan jumlah sel hepatosit normal pada mencit. Ekstrak bekatul tidak larut sempurna dalam air sehingga disuspensikan dalam Na CMC 0,5% (b/v). Agen pensuspensi Na CMC dipilih karena menghasilkan suspensi yang stabil, memiliki kejernihan tinggi, dan bersifat inert (Susanty dkk, 2014).

Dosis ekstrak bekatul yang digunakan adalah 100 dan 200 mg/kg BB. Wahyuni dkk. (2016) menyatakan bahwa terapi ekstrak bekatul beras hitam dosis 100 dan 200 mg/kg BB dapat menurunkan kadar glukosa darah tikus dari 400 dan 458 mg/dL hingga mencapai kadar glukosa darah normal sebesar 139 dan 131 mg/dL.

4.7.3.1 Perubahan Berat Badan Mencit Diabetes Mellitus Setelah Terapi

Penderita diabetes mellitus mengalami defisiensi insulin yang mengakibatkan glukosa dalam tubuh tidak tersedia sehingga terjadi glukoneogenesis berlebihan pada sel-sel hati sehingga meningkatkan produksi glukosa, mengganggu penggunaan glukosa dalam jaringan otot serta lemak yang mengakibatkan terjadinya pengurangan jaringan otot dan adiposa yang mengarah pada penurunan berat badan (Rias, 2017). Perubahan berat badan mencit diamati setiap 3 hari sekali selama perlakuan terapi ekstrak bekatul. Adapun rata-rata perubahan berat badan mencit (*Mus musculus* L) setelah terapi ekstrak bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi ditunjukkan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Perubahan berat badan mencit diabetes setelah terapi

Kelompok Perlakuan	Berat Badan Mencit (gram) Hari ke-						
	0	3	6	9	12	15	18
KN	17,2	23,17	24,97	25,47	25,3	28,27	26,63
K-	22,5	20,27	21,83	23,17	24,77	25,37	27,07
BNF 100	23,47	22,77	23,7	24,1	25,43	25,1	24,87
BNF 200	18,77	18,23	20,23	19,37	19,57	21	20,23
BF 100	19,57	19,87	20,27	17,23	18,8	19,5	18,17
BF 200	21,57	20,7	21,6	20,37	21,13	22,13	22,43

KN:kontrol normal;K-kontrol negatif (Na-CMC);BNF 100:bekatul tanpafermentasi dosis 100 mg/kg BB;BNF 200:bekatul tanpafermentasi dosis 200 mg/kgBB;BF 100: bekatul fermentasi dosis 100 mg/kg BB;BF 200:bekatul fermentasi dosis 200 mg/kg BB

Berat badan pada kontrol negatif (K-) terus mengalami peningkatan seperti pada kontrol normal. Hal ini dikarenakan mencit tidak mengalami penurunan selera makan sehingga asupan nutrisi masuk secara terus menerus dan mengakibatkan berlebihnya simpanan lemak dalam bentuk triasilgliserol yang dapat melindungi tubuh dari efek toksik.

Hari ke-3 terjadi penurunan berat badan pada kelompok perlakuan terapi ekstrak bekatul. Kondisi diabetes menyebabkan tubuh tidak dapat memanfaatkan glukosa sebagai sumber energi secara maksimal sehingga membongkar cadangan energi dari protein dan lemak tubuh. Katabolisme lemak dan protein secara berlebihan menyebabkan terjadinya pengurangan jumlah jaringan otot dan jaringan adiposa secara signifikan sehingga menyebabkan penurunan berat badan (Rias, 2017). Hari ke-6 sampai ke-18 perubahan berat badan kelompok perlakuan terapi ekstrak bekatul relatif berubah-ubah. Peningkatan berat badan pada kelompok perlakuan terapi ekstrak bekatul terjadi pada hari ke-6. Hal ini disebabkan karena kandungan senyawa flavonoid pada ekstrak bekatul. Senyawa flavonoid bekerja sebagai *radical scavenger* dengan menekan reaktivitas radikal bebas dan membentuk molekul yang lebih stabil (Rahmawati, 2014). Flavonoid juga berfungsi merangsang sekresi insulin yang dapat mengaktifkan sensitifitas insulin terhadap kinerja GLUT-4 untuk mengangkut glukosa dari darah menuju ke sel otot, adiposa dan sel-sel lain sehingga mengakibatkan peningkatan berat badan (Sherwood, 2004).

4.7.3.2 Penurunan Kadar Glukosa Darah Mencit Diabetes Mellitus

Kadar glukosa darah puasa diukur untuk menghindari pengaruh makanan yang dapat meningkatkan kadar glukosa darah pada mencit. Rata-rata kadar glukosa darah (mg/dL) mencit pada hari ke-1 sampai hari ke-19 dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Kadar glukosa darah mencit diabetes setelah terapi

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Kadar Glukosa Darah (mg/dL) hari ke-						% Penurunan Kadar Glukosa Darah
	0	1	7	11	15	19	
KN	118	118	152	94	91	126	-8,57
K-	149	415	368	384	285	440	-14,65
BNF 100	126	273	202	212	307	242	11,65
BNF 200	137	414	164	328	310	241	42,24
BF 100	142	278	136	171	263	135	49,14
BF 200	144	491	235	355	265	414	14,14

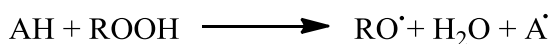
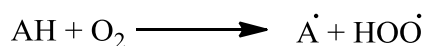
KN:kontrol normal;K-:kontrol negatif (Na-CMC);BNF 100:bekatul tanpafermentasi dosis 100 mg/kg BB;BNF 200:bekatul tanpafermentasi dosis 200 mg/kg BB BF 100: bekatul fermentasi dosis 100 mg/kg BB;BF 200:bekatul fermentasi dosis 200 mg/kg BB

Terapi ekstrak bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi pada kelompok mencit diabetes menunjukkan adanya penurunan kadar glukosa darah. Kelompok perlakuan terapi ekstrak bekatul tanpa fermentasi dosis 100 mg/KgBB (BNF 100) dan 200 mg/KgBB (BNF 200) menunjukkan penurunan kadar glukosa darah sebesar 11,65% (dari 273 mg/dL menjadi 242 mg/dL) dan 42,24% (dari 414 mg/dL menjadi 241 mg/dL).

Penurunan kadar glukosa darah tertinggi ditunjukkan kelompok terapi ekstrak bekatul terfermentasi dosis 100 mg/KgBB (BF 100) yaitu 49,14% dimana kadar glukosa darah mencapai kadar glukosa darah normal sebesar 135 mg/dL. Penurunan kadar glukosa darah dipengaruhi oleh senyawa antioksidan pada

bekatul. Senyawa antioksidan tersebut diantaranya golongan flavonoid, alkaloid dan steroid/terpenoid. Senyawa flavonoid memiliki efek hipoglikemik dengan mengurangi penyerapan glukosa dan mengatur aktivitas ekspresi enzim yang terlibat dalam metabolisme karbohidrat (Brahmachari, 2011). Flavonoid juga mampu meregenerasi sel β pankreas dan membantu merangsang sekresi insulin (Dheer, 2010). Aktivitas senyawa antioksidan pada bekatul meningkat setelah proses fermentasi sehingga memaksimalkan perannya dalam penurunan kadar glukosa darah. Oliveira dkk. (2012) menyatakan bahwa proses fermentasi dapat meningkatkan senyawa bioaktif pada bekatul yang disebabkan kemampuan kapang mendegradasi senyawa antioksidan yang menempel pada matriks lignoselulosa dan polisakarida secara enzimatik. Hasil ini sesuai dengan Lim dan Boo (2010) yang menyatakan produk fermentasi bekatul dan kedelai menggunakan *Bacillus sp.* lebih efektif dalam menurunkan kadar glukosa darah mencit diabetes sebesar 186 mg/dL dari 394 mg/dL.

Kelompok terapi ekstrak bekatul terfermentasi dosis 200 mg/KgBB (BF 200) menunjukkan penurunan kadar glukosa darah yang paling rendah sebesar 14,14% (dari 491 mg/dL menjadi 414 mg/dL). Hal ini dimungkinkan karena aktivitas ekstrak bekatul yang merupakan campuran multikomponen tidak bekerja secara sinergis sehingga aktivitasnya sebagai antioksidan berubah menjadi prooksidan. Gordon (1990) menyatakan bahwa dosis yang terlalu tinggi memungkinkan terjadinya penghambatan respon dan terjadi prooksidasi terhadap senyawa antioksidan dalam ekstrak oleh antioksidan dalam tubuh. Besar konsentrasi antioksidan yang ditambahkan dapat berpengaruh pada laju oksidasi (Suryani, 2013). Adapun reaksi prooksidan yang terjadi ditunjukkan pada Gambar 4.8.



Gambar 4.8 Reaksi prooksidan. AH:antioksidan, A[•]: radikal antioksidan, HOO[•]: radikal hedroperoksida, ROOH:hiperoksida, RO[•]: radikal bebas (Gordon, 1993)

Aktivitas antioksidan pada konsentrasi tinggi mengubah fungsinya menjadi prooksidan yang dapat merusak sel sebagai radikal bebas. Suryani (2013) melaporkan terapi ekstrak biji mahoni dosis 250 mg/kgBB dapat menurunkan kadar glukosa darah tikus diabetes lebih baik sebesar 110 mg/dL dibandingkan pada terapi dosis 400 mg/kgBB sebesar 152 mg/dL.

4.7.4 Pengaruh Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi pada Histologi Hepar Mencit Diabetes Mellitus

Hepar berperan dalam menjaga homeostatik pengaturan kadar glukosa dalam darah dan bertanggung jawab terhadap biotransformasi zat-zat berbahaya menjadi zat-zat yang tidak berbahaya. Proses ini menyebabkan hepar mudah mengalami kerusakan baik berupa kerusakan struktur sel maupun gangguan fungsi pada hepar. Zat kimia yang terlalu banyak dalam parenkim hati mengakibatkan kerusakan sel hepar, seperti infiltrasi sel radang, degenerasi melemak, piknosis dan kongesti (Guyton, 1997). Kerusakan pada organ hepar mengakibatkan penumpukan radikal bebas yang dapat memperburuk kondisi hiperglikemia.

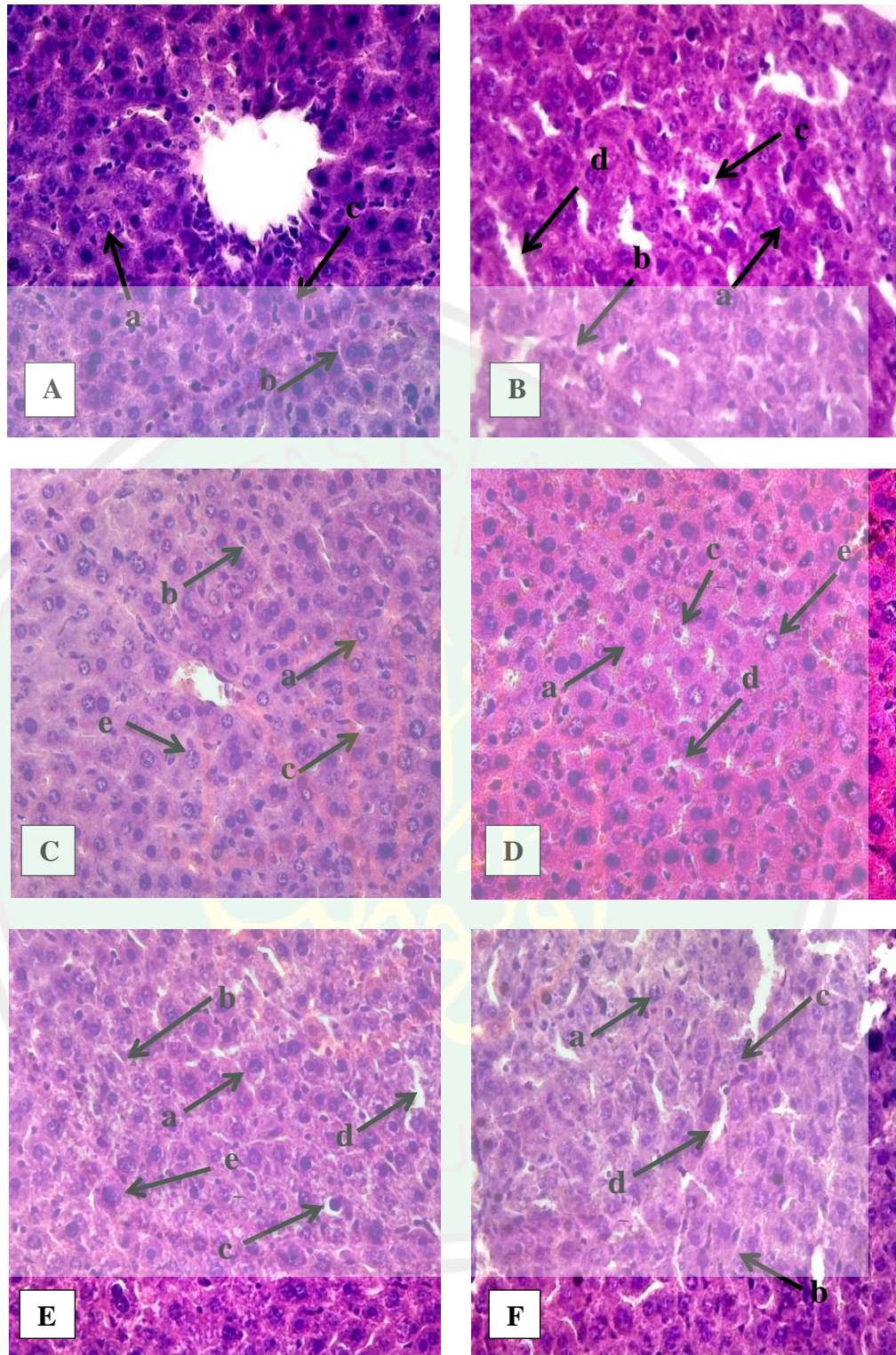
Organ hepar diambil setelah 19 hari terapi (hari ke-20). Preparat histologi dibuat dengan metode blok parafin dengan pewarnaan Hematoksilin-eosin.

Kerusakan pada preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x.

4.7.4.1 Pengaruh Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi pada Sel Hepatosit Mencit Diabetes Mellitus

Hepatosit merupakan sel yang menyusun sebagian besar organ hepar dan bertanggung jawab terhadap peran sentral hepar dalam proses metabolisme. Hepatosit normal memiliki sel berbentuk polihedral dengan membran sel yang jelas dengan inti bulat di tengah. Sel hepatosit berderet secara radier dalam lobulus hepar dan membentuk lapisan 1-2 sel serupa dengan susunan bata. Lempeng sel inti mengarah dari tepian lobulus ke pusatnya dan beranastomosis secara bebas membentuk labirin dan busa serta memiliki celah diantara lempeng-lempeng tersebut yaitu sinusoid (Nugraha, 2018). Sinusoid hepar merupakan saluran yang berliku-liku dengan diameter tidak teratur dan dilapisi sel endotel bertingkat yang tidak utuh (Maulina, 2018). Sinusoid dipisahkan dari hepatosit dibawahnya oleh spatium perisinusoideum subendotelial, selain itu struktur dan jalur sinusoid yang berliku di hepar memungkinkan terjadinya pertukaran zat yang efisien antara hepatosit dan darah (Eroschenko, 2012).

Kerusakan sel hepatosit ditandai dengan terjadinya degenerasi sel hepatosit. Degenerasi merupakan tanda awal kerusakan sel hepar yang ditunjukkan dengan adanya sel hepar berwarna lebih gelap dan mengalami pembengkakan. Degenerasi yang terjadi secara terus menerus dapat mengakibatkan kerusakan sel berupa nekrosis (kematian sel). Nekrosis diawali dengan perubahan inti sel berupa piknosis (menghitam) kemudian inti pecah (karioheksis) dan inti menghilang (kariolisis) (Prasetyo dkk, 2019).



Gambar 4.9 Histologi Hepar Mencit Setelah Terapi Ekstrak Bekatul (perbesaran 400x, pewarnaan HE). A. KN, B. K-, C. BNF 100, D. BNF 200, E. BF 100, F. BF 200, keterangan: a. hepatosit normal, b. sinusoid, c. nekrosis, d. dilatasi sinusoid, e. degenerasi sel hepatosit

Tabel 4.6 Jumlah sel hepatosit setelah terapi ekstrak bekatul

Kelompok Perlakuan	Rata- rata Jumlah Sel Hepatosit		% Kerusakan Sel
	Normal	Nekrosis	
KN	60	30	0,5
K-	11	73	6,6
BNF 100	11	45	4,9
BNF 200	29	41	1,4
BF 100	30	31	1,0
BF 200	25	58	2,3

KN:kontrol normal;K-:kontrol negatif (Na-CMC);BNF 100:bekatul tanpa fermentasi dosis 100 mg/kg BB;BNF 200:bekatul tanpa fermentasi dosis 200 mg/kg BB BF 100: bekatul fermentasi dosis 100 mg/kg BB;BF 200:bekatul fermentasi dosis 200 mg/kg BB

Berdasarkan Tabel 4.6 diketahui bahwa jumlah sel hepatosit normal pada kontrol normal (KN) lebih banyak dibandingkan pada kontrol negatif (K-) dan kelompok perlakuan terapi. Jumlah sel hepatosit normal pada kelompok KN sebanyak 60 sel dengan tingkat kerusakan sel (nekrosis) sebesar 0,5%. Sinusoid pada kelompok KN terlihat normal, beraturan dan tidak mengalami pelebaran. Kelompok kontrol negatif (K-) menunjukkan jumlah sel hepatosit normal yaitu 11 sel dengan tingkat kerusakan sel sebesar 6,6%. Sinusoid mulai terlihat tidak beraturan dan mengalami dilatasi. Menurut Surasa dkk. (2014) menyatakan bahwa sel hepatosit dan sinusoid dibatasi oleh celah subendotel yang mengandung mikrovili dari sel hepatosit, hal ini memudahkan terjadinya kontak langsung antara sel hepatosit dan sinusoid sehingga adanya penyaluran aliran darah yang kuat dan rusaknya sel hepatosit akibat senyawa toksik dapat mengakibatkan terjadinya pelebaran sinusoid.

Kelompok terapi ekstrak bekatul tanpa fermentasi dosis 100 mg/KgBB (BNF 100) menunjukkan jumlah sel hepatosit normal yaitu 11 sel dengan tingkat kerusakan sel sebesar 4,9%. Kerusakan sel berupa nekrosis ditandai dengan edema sel (pembengkakan sel). Pembengkakan sel terjadi karena muatan elektrolit

di luar dan di dalam sel tidak seimbang yang menyebabkan masuknya cairan ekstraseluler ke dalam sel dan sel tidak mampu memompa ion natrium ke luar sehingga sel akan mengeluarkan materi sel yang mengakibatkan kematian sel (nekrosis) (Sukarni, 2012).

Terapi ekstrak bekatul tanpa fermentasi dosis 200 mg/KgBB (BNF 200) dan ekstrak bekatul terfermentasi dosis 100 mg/KgBB (BF 100) pada mencit diabetes menunjukkan perbaikan sel hepatosit sebanyak 29 sel dan 30 sel dengan tingkat kerusakan sel berturut-turut 1,4% dan 1,0%. Hasil ini lebih efektif dibandingkan Rarangsari (2015) yang menyatakan perbaikan sel hepar mencit diabetes ditunjukkan kelompok terapi ekstrak daun sirsak dosis 150 mg/Kg BB selama 30 hari. Perbaikan sel hepatosit dimungkinkan karena adanya kandungan senyawa antioksidan yang meningkat setelah proses fermentasi sehingga menghasilkan perbaikan sel hepar lebih baik dibandingkan terapi ekstrak bekatul tanpa fermentasi. Senyawa flavonoid dalam ekstrak bekatul berperan sebagai anti hepatotoksik yang melindungi sel hepar dari zat-zat toksik, memperbaiki jaringan sel hepar dengan cara detoksifikasi senyawa racun dan meningkatkan regenerasi sel hepar (Sulistianto dkk, 2004). Arif (2016) juga menyatakan bahwa pemberian terapi infusa buah pare yang mengandung senyawa triterpenoid mampu meningkatkan jumlah sel hepatosit normal pada tikus diabetes sebesar 5,6 sel daripada kontrol diabetes sebesar 3 unit sel. Faddladdeen dkk. (2020) menyatakan bahwa perbaikan sel hepatosit tikus diabetes dapat menurunkan kadar glukosa darah tikus diabetes.

Perlakuan terapi ekstrak bekatul terfermentasi dosis 200 mg/KgBB (BF 200) menunjukkan jumlah sel hepatosit normal yaitu 25 sel dengan tingkat kerusakan

2,3%. Sinusoid terlihat tidak beraturan dan mengalami dilatasi (pelebaran). Sel hepatosit mengalami degenerasi yang mengakibatkan terjadinya perubahan susunan sel selain itu ketidakteraturan sinusoid disebabkan oleh peroksidasi lipid dan stress oksidatif akibat kondisi hiperglikemia (Paramita, 2019). Proses fermentasi menyebabkan peningkatan aktivitas antioksidan pada terapi ekstrak terfermentasi dosis tinggi. Hal ini menyebabkan senyawa antioksidan berubah menjadi prooksidan. yang dapat merusak sel.

Data sel hepatosit yang diperoleh diolah secara statistik menggunakan uji normalitas (Uji Saphiro Wilk) dan uji homogenitas dan dilanjutkan dengan analisis statistik *One Way ANOVA*. Dalam penelitian ini menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen dengan taraf signifikansi lebih besar dari 0,05 (Lampiran 7) sehingga dilanjutkan dengan analisis statistik *One Way ANOVA*. Adapun hasil analisis dari uji ANOVA dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Hasil Analisis ANOVA Jumlah Sel Hepatosit Normal

SK	JK	Db	KT	F _{hitung}	F _{tabel}	Sig.
Perlakuan	4139.167	5	827.833	1.770	3,11	.194
Galat	5611.333	12	467.611			
Total	9750.500	17				

Berdasarkan Tabel 4.7 hasil analisis ANOVA dengan taraf signifikansi α 5% didapatkan nilai signifikansi $0,000 > 0,05$ dan nilai $F_{hitung} (1,883) < F_{tabel} (3,11)$, sehingga H_0 diterima. Hal tersebut menunjukkan tidak adanya pengaruh terapi ekstrak bekatul terhadap perbaikan sel hepatosit mencit diabetes. Senyawa aktif pada ekstrak bekatul diasumsikan lebih terfokus dalam menyeimbangkan ion radikal dan menstimulasi hormon insulin untuk menurunkan kadar glukosa darah.

Sehingga perbaikan sel hepatosit pada mencit diabetes tidak sebanding dengan penurunan kadar glukosa darah.

4.8 Pemanfaatan Bekatul dalam Perspektif Islam

Allah SWT menciptakan alam semesta beserta isinya untuk mencukupi kehidupan manusia. Manusia diciptakan dengan akal untuk berfikir dan merenungi nikmat beserta kekuasaan Allah SWT dengan cara memanfaatkannya secara maksimal. Allah berfirman dalam surat Ali Imron ayat 190-191:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

“Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan pergantian malam dan siang terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang berakal (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): “Ya Tuhan kami Tiadalah Engkau menciptakan semua ini sia-sia, Maha Suci Engkau, lindungilah Kami dari azab neraka.” QS. Ali Imron ayat 190-191.

Lafadz لآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ menunjukkan salah satu fungsi akal yang diberikan yaitu untuk merenungi tanda-tanda yang diberikan oleh Allah SWT (Quthb, 2001). Seseorang yang mau menggunakan akal pikirannya untuk berfikir dan memahami akan selalu bersyukur dengan nikmat yang telah Allah SWT berikan. Sebagaimana yang dinyatakan dalam Al-Qur’an surat Ar Rahman ayat 12:

وَالْحَبُّ ذُو الْعَصْفِ وَالرَّيْحَانُ ﴿١٢﴾

“Dan biji-bijian yang berkulit dan bunga-bunga yang harum baunya”. Q.S. Ar Rahman ayat 12.

Ayat diatas menerangkan bahwa Allah SWT menciptakan tumbuhan yang merekah dengan biji-bijian yang mempunyai bulir dan daun yang melilit pada batangnya. Biji-biji tersebut seperti halnya padi yang akan menghasilkan beras dan bekatul. Bekatul merupakan limbah dari penggilingan padi yang memiliki potensi sebagai obat penyakit diabetes mellitus. Berdasarkan hasil penelitian bekatul mengandung senyawa antioksidan yang berperan sebagai antidiabetes diantaranya senyawa alkaloid, flavonoid, fenol, steroid dan terpenoid. Oleh karena itu Allah SWT meminta manusia untuk selalu berfikir karena ujian yang datang dari Allah SWT yang berupa penyakit tidak lepas dari pertolongan Allah SWT yang juga menurunkan obat sebagai penawarnya. Allah SWT berfirman dalam Al Qur'an surat As-Syu'ara' ayat 80:

وَادْأَمْرَضْتُ فَهُوَ يَشْفِينُ ﴿٨٠﴾

“Dan apabila aku sakit, maka hanya Dia Yang menyembuhkan aku.” Q.S. As-Syu'ara' ayat 80.

Berdasarkan tafsir Ibnu Katsir, ayat diatas menerangkan bahwa segala penyakit merupakan pemberian Allah SWT dan tidak ada yang mampu menyembuhkan selainNya. Oleh karena itu, manusia hanya bisa berusaha dan mencari pengobatan untuk kesembuhan penyakitnya. Maka kita sebagai umat yang beriman harus yakin dan bertakwa kepada Allah SWT agar kita diberikan kemudahan dan jalan keluar karena sesungguhnya ujian yang Allah SWT berikan tidak akan melebihi batas kemampuan umatNya.

BAB V

PENUTUPAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa ekstrak bekatul terfermentasi dosis 100 mg/kgBB (BF 100) merupakan dosis terbaik dalam menurunkan kadar glukosa darah mencapai kadar glukosa darah normal sebesar 135 mg/dL dan perbaikan sel hepatosit sebanyak 30 sel.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penambahan variasi waktu pemberian terapi ekstrak bekatul untuk mengetahui penurunan kadar glukosa darah dan perbaikan sel hepatosit mencit diabetes.
2. Perlu dilakukan pewarnaan jaringan menggunakan perwarnaan imunohistokimia agar mengetahui perbedaan sel secara jelas.

DAFTAR PUSTAKA

- Adji, 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.
- Adom, K., & Liu, R. 2002. Antioxidant Activity of Grains. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 50 (21) : 6182-6187.
- Agustina, W., Nurhamidah., dan Handayani, D. 2017. Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Beberapa Fraksi dari Kulit Batang Jarak (*Ricinus communis* L). *Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia.* 1(2):117-122.
- Agustina, E., Andiarna, F., Lusiana, N., Purnamasari, R., Moch Irfan Hadi. 2018. Identifikasi Senyawa Aktif dari Ekstrak daun Jambu Air (*Syzygium aqueum*) dengan Perbandingan Beberapa Pelarut pada Metode Maserasi. *Biotropic.* 2(2):108-118.
- Arif, S. P. 2016. Studi Pengaruh Variasi Dosis Terapi Infusa Pekat Buah Pare (*Momordica charantia* L.) Terhadap kadar Glukosa Darah dan Gambaran Histologi Hati Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Aloksan. *Skripsi.* Jurusan Kimia. UIN Malang.
- Ariyadi, T., Hadi, S. 2017. Kualitas Sediaan Jaringan Kulit Metode Microwave dan Conventional Histoprocessing Pewarnaan Hematoxylin Eosin. *Jurnal Labora Medika.* 1(1):7-11.
- Aruben, N.W. 2016. Peningkatan Konsentrasi Senyawa Fenolik Antioksidan dari Dedak dengan Cara Fermentasi. *Skripsi.* UNDIP Semarang.
- Arum, Y.P., Supartono., Sudarmin. 2012. Isolasi dan Uji Daya Antimikroba Ekstrak Daun Kersen. *Jurnal MIPA.* 35 (2): 165-174.
- 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.
- Astuti, S. 2008. Isoflavon Kedelai dan Potensinya Sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian.* 13(2).
- Baraja, M. 2008. Uji Toksisitas Ekstrak Daun *Ficus elastica* Nois ex Blume Terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Skripsi.* Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Baqarizky, F. 2015. Gambaran Histopatologik Pankreas, Hepar dan Ginjal Tikus Diabetes Mellitus yang Diinduksi Streptozotocin dengan Pewarnaan Hematoksin Eosin. *Skripsi.* Program Studi Pendidikan Doktor. UIN Syarif Hidayatullah.
- Boudreau, M. D., Taylor, H. W., Baker, D. G., dan Means, J. C. 2006. Dietary Exposure To 2-Aminoanthracene Induces Morphological and

- Immunocytochemical Changes In Pancreatic Tissues Of Fisher-344 Rats. *Toxicol Sci*, 93: 50-61.
- Brachmachari, G. 2011. Bioflavonoids with Promising Anti-Diabetic Potentials: A Critical Survey. *Medicines Chemistry*.187-212.
- Buyukkilecci, A.O., Hamamci, H., dan Yucel, M. 2006. Lactate and Ethanol Productions by *Rhizopus oryzae* ATCC 9363 and Activities of Related Pyruvate Branch Points Enzymes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102 : 464-466.
- Campbell, N. A. 2004. *Biologi Jilid III*. Jakarta: Erlangga.
- Chaiyasut, C., Pengkumsri, N., Sirilun, S., Peerajan, S., Kongtan, S and Sivamaruthi, B. S. 2017. Assessment of Changes in the Content of Anthicyanins, Phenolic Acids, and Antioxidant Property of *Saccharomyces cerevisiae* Mediated Fermented Black Rice Bran. *AMB Express*. 7:114.
- Dalimartha, S. 2007. *Ramuan Tradisional untuk Pengobatan Diabetes Mellitus*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Depkes RI. 2005. *Pharmaceutical Care Untuk Penyakit Diabetes Mellitus*. Jakarta.
- Depkes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan Direktorat Pengawasan Obat Tradisional*. Jakarta. 17:31-32.
- Dheer R., Suhartono, E., Qamariyah. 2010. A Study of The Antidibetic Activity of Barleriapronitis Lin. *Indian Journal of Pharmacology*. 42(2):1-5.
- Diana, S. 2017. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L) Terhadap Kadar Glukosa Darah dan Gambaran Histologi Hati pada Mencit (*Mus musculus* L) yang Diinduksi Diabetes. Departemen Biologi. Universitas Sumatera Utara Medan.
- Effendy. 2006. *Perspektif Baru Kimia Koordinasi Jilid I*. Malang: Banyu Media.
- Eroschenko, V.P. 2012. *Atlas Histologi Difiore: Dengan Korelasi Fungsional*. Jakarta EGC.
- Faddladdeen, K. A., Ojaimi, A. A. 2020. Protective Effect of Pomegranate (*Punica granatum*) Extract against Diabetic Changes in Adult Male Rat Liver: Histological Study. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. Volume 7.Issue 4: 165-170.
- Fikriyah, Z. 2018. Pengaruh Lama Fermentasi dan Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Antioksidan Bekatul Terfermentasi oleh *Rizhopus oryzae*. *Skripsi*. Jurusan Kimia. UIN Malang.
- Fitmawati., Titrawani., dan Safitri, W. 2018. Struktur Histologi Hati Tikus Putih (*Rattus norvegicus* Barkenhout 1769) dengan Pemberian Ramua Tradisional Masyarakat Melayu Lingga Kepulauan Riau. *Jurnal Penelitian Biologi, Botani, Zoologi, dan Mikrobiologi*.3(1): 11-16.

- Friedman, M. 2013. Rice Brans, Rice Bran Oils, And Rice Hulls: Composition, Food and Industrial Uses, And Bioactivities in Humans, Animals, And Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 10626-10641.
- Germain, G. S., dan R. Summerbell. 2006. *Identifying Filamentous Fungi*. London. Microbiological Science.
- Guyton, dan Hall. 1997. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Jakarta : Anggota IKAPI
- Gordon.M.H.1990. *The Mechanism of Antioxidants Action In Vitro*. London : Elvesier Applied Science.
- Hasim, H., Nuris, M. A., Setyono, A., Qomariyah E. N., Faridah, D. N. 2020. Ekstrak Angkak dan Bekatul untuk Mencegah Peroksidasi Lipid Tikus Spague-Dawley Hiperglikemik. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 9(2):62-70.
- Harborne,J. 1984. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. New York: Champman and Hall.
- Hargono, D. dkk, 1986. *Sediaan Galenik*. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM). Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Hayati, E, K., Jannah, A., dan Ningsih. 2012. Identifikasi Senyawa dan Aktivitas Antimalaria in Vivo Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting-Anting (*AcalyphaIndica* L.). *Molekul*. 1(1):20-32.
- Husna, F., Suyatna, F.D.,Arozal,W, dan Purwaningsih, E.H. 2019. Model Hewan Coba pada Penelitian Diabetes. *Pharmaceutical Sciences and Research*. 6 (3): 131-141.
- Hussain, dkk. 2008. Biochemical and Histomorphological Study of Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus in Rabbits. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(2):359-364.
- Jannah, A. M. 2010. Proses Fermentasi Hidrolisat Jerami Padi untuk Menghasilkan Bioetanol.*Jurnal Teknik HusnKimia*. 1(17):14-51.
- Kahlon, T.S. 2009. Rice Bran: Production, Composition, Functionality and Food Applications, Physiological Benefits. *Food Applications and Health Bnefets*. 305-21.
- Khopkar, S.M. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Khopkar. 2010. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Kim, J.S., J.B. Ju, C.W. Choi dan S.C. Kim. 2006. Hypoglycemic and Antihyperlipidemic Effect of Four Korean Medicinal Plants in Alloxan Induced Diabetic Rats. *Am. J. Biochem. Biotech*, 2: 154-160.

- Kumalaningsih, S. 2007. *Antioksidan Alami*. Surabaya: Trubus Agrisarana.
- Kunaepah, U. 2008. Pengaruh Lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa terhadap Aktivitas Antibakteri, Polifenol Total dan Mutu Kimia Kefir Susu Kacang Merah. *Tesis*. Program Studi Pascasarjana. UNDIP Semarang.
- Kurniati, Y., Budijanto, S., Nuraida, L., & Dewi, F. N. 2017. Peningkatan Senyawa Fenolik Bekatul dengan SSF (Solid State Fermentation) sebagai Pencegah Kanker. *Iptek Tanaman Pangan*. 12(2): 97-104.
- Kusumawati. 2004. *Bersahabat Dengan Hewan Coba*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Lailatul, F. N., Lyrawati, D., Handaru, M. 2015. Efek Pemberian Asam Alfa Lipoat terhadap Kadar MDA dan Gambaran Histologi pada Hati Tikus Model Diabetes Mellitus Tipe 1. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 28(3): 170-176.
- Larasati, T.R.D., Mulyana, N., Anggriawan, M., dan Effendi, Y. 2012. Produksi Enzim Selulase oleh Fungi Selulolitik yang Diradiasi Sinar Gamma dalam fermentasi Jerami Padi. *Jurnal Sains Materi Indonesia*. 16(3):139-147.
- Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida dan Alkaloida. *Karya Ilmiah*. MIPA Universitas Sumatera Utara.
- Lenzen, S. 2008. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Induced Diabetes. *Diabetologia*. 51:216-226.
- Lim, S. I., dan Lee, B. Y. 2010. Antidiabetic Effect of Material Fermented Using Rice Bran and Soybean as the Main Ingredient by *Bacillus* sp. *J. Korean Soc. App. Biol. Chem.* 53(2):222-229
- Luthfianto, D., Niviyanti, D. R., & Kurniawati, I. 2017. Karakterisasi Kandungan Zat Gizi Bekatul pada Berbagai Varietas Beras di Surakarta. ISSN 2407-9189.
- Marsk, D. 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar*. Jakarta: EGC.
- Melgar, G.Z., Assis F.V.S, Rocha, L. C., Fanti, S.C., Sette, L.D., Porto, A.L.M. 2013. Growth Curves of Filamentous for Utilization in Biocatalytic Reduction of Cyclohexanones. *Global Journal Of Science Frontle Research Chemistry*, (13): 0975-5896.
- Moore, L. E. 1996. *Fundamentals of Fungi*. New Jersey: Prentice Hall, Inc.
- Marliana, S., Suryanti, V., & Suryono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz) dalam ekstrak etanol. *Biofarmasi*. 3 (1): 26-31.
- Maulina, M. 2018. *Zat-Zat Yang Memengaruhi Histologi Hepar*. Sulawesi: Unimal Press.
- Moongarm, A., Daomukda, N., & Khumika, S. 2012. Chemical Compositions, Phytochemicals, and Antioxidant Capacity of Rice Bran, Rice Bran Layer, and Rice Germ. *Procedia APCBEE* 2, 73-79.

- Mursalina., Sinaga S. M., dan Silalahi J. 2012. Penetapan Kadar Serat Tak Larut Pada Makanan Kripik Simulasi. *Journal of Natural Product and Pharmaceutical*, 1(1):1-7.
- Nafisah, M., Tukiran, S., 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.
- Nurhidayah, M., Astuti, M., Sardjono, S., Murdiati, A. 2017. Profil Antioksidan Darah Tikus Diabetes dengan Asupan Beras Merah yang Diperkaya Kappa-Karagenan dan Ekstrak Antosianin. *AGRITECH*. 37(1): 81-87.
- Nugroho, A.E., 2006. Hewan Percobaan Diabetes Mellitus : Patologi Dan Mekanisme Aksi Diabetogenik. *Jurnal Biodiversitas*. 7(4): 378–382.
- Nugraha, A. P., Isdadiyanto, S., Tana, S. 2018. Histopatologi Hepar Tikus Wistria (*Rattus norvegicus*) Jantan Setelah Pemberian Teh Kombucha Konsentrasi 100% dengan Waktu Fermentasi yang Berbeda. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*. 3(1): 71-78.
- Oliveira, M. S., Eliane, P. C., Eliana, B. F., dan Leonor, S. S. 2012 Phenolic Compound and Antioxidant Activity in Fermented Rice (*Oryza sativa*) Bran. *Cience Tecnol Aliment*, 32 (3): 531-537.
- Orthofer, F.T. 2001. *Rice Bran and Oil*. American Association of Cereal Chemist.
- Pathel, D.K., Kumar, R., Lalo, D., dan Hemalatha, S. 2012. Diabetes Mellitus an Overview on its Pharmacological Aspects and Reported Medicinal Plants Having Antidibetic Activity. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(5):411-20.
- Pagarra, H. 2009. Laju Pertumbuhan Jamur Rhizopus sp pada Tempe Kacang Hijau (*Phaseolus radiatus* L.). *Bionature*. 10(2):69-74.
- Pangastuti., Triwibowo.1996. *Proses Pembuatan Tempe Kedelai dengan Analisis Mikrobiologi*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Paramita, N. P. C. 2019. Ekstrak Etanol Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea Batatas* L.) Menurunkan Degenerasi Lemak Jaringan Hati Tikus yang di Ovariectomi. *E-Jurnal Medika*. 8(1).33-37.
- Poedjiadi, A. 2012. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Pasaribu., Sutandi., Sauland., dan Dudi. 2015. *Identifikasi Sifat Kualitatif dan Kuantitatif Babi Lokal*. Fakultas Peternakan. Universitas Padjadjaran Jawa Barat.
- Prabhu, A. A., Mrudula, C. M., dan Rajesh J. 2014. Effect of Yeast Fermentation on Nutraceutical and Antioxidant Properties of Rice Bran. *International Journal of Agricultural and Food Science*, 4 (1): 59-65.

- Prasetyo, Y. E., Merdana I, M., Kardena I M., Sudira, I W. 2019. Perubahan Histopatologi Hati Mencit yang Diberikan Ekstrak Etanol Tanaman Sarang Semut. *Buletin Veteiner Udayana*. 11 (1):44-50.
- Price, S., & Wilson, S. 2012. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses Penyakit*. Jakarta : EGC.
- Putra, D.A.D.2012. Identifikasi Komponen Kimia Minyak Atsiri Daun Bunga Tahi Ayam (*Tagetes erecta* L.) serta Uji Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan. *Skripsi*. Universitas Sumatera Utara.
- Putri, G. A. 2016. Gambaran Jamur *Aspergillus flavus* pada Saus Cabai Hasil Industri Rumahan yang Dijual di Pasar Pasir Gintung dan Pasar Smep Kota Bandar Lampung. *Karya Tulis Ilmiah*. Tanjung Karang. Politeknik Kesehatan.
- Quthb,S. 2001. Tafsir Fi Zhilalil Qur'an. Jakarta. Gema Insani Press.
- Rahmawati, G., Rachmawati F. N., Winarsi H. 2014. Aktivitas Superoksida Dismutase Tikus Diabetes yang diberi Ekstrak Batang Kapulaga dan Glibenklamid. *Scripta Biologica*, 1(3): 197-201.
- Rakhmadi, I., Muladno, S. 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.
- Rarangsari, N. E. 2015. Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L) terhadap SOD dan Histologi Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aloksan. *Skripsi*. UIN Malang.
- Rashid, N. Y A., Lelamuni, D. A. D., Anisah, J. 2015. Bioactive Compounds And Antioxidant Activity of Rice Bran Fermented with Lactic Acid Bacteria. *Malaysian Journal of Microbiology*, 11 (2): 156-162.
- Razak, D. L. A., Rashid N. Y. A., Anisah, J., Shaiful, A. S dan Long, K. 2017. Cosmeceutical Potentials and Bioactive Compounds of Rice Bran Fermented with Single and Mix Culture of *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae*. *Journal of the Saudy Society of Agricultural Sciences*. 16:127-134.
- 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.
- Robinson. 1995. *The Organic Constituen of HigherPlants*. University of Massachusett: Department of Biochemistry.
- Salih, N. D. 2009. Histological Liver Changes in Streptozotocin Induced Diabetic Mice. *Volume 8 issue 1*, 1-4.
- Sangi, M., Max R.J., Herny, E.I., Simbala dan Veronica, M.A.M. 2008. Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara. *Jurnal Chem*. Vol.1, No.1.

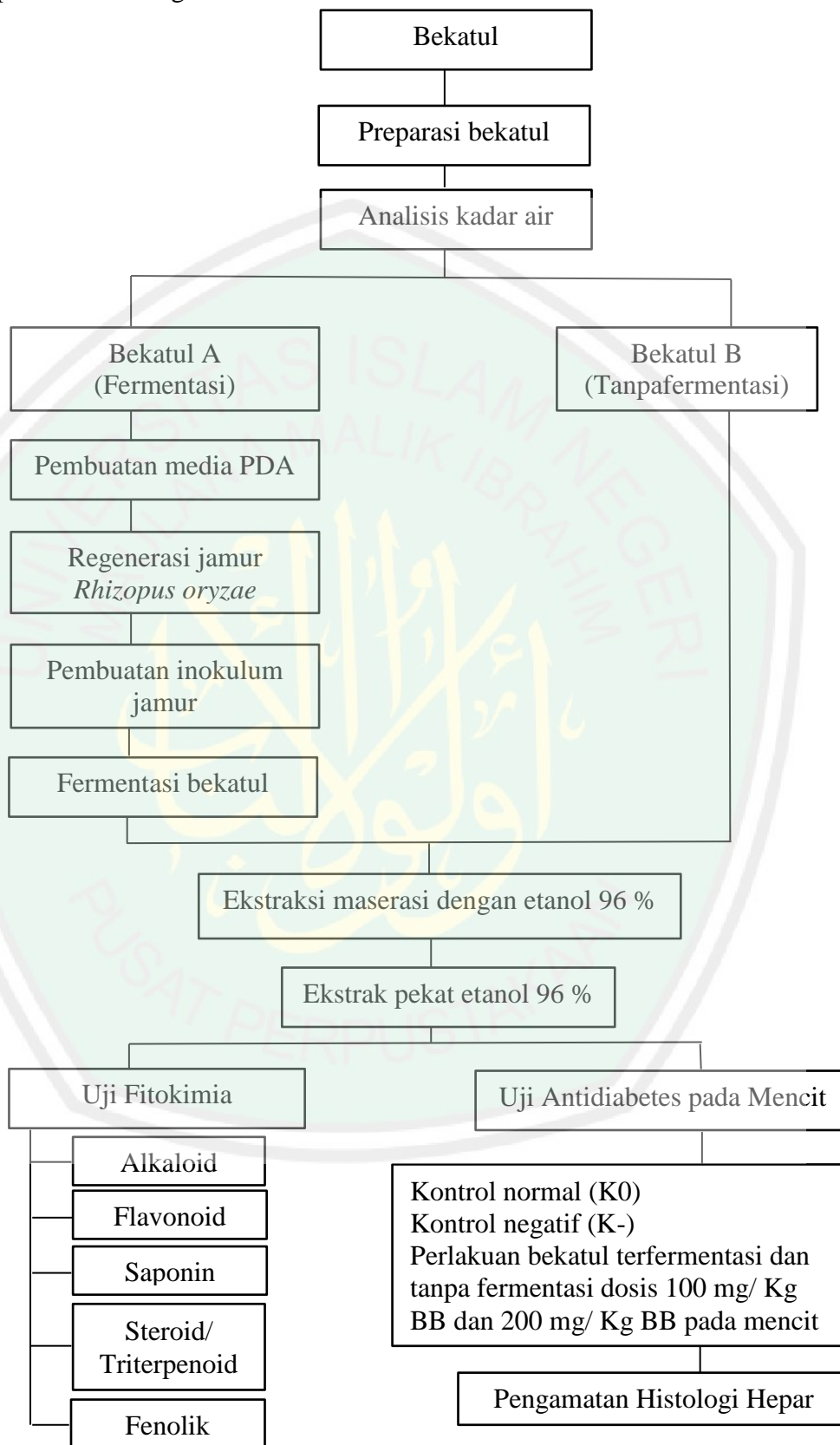
- Saputra, F., E. M. Sutrisna., Nurhayati. 2016. Uji Efek Ekstrak Etanol 96% Anggur Merah (*Vitis vinifera*) terhadap Penurunan Kadar Trigliserida pada Tikus Putih (*Rattus Novergius*) yang Diinduksi Triton X-100. *Biokimia*. Vo.8 No.8.
- Saropah, Diah Ayu., Akyunul Jannah., Anik Maunatin. 2012. Kinetika Reaksi Enzim Ekstrak Kasar Enzim Selulase Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi dari Bekatul. *AlCHEMY*. Vol.2, No.1.34-45.
- Saunders, R.M. 2012. Rice Bran: Composition and Potential Food Uses. *Food Review International*. 1(3):465-495
- Sax, D., Lewis, R. 1998. *Dictionary Chemistry*. Canada : Galler Internasional.
- Schmidt, C. G., Leticia M. Goncalves., Luciana Prietto., Helen S. Hackbart., dan Eliana B. Furlong. 2013. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rhizopus oryzae*. *Food Chemistry Journal*, 146(12): 371-377.
- Setiawan, B., Suhartono, E. 2005. Stres Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Mellitus. *Maj. Kedokt Indo*. Vol.55, No.2. 86-91.
- Setiawan, B. 2016. Optimalisasi Metode Automatic Slide Stainer untuk Pewarnaan Jaringan menggunakan Hemaktosilin Eosin
- Sherwood, L. *Fisiologi Hewan*.2004. Jakarta:EGC.
- Shihab.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*. Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang.
- Siburian, R. R., Ahmad, A., Murian, S. R. 2015. Pengaruh Waktu Inokulasi Inokulum dalam Pembuatan Bioetanol dari pelepah Sawit Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. *JOM FTEKNIK*. 2(2):1-7.
- Sirait, M. 2007. *Penuntun Fitokimia dalam Farmasi*. Bandung:Penerbit ITB.
- Smith, J., dan Mangkowitzjojo, S. 1987. *Pemeliharaan, Pembiakan, dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Terjemahan. Jakarta: UI Press.
- Sohiyah, S. 2017. Studi Pengaruh Variasi Dosis Terapi Infusa Pekat Buah Pare (*Momordica charantia L.*) terhadap Kadar Glukosa Darah dan Aktivitas SOD Hati Tikus yang Diinduksi Aloksan. *Skripsi*. Jurusan Kimia. UIN Malang.
- Song, F., Chen, W., Jia, W., Yao, P., Nussler, A. K., Sun, X., and Liu, L. 2006. A Natural Sweetener, *Momordica grosvenori* Attenuates the Imbalance of Cellular Immune Functions in Alloxan-Induced Diabetic Mice. *Phytotherapy Research*.20:552-560.

- Suarsana, I. N., Priosoeryanto, B. P. 2010. Sintesis Glikogen hati dan Otot pada Tikus Diabetes yang Diberi Ekstrak Tempe. *Jurnal Veteriner*. 11 (3): 190-195.
- Sukarni., Maftuch., Nursyam, H. 2012. Kajian Penggunaan Ciprofloxacin terhadap Histologi Insang dan Hati Ikan Botia (*Botia macrachantus* Bleeker) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *J. Exp. Life Sci*. 2(1):6-12.
- Sukma, L. N., Zackiyah., dan Gumilar G.G. 2010. Pengkayaan Asam Lemak Tak Jenuh Pada Bekatul dengan Cara Fermentasi Padat Menggunakan *Aspergillus terreus*. *Jurnal Sains dan Teknologi Kimia*. 1(1):66-72.
- Sulistianto, D. E., Hartini, M., Handajani, N.S. 2004. Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl) terhadap Struktur Histologis Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) setelah Perlakuan dengan Karbon Tetraklorida (CCl_4) Secara Oral. *BioSMART*.6(2):91-98.
- Sumardjo, D. 2009. *Pengantar Kimia*. Jakarta: EGC.
- Surasa, N. J., Utami, N. R., Isnaeni, W. 2014. Struktur Mikroanatomi Hati dan Kadar Kolesterol Total Plasma Darah Tikus Strain Wistar Pasca Suplementasi Minyak Lemuru dan Minyak Sawit. 2014. *Biosaintifika*. 6(2): 1-5.
- Suryani, N. 2013. Pengaruh Ekstrak Metanol Biji Mahoni (*Swetenia mahagoni* Jacq) terhadap Penurunan Glukosa Darah dan Perbaikan Jaringan Pankreas Tikus Hasil Induksi MLD-STZ. *Jurkessia*. IV(1): 1-10.
- Susanty, A., Fernando, A., dan Adelin, I. 2014. Efek Analgetik Ekstrak Etanol Daun Tanpa Badak (*Voacanga foetida* (Bl.) K. Schum) Pada Mencit Putih (*Mus musculus*) Jantan. *Jurnal Sains Farmasi&Klinis*. 1(1):1-9.
- Susilawati, E. 2017. Aktivitas Antidiabetes dari Ekstrak Etanol Biji Hanjeli (*Coix Lacryma-Jobi*) pada Mencit Galur Swiss Webster yang Diinduksi Aloksan. *J Farm. Galen*. 2(2).
- Svendsen, A. 2000. *Lipase Protein Engineering Biochim Biophys Acta*. 1532(2):223-228.
- Szkudelski, T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rats Pancreas. *Physiol Res*, 50(6): 537-46.
- Tacibana Y., Kikuzaki, H., Lajis, N. H., dan Nakatani. 2001. Anti Oxidative Activity of Carbazoles from *Murraya Koenigii* Leaves. *J. Food Chem*, 49:5589-5594.
- Triandita, N., Zakaria, F. R., Prangdimurti, E., dan Putri, N. E. 2016. Perbaikan Status Antioksidan Penderita Diabetes Tipe 2 dengan Tahu Kedelai Hitam Kaya Serat. *J. Teknol dan Industri Pangan*. Vol. 72(2): 123-130.

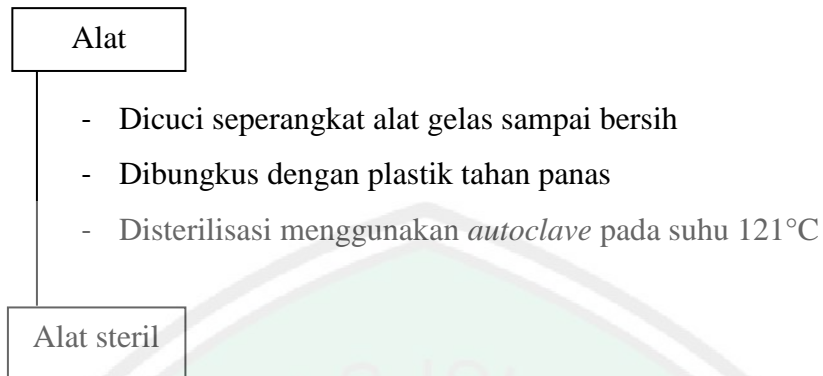
- Ulfa, S. M. 2016. Identifikasi dan Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan dalam Bekatul dengan Menggunakan Variasi Pelarut. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Vogel, A. I. 1987. *Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Makro dan Semimikro*. Jakarta: Kalman Media Pusaka.
- Voight, R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi Edisi 5*. Diterjemahkan oleh Soedani Noerono Soewandi. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Wahyuni, A. S., Munawaroh R., Da'i, M., 2016. Antidiabetic Mechanism of Ethanol Extract of Balack Rice Bran on Diabetic Rats. *National Journal of Physiology, Pharmacy, and Pharmacology*. Vol. 6. Issue 2.
- Watkins, D., S. J. Cooperstein and A. Lazarow. 1964. Effect of Alloxan on Permeability of Pancreatic Islet Tissue in Vitro. *American Journal of Physiology*, 207:436-440.
- Widarta, I.W.R., Nocianitri K.A., Sari L.P.I.P. 2013. Ekstraksi Komponen Bioaktif Bekatul Beras Lokal dengan Beberapa Jenis Pelarut. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 2 (2).
- Widowati. 2008. Peran Antioksidan Sebagai Antidiabetes. *Jurnal Kedokteran Maranatha*. 7(2):1-11.
- Winarsi, H., Sasongko, N. D., Purwanto, A. and Nuraeni, I. 2013. Ekstrak Daun Kapulaga Menurunkan Indeks Atherogenik dan Kadar Gula Darah Tikus Diabetes Induksi Alloxan. *AGRITECH*, 33(3) pp.273-280.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Yosi, F., E. Sahara., dan S. Sandi. 2014. Analisis Sifat Fisik Bekatul dan Ekstrak Minyak Bekatul Hasil Fermentasi *Rhizopus sp.* dengan Menggunakan Inokulum Tempe. *Jurnal Peternakan Sriwijaya*, Vol. 3, No. 1, hal. 7-13.
- Yusuf, M., dan Wati, A. 2019. Efek Infus Kayu Secang (*Caesalpinia Sappan L.*) Terhadap Penurunan Kadar Gula Darah Mencit (*Mus Musculus*). *Media Farmasi*. Vol.XV.No.1:1-8.
- Zubaidah, E., Ella, S., dan Josep, H. 2012. Studi Aktivitas Antioksidan pada Bekatul dan Susu Skim Terfermentasi Probiotik (*Lactobacillus plantarum* B2 dan *Lactobacillus acidophilus*). *Jurnal Teknologi Pertanian*, 13 (2): 111-118.

LAMPIRAN

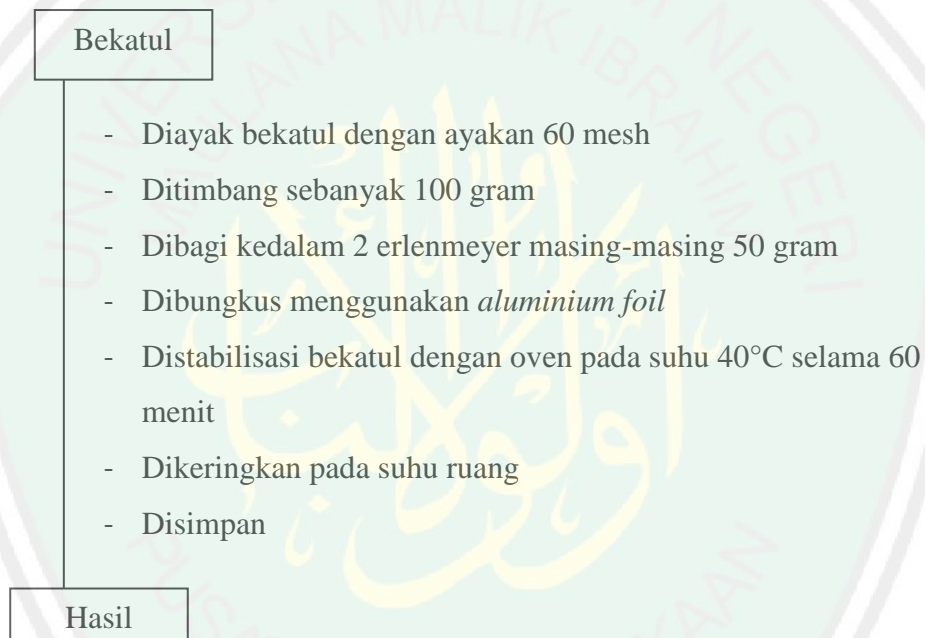
Lampiran 1. Rancangan Penelitian



Lampiran 2. Skema Kerja
L.2.1 Preparasi Alat dan Bahan
L.2.1.1 Sterilisasi Alat



L.2.1.2 Stabilisasi Bekatul



L.2.2 Analisis Kadar Air

Bekatul

- Dipanaskan cawan dalam oven pada suhu 100-105°C selama 15 menit
- Dikeringkan dalam desikator selama 10 menit
- Ditimbang dan diulangi perlakuan sampai memperoleh berat konstan
- Dimasukkan sampel bekatul ke dalam cawan yang diketahui berat konstan
- Ditimbang sampel bekatul sebanyak 5 gram
- Dikeringkan dalam oven pada suhu 100-105°C selama 1 jam
- Didinginkan sampel bekatul dalam desikator dan ditimbang

Hasil

L.2.3 Fermentasi Bekatul

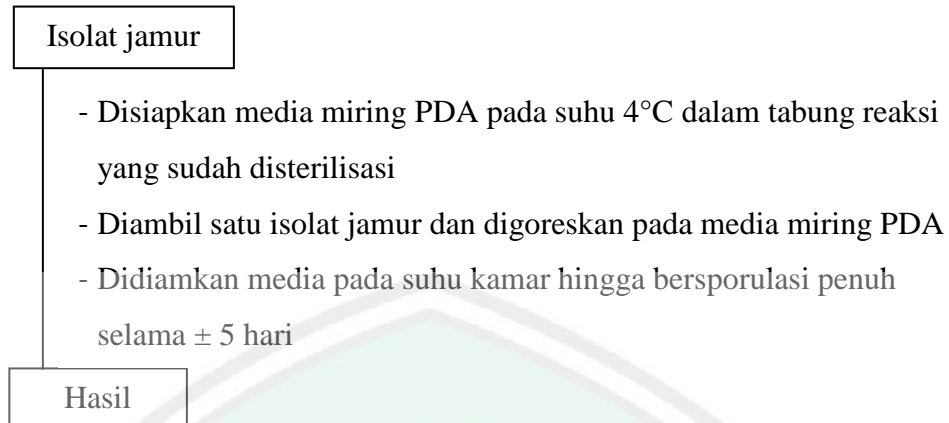
L.2.3.1 Pembuatan Media PDA

Media PDA

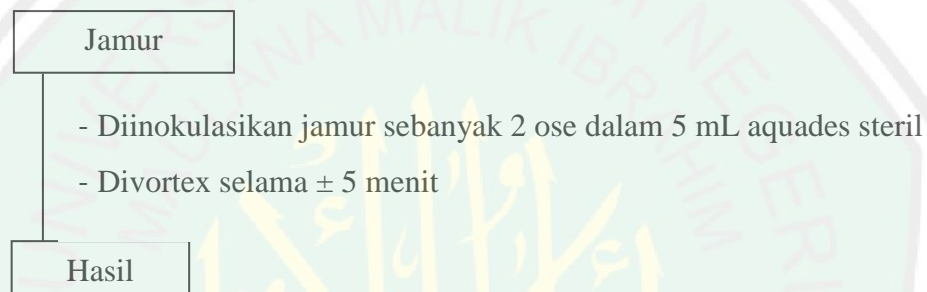
- Dilarutkan media PDA bubuk sebanyak 3,9 gram dalam 100 mL aquades
- Dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk
- Dituang larutan PDA ke dalam tabung reaksi sebanyak 4 mL
- Ditutup tabung reaksi dengan kapas dan *plastic wrap*
- Disterilisasi media PDA menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C
- Didinginkan dalam keadaan miring hingga memadat

Hasil

L.2.3.3 Regenerasi Jamur *Rhizopus oryzae*

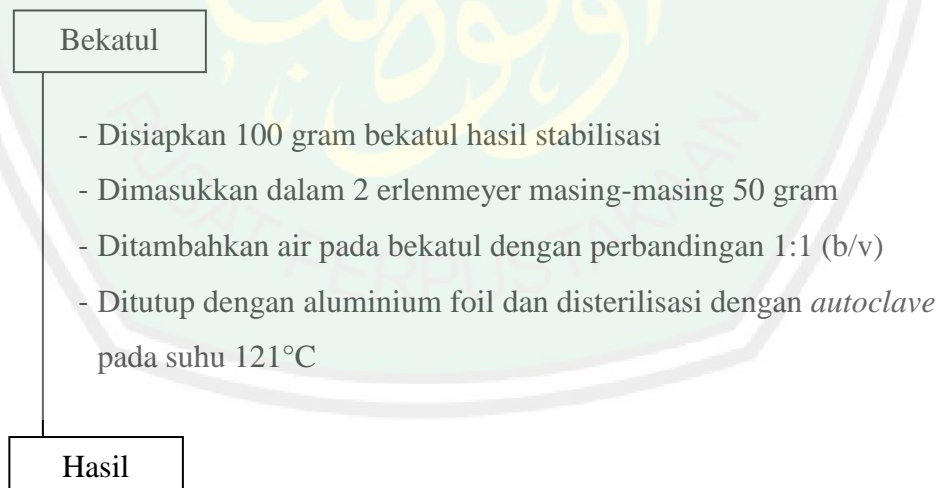


L.2.3.4 Pembuatan Inokulum Jamur

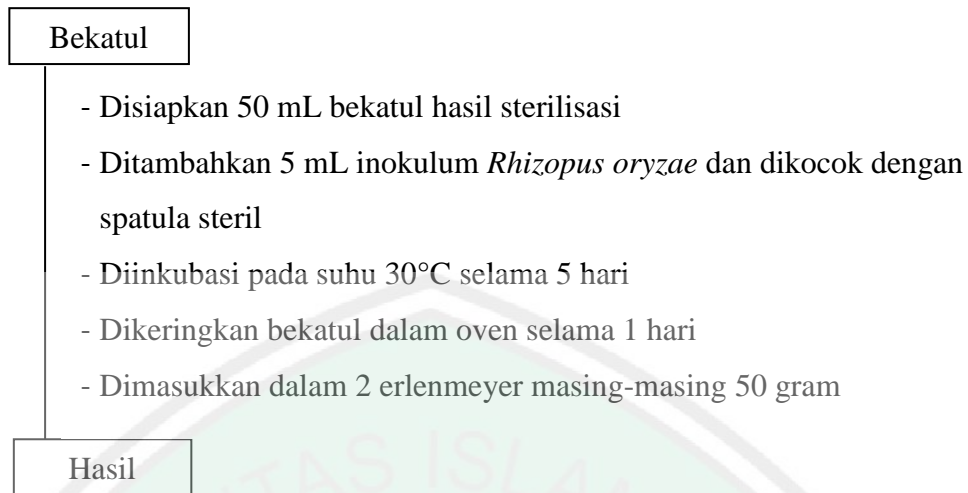


L.2.3.5 Fermentasi Bekatul Menggunakan *Rhizopus oryzae*

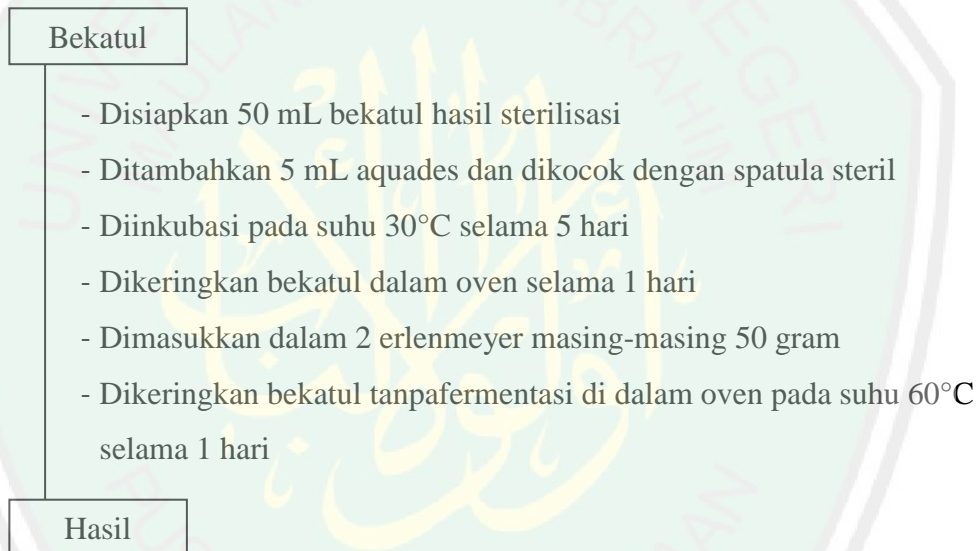
1. Sterilisasi Bekatul



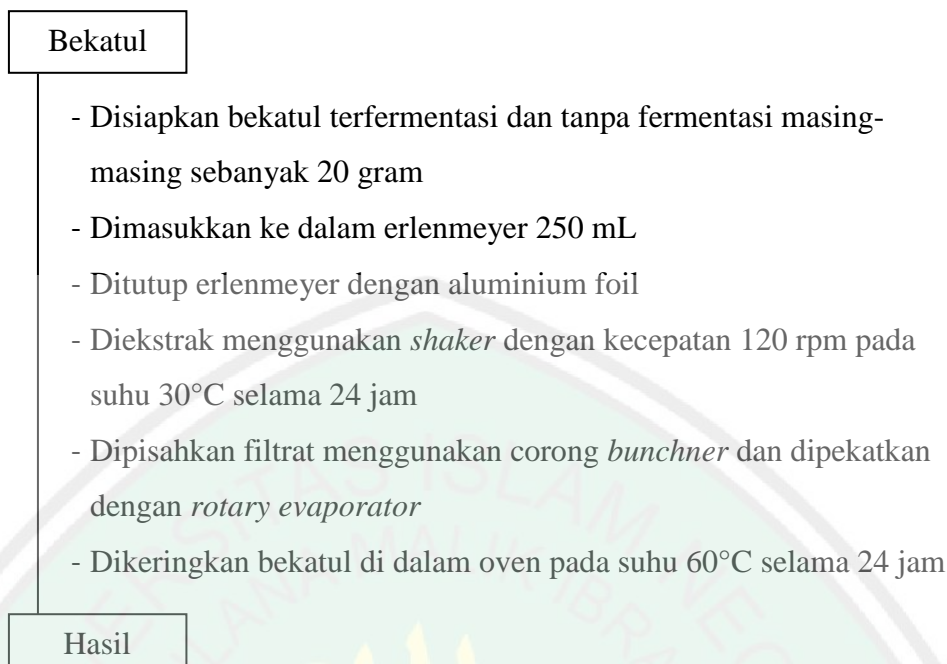
2. Fermentasi Bekatul



3. Bekatul Tanpafermentasi

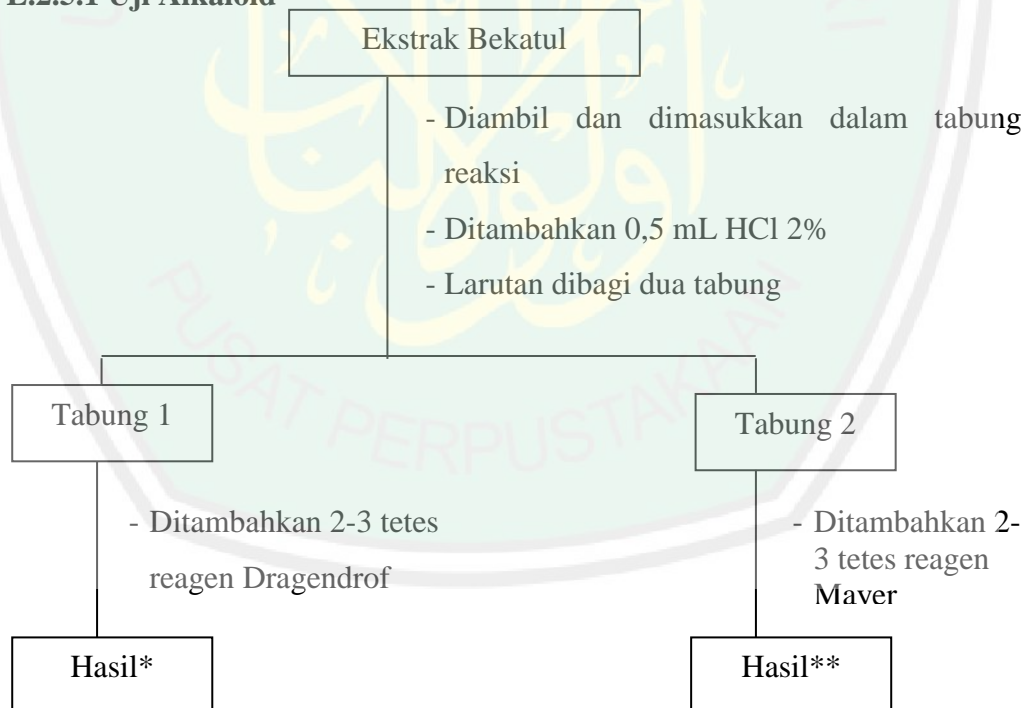


L.2.4 Ekstraksi Senyawa Antioksidan Bekatul



L.2.5 Uji Fitokimia

L.2.5.1 Uji Alkaloid



* Hasil positif uji alkaloid dengan penambahan reagen Dragendrof, apabila terbentuk endapan berwarna merah atau jingga.

**Hasil positif uji alkaloid dengan penambahan reagen Mayer, apabila terbentuk endapan berwarna putih atau kekuning-kuningan.

L.2.5.2 Uji Flavonoid

Ekstrak Bekatul

- Dimasukkan ekstrak bekatul ke dalam tabung reaksi
- Dilarutkan dalam 1-2 mL metanol 50% panas
- Ditambahkan logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat dan diamati perubahan warna

Hasil*

* Hasil positif uji flavonoid larutan membentuk warna merah atau jingga.

L.2.5.3 Uji Saponin

Ekstrak Bekatul

- Dimasukkan ekstrak bekatul ke dalam tabung reaksi
- Ditambahkan 10 mL aquades dan dikocok 1 menit
- Diamati perubahan yang terjadi
- Ditambahkan 2 tetes HCl 1 N jika terbentuk busa
- Diamati terbentuknya busa selama 30 detik

Hasil*

* Hasil positif dari saponin apabila terbentuk busa selama 30 detik.

L.2.5.4 Uji Steroid/Triterpenoid

Ekstrak Bekatul

- Dimasukkan ekstrak bekatul ke dalam tabung reaksi
- Dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform
- Ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat
- Ditambahkan 1-2 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung reaksi tersebut
- Diamati perubahan warna

Hasil*

* Apabila terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut maka menunjukkan adanya triterpen, dan jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid.

L.2.5.5 Uji Fenolik

Ekstrak Bekatul

- Dimasukkan ekstrak bekatul ke dalam tabung reaksi
- Dilarutkan dalam metanol
- Ditambahkan FeCl_3
- Diamati perubahan warna

Hasil*

* Hasil positif uji fenolik yaitu terbentuknya warna hijau, kuning, atau merah.

L.2.6 Uji Antidiabetes

L.2.6.1 Persiapan Hewan Coba

Mencit

- Disiapkan mencit galur Balb/c jenis kelamin jantan
- Dimasukkan ke dalam kandang yang diberi alas serbuk kayu dan ditutup dengan anyaman kawat
- Diberikan makan dan minum

Hasil

L.2.6.2 Perlakuan Hewan Coba

Mencit

- Disiapkan mencit galur Balb/c jenis kelamin jantan dengan berat badan ± 20 gram
- Dikelompokkan menjadi 6 kelompok (tiap kelompok berjumlah 3 mencit)
- Diberi perlakuan sebagai berikut:

Kontrol normal: mencit normal tanpa induksi aloksan.

Kontrol (-) : mencit diinduksi aloksan dengan pemberian aquades.

Kontrol 1 : mencit diinduksi aloksan dengan diberikan ekstrak bekatul tanpafermentasi dosis 100 mg/KgBB.

Kontrol 2 : mencit diinduksi aloksan dengan diberikan ekstrak bekatul tanpafermentasi dosis 200 mg/KgBB.

Kelompok 1 : mencit diinduksi aloksan dengan diberikan ekstrak bekatul terfermentasi dosis 100 mg/KgBB.

Kelompok 2 : mencit diinduksi aloksan dengan diberikan ekstrak bekatul terfermentasi dosis 200 mg/KgBB.

- Diamati perubahan kondisi mencit

Hasil

L.2.7 Peningkatan Kadar Glukosa Darah pada Mencit

Mencit

- Diposisikan mencit dalam keadaan terlentang
- Disemprotkan alkohol 70% pada bagian abdomen mencit agar tidak terjadi infeksi
- Diinjeksi mencit dengan dosis 200 mg/Kg BB melalui rute intraperitoneal
- Diinkubasi mencit selama 3 hari
- Dilakukan pengukuran kadar glukosa darah

Hasil

L.2.8 Perlakuan Dengan Ekstrak Bekatul

Mencit

- Diberikan perlakuan berbeda pada masing-masing kelompok yang sudah diinduksi aloksan
- Diberikan pakan standar pada kontrol normal dan kontrol negatif (-)
- Diberikan pakan standar dan ekstrak bekatul tanpafermentasi sesuai berat badan mencit dengan dosis yang telah ditentukan pada kontrol 1 sampai kontrol 2
- Diberikan pakan standar dan ekstrak bekatul terfermentasi sebanyak sesuai berat badan mencit dengan dosis yang telah ditentukan pada kelompok 1 sampai kelompok 2
- Dilakukan selama 19 hari
- Dilakukan pengukuran kadar glukosa darah pada hari ke-7, 11,14 dan 19

Hasil

L.2.9 Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Darah Mencit

- Dilakukan pengukuran dengan alat *Gluco Dr*
- Dikalibrasi alat *Gluco Dr*
- 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 Pengambilan Organ Hepar dan Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)

L.2.10.1 Pengambilan Organ Hepar

Organ Hepar

- Dipuasakan mencit selama 18 jam sebelum dilakukan pembedahan kemudian didislokasi leher
- Disiapkan skapel dan alat bedah untuk pengambilan organ hati
- Dibedah mencit dan diperfusi pada bagian *vena porta hepatica*
- Dicuci hati menggunakan larutan NaCl steril
- Dipotong dan dimasukkan ke dalam tempat spesimen yang terbuat dari plastik
- Disimpan dalam wadah tertutup yang berisi larutan buffer formalin 10%
- Difiksasi organ hepar selama 24 jam

Hasil

L.2.10.2 Pembuatan Preparat

Organ Hepar

- Diambil organ hepar yang sudah difiksasi
- Dilakukan proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (70%, 80%, dan 96%) masing-masing selama 30 menit
- Dilakukan penjernihan dengan xylol selama 30 menit
- Dimasukkan ke dalam parafin cair dengan suhu 70°C selama 24 jam
- Diambil organ hepar dan diblok menggunakan blok parafin
- Dipotong blok parafin menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-5 μm
- Dimasukkan dalam air hangat suhu 60°C dan diletakkan pada gelas objek
- Dilakukan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Hasil

Lampiran 3. Perhitungan Pembuatan Larutan

L.3.1 Pembuatan Alkohol 70 %

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

$$96\% \times V_1 = 70\% \times 1000 \text{ mL}$$

$$V_1 = 72,9 \text{ mL} = 73 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah diisi labu takar 100 mL dengan 73 mL etanol p.a (96%). Kemudian ditandabatkan dengan aquades dan dihomogenkan.

L.3.2 Pembuatan Alkohol 80 %

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

$$96\% \times V_1 = 80\% \times 1000 \text{ mL}$$

$$V_1 = 83,3 \text{ mL} = 83 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah diisi labu takar 100 mL dengan 83 mL etanol p.a (96%). Kemudian ditandabatkan dengan aquades dan dihomogenkan.

L.3.3 Pembuatan Alkohol 90 %

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

$$96\% \times V_1 = 90\% \times 1000 \text{ mL}$$

$$V_1 = 93,7 \text{ mL} = 94 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah diisi labu takar 100 mL dengan 94 mL etanol p.a (96%). Kemudian ditandabatkan dengan aquades dan dihomogenkan.

L.3.4 Pembuatan Reagen Dragendorff

Larutan I. 0,6 gram bismuth subnitrat dalam 2 mL HCl pekat dan 10 mL H₂O

Larutan II. 6 gram KI dalam 10 mL H₂O.

Kedua larutan tersebut dicampur dengan 7 mL HCl pekat dan 15 mL H₂O.

L.3.5 Pembuatan Reagen Mayer

Larutan I. HgCl₂ 1,358 gram dalam aquades 60 mL.

Larutan II. KI 5 gram dalam aquades 10 mL.

Larutan I dituang ke dalam larutan II, diencerkan dengan aquades sampai tanda batas pada labu ukur 100 mL.

L.3.6 Pembuatan Reagen FeCl₃ 1%

$$\text{FeCl}_3 1\% = \frac{1 \text{ gram}}{100 \text{ mL}}$$

Serbuk FeCl₃ 1% ditimbang sebanyak 1 gram. Kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 mL. Akuades ditambahkan sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.7 Pembuatan Reagen FeCl₃ 1%

$$\text{FeCl}_3 1\% = \frac{1 \text{ gram}}{100 \text{ mL}}$$

Serbuk FeCl₃ 1% ditimbang sebanyak 1 gram. Kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 mL. Akuades ditambahkan sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.8 Pembuatan Larutan HCl 2%

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 37\% \times V_1 &= 2\% \times 10 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,54 \text{ mL} \end{aligned}$$

Larutan HCl pekat 37% dipipet sebanyak 0,54 mL. Kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. Selanjutnya, ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dihomogenkan.

L.3.9 Pembuatan Larutan Metanol 50%

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 99,8\% \times V_1 &= 50\% \times 10 \text{ mL} \\ V_1 &= 5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Larutan metanol 99,8% diambil sebanyak 5 mL. Kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.10 Pembuatan Larutan HCl 1 N

$$\text{BJ HCl pekat} = 1,267 \text{ g/mL}$$

$$\text{Konsentrasi} = 37\% = \frac{37 \text{ g HCl}}{100 \text{ g larutan}}$$

$$\text{BM HCl} = 36,5 \text{ g/mol}$$

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

$$\text{mol} = \frac{\text{g HCl}}{\text{Mr HCl}} = \frac{37 \text{ g}}{36,5 \text{ g/mol}} = 1,014 \text{ mol}$$

$$100 \text{ gram larutan} = \frac{100 \text{ g}}{1,267 \text{ g/mL}} = 78,9 \text{ mL} = 0,0789 \text{ L}$$

$$\text{Molaritas} = \frac{\text{mol}}{\text{L}} = \frac{1,014 \text{ mol}}{0,0789 \text{ L}} = 12,85 \text{ M}$$

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

$$= 1 \times 12,85 \text{ M}$$

$$= 12,85 \text{ N}$$

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

$$12,85 \text{ N} \times V_1 = 1 \text{ N} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 7,8 \text{ mL}$$

Teknik Pembuatan:

Larutan HCl 37% diambil sebanyak 7,8 mL. Kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 mL. Akuades ditambahkan sampai tanda batas dan dihomogenkan.

L.3.8 Pembuatan Larutan NaCl 0,5%

Padatan NaCl ditimbang sebanyak 0,9 gram dan dimasukkan dalam beaker glass untuk dilarutkan menggunakan akuades. Setelah homogen, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Akuades ditambahkan sampai tanda batas dan dihomogenkan.

L.3.9 Pembuatan Larutan Aloksan

Dosis aloksan yang digunakan yaitu 200 mg/Kg BB.

$$\text{Dosis permencit} = 200 \text{ mg} \times \frac{20 \text{ g}}{1000 \text{ g}}$$

$$= 4 \text{ mg/20 g BB}$$

$$\text{Jumlah gram aloksan} = 4 \text{ mg} \times 40 \text{ mencit}$$

$$= 160 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi aloksan} &= \frac{4 \text{ mg}}{0,2 \text{ ml}} = 20 \text{ mg/mL} \\ &= 20 \text{ mg/mL}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Pembuatan aloksan} &= 20 \text{ mg/mL} \times 10 \text{ mL} \\ &= 200 \text{ mg}\end{aligned}$$

Pembuatan larutan aloksan dilakukan dengan ditimbang aloksan sebanyak 200 mg dan dimasukkan ke dalam *beaker glass*. Padatan aloksan ditambahkan dengan 10 mL larutan fisiologis NaCl 0,9% dan diaduk hingga larut sempurna. Larutan dipindahkan pada labu ukur 10 mL dan ditandabatkan menggunakan larutan fisiologis NaCl 0,9%.

L.3.10 Pembuatan Larutan CMC-Na 0,5%

Padatan CMC-Na ditimbang sebanyak 0,5 gram dan dimasukkan dalam gelas beaker. Dilarutkan menggunakan akuades hangat. Setelah homogen, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan ditandabatkan.

Lampiran 4. Perhitungan Pembuatan Dosis

Tabel L.4.1 Konversi perhitungan dosis untuk hewan dan manusi berdasarkan laurence & 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 12 Kg	Manusia 70 Kg
Mencit 20 g	1	7	12,29	27,8	28,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 g	0,14	1	1,79	3,9	4,2	9,2	17,8	60,5
Marmut 400 g	0,06	0,57	1	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 Kg	0,04	0,25	0,44	1	2,25	2,4	4,5	14,2
Kucing 4 Kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1	2,2	4,1	13
Kera 4 Kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1	1,9	6,1
Anjing 12 Kg	0,008	0,06	0,1	0,22	0,24	0,52	1	3,1
Manusia 70 Kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,76	0,16	0,32	1

L.4.1 Perhitungan Konversi Dosis Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpafermentasi

Dosis 1 = 100 mg/kg BB tikus

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

$$\text{Pada mencit 20 g} = 20 \text{ mg} \times 0,14 = 2,8 \text{ mg} / 200 \text{ g}$$

Dosis 2 = 200 mg/kg BB tikus

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

$$\text{Pada mencit 20 g} = 40 \text{ mg} \times 0,14 = 5,6 \text{ mg} / 200 \text{ g}$$

L.4.1 Perhitungan Larutan Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpafermentasi

Dosis 1 = 100 mg/kg BB = 2,8 mg / 20 g mencit

$$\text{Konsentrasi dosis 1} = \frac{2,8 \text{ mg}}{0,2 \text{ mL}} = 14 \text{ mg/mL}$$

$$= 14 \text{ mg/mL} \times 20 \text{ mL} = 280 \text{ mg}$$

Ekstrak bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi ditimbang sebanyak 280 mg kemudian dimasukkan dalam gelas beaker. Ekstrak dilarutkan menggunakan larutan CMC Na 0,5% hangat. Setelah homogen larutan ekstrak dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditandabatkan.

$$\text{Dosis 2} = 200 \text{ mg/kg BB} = 5,6 \text{ mg} / 20 \text{ g mencit}$$

$$\text{Konsentrasi dosis 1} = \frac{5,6 \text{ mg}}{0,2 \text{ ml}} = 28 \text{ mg/mL}$$

$$= 28 \text{ mg/mL} \times 20 \text{ mL} = 560 \text{ mg}$$

Ekstrak bekatul terfermentasi dan tanpa fermentasi ditimbang sebanyak 560 mg kemudian dimasukkan dalam gelas beaker. Ekstrak dilarutkan menggunakan larutan CMC Na 0,5% hangat. Setelah homogen larutan ekstrak dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditandabatkan.

Lampiran 5. Perhitungan Uji Kadar Air dan Rendemen Ekstrak Bekatul

L.5.1 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

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

Ulangan 3

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

Persentase Kadar Air

Sampel	U1	U2	U3
Bekatul bahan baku	6,7973%	7,4393%	6,9614%
Bekatul distabilisasi	6,5667%	6,5569%	6,1788%

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**

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \\ &= \frac{(45,0799-45,0142)}{(45,0799-44,0794)} \times 100 \% = 6,5667\% \end{aligned}$$

Ulangan ke 2

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \\ &= \frac{(55,2590-55,1929)}{(55,2590-54,2589)} \times 100 \% = 6,5569\% \end{aligned}$$

Ulangan ke 3

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \\ &= \frac{(43,6343-43,5725)}{(43,6343-42,6341)} \times 100 \% = 6,1788\% \end{aligned}$$

L.5.2. Perhitungan Rendemen Ekstrak

Data Perhitungan Berat Sampel Bekatul

Sampel	Berat Sampel (gram)	Berat Ekstrak (gram)
Bekatul Tanpa Fermentasi (BN)	30	2,2081
Bekatul Fermentasi (BF)	30	2,8299

1. Ekstrak bekatul tanpa fermentasi

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{2,2081}{30} \times 100 \% \\ &= 7,3603 \% \end{aligned}$$

2. Ekstrak bekatul terfermentasi

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{2,2081}{30} \times 100 \% \\ &= 9,4330 \% \end{aligned}$$

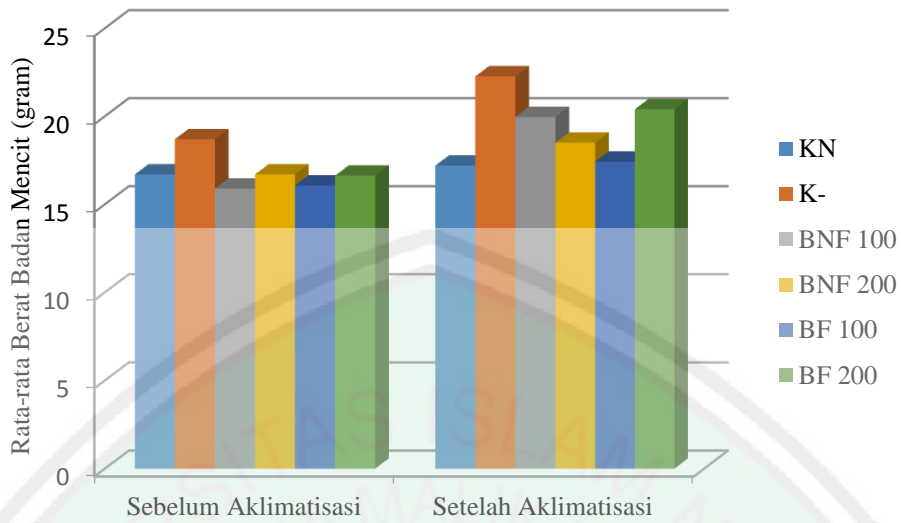
Lampiran 6. Pengamatan Berat Badan Mencit
L.6.1 Berat Badan Selama Aklimatisasi

Kelompok	U	Berat Badan Mencit (gram)	
		Sebelum Aklimatisasi	Sesudah Aklimatisasi
KN	1	17,3	18,1
	2	17,7	18,0
	3	15,1	15,5
	Rata-rata	16,7	17,2
K-	1	19,7	22,7
	2	17,0	19,1
	3	19,4	25,0
	Rata-rata	18,7	22,3
BNF 100	1	17,7	22,8
	2	15,7	20,1
	3	14,3	17,0
	Rata-rata	15,9	19,9
BNF 200	1	14,7	17,3
	2	19,9	19,9
	3	15,5	18,3
	Rata-rata	16,7	18,5
BF 100	1	18,6	20,0
	2	16,6	15,1
	3	13,0	17,2
	Rata-rata	16,1	17,4
BF 200	1	18,6	21,3
	2	16,3	20,0
	3	15,0	19,9
	Rata-rata	16,63	20,4

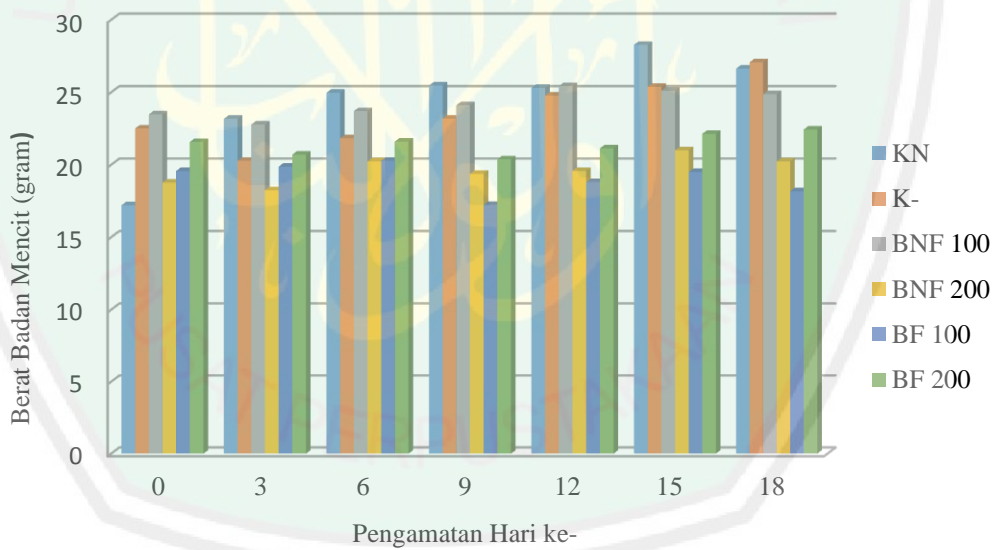
L.6.2 Berat Badan Setelah Terapi Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi

Kelompok	U	Berat Badan Mencit Hari Ke-						
		0	3	6	9	12	15	18
KN	1	18,1	25,7	27,2	28,9	28,9	32,8	33,2
	2	18,0	22,4	24,9	24,9	24,8	27,4	23,7
	3	15,5	21,4	22,8	22,6	22,3	24,6	23,0
	Rata-rata	17,2	23,2	24,9	25,5	25,3	28,3	26,6
K-	1	20,5	17,0	21,7	22,3	22,9	22,8	22,6
	2	20,1	16,9	16,9	16,6	20,5	22,7	24,2
	3	26,9	26,9	26,9	30,6	30,9	30,6	34,4
	Rata-rata	22,5	20,3	21,8	23,2	24,8	25,4	27,1
BNF 100	1	28,5	27,3	30,5	29,2	30,8	31,3	27,7
	2	17,7	16,8	16,2	18,9	20,5	20,2	20,6
	3	24,2	24,2	24,4	24,2	25,0	23,8	26,3
	Rata-rata	23,5	22,8	23,7	24,1	25,4	25,1	24,9
BNF 200	1	15,7	15,6	18,1	18,0	18,5	20,4	19,4
	2	22,4	20,8	23,6	22,9	23,1	23,4	22,7
	3	18,2	18,3	19,0	17,2	17,1	19,2	18,6
	Rata-rata	18,8	18,2	20,2	19,4	19,6	21,0	20,2
BF 100	1	18,4	19,7	20,2	16,1	18,5	19,6	17,1
	2	16,8	17,1	17,8	15,3	16,8	17,6	18,3
	3	23,5	22,8	22,8	20,3	21,1	21,3	19,1
	Rata-rata	19,6	19,9	20,3	17,2	18,8	19,5	18,2
BF 200	1	19,8	18,9	21,6	17,1	19,0	20,8	20,9
	2	26,0	25,0	25,0	24,6	24,6	24,3	25,1
	3	18,9	18,2	18,2	19,4	20,1	21,3	21,3
	Rata-rata	20,7	21,6	20,4	21,1	22,1	22,4	21,6

L.6.3 Grafik Perubahan Berat Badan Sebelum dan Setelah Aklimatisasi



L.6.4 Grafik Perubahan Berat Badan Setelah Terapi Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi



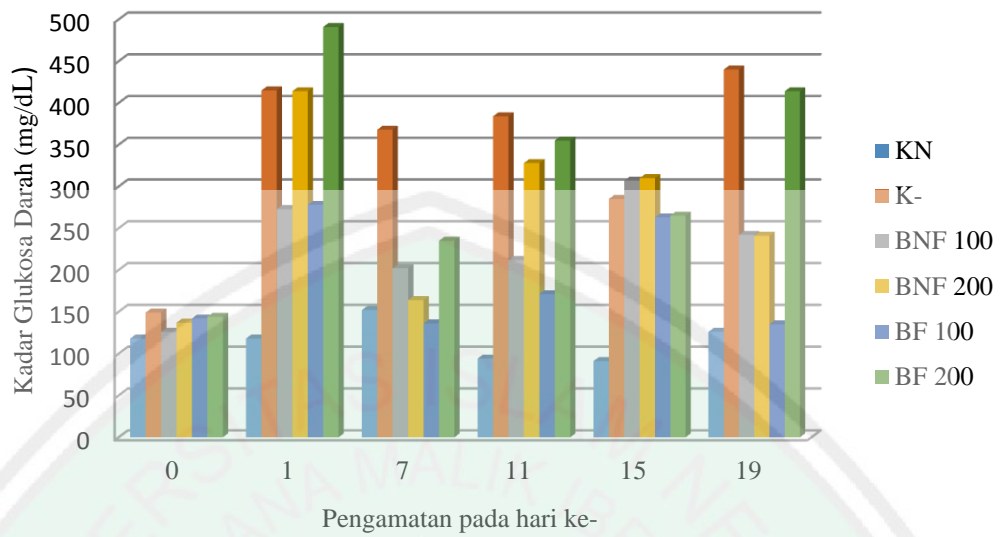
Lampiran 7. Kadar Glukosa Darah
L.7.1 Kadar Glukosa Darah Setelah Induksi Aloksan

Kelompok	U	Kadar Glukosa Darah (mg/dL)			
		Aklimatisasi	Induksi Pertama	Induksi kedua	Induksi ketiga
KN	1	120	-	-	-
	2	120	-	-	-
	3	115	-	-	-
K-	1	149	102	HI	-
	2	146	152	400	-
	3	153	108	113	246
BNF 100	1	182	157	293	-
	2	73	368	324	-
	3	122	141	180	201
BNF 200	1	128	113	470	-
	2	134	90	370	-
	3	153	151	128	402
BF 100	1	177	95	315	-
	2	123	174	225	-
	3	127	114	181	293
BF 200	1	157	114	459	-
	2	151	115	118	427
	3	125	114	144	588

L.7.2 Kadar Glukosa Darah Setelah Terapi Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi

Kelompok	Ulangan	Kadar Glukosa Darah (mg/dL)					
		0	1	7	11	15	19
KN	1	120	120	144	72	94	119
	2	120	120	178	109	91	134
	3	115	115	133	100	88	124
	Rata-rata	118	118	152	94	91	126
K-	1	149	600	367	310	207	583
	2	146	400	157	421	162	340
	3	153	246	579	420	485	398
	Rata-rata	149	415	368	384	285	440
BNF 100	1	182	293	378	223	281	269
	2	73	324	85	288	279	284
	3	122	201	144	126	362	172
	Rata-rata	126	273	202	212	307	242
BNF 200	1	128	470	67	256	190	270
	2	134	370	181	386	171	158
	3	148	402	245	343	569	294
	Rata-rata	137	414	164	328	310	241
BF 100	1	177	315	155	173	127	109
	2	123	225	135	121	179	161
	3	127	293	119	219	484	136
	Rata-rata	142	278	136	171	263	135
BF 200	1	157	459	337	353	239	379
	2	151	427	219	391	410	443
	3	125	588	149	321	145	419
	Rata-rata	144	491	235	355	265	414

L.7.3 Grafik Kadar Glukosa Darah Setelah Terapi Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi



L.7.4 Penurunan Kadar Glukosa Darah Setelah Terapi Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi

$$\text{Rata-rata kadar glukosa darah normal} = \frac{\sum \text{kadar glukosa darah normal}}{n}$$

$$\frac{120+120+115+149+146+153+182+73+122+128+134+148+177+123+127+157+151+125}{18} =$$

136,11

Penurunan Kadar Glukosa Darah

$$= \frac{H1-H19}{H1-136,11} \times 100\%$$

Persentase Penurunan Kadar Glukosa Darah

Kelompok	Ulangan	Kadar Glukosa Darah (mg/dL)			% Penurunan Kadar Glukosa darah (mg/dL)
		0	1	19	
KN	1	120	120	119	-6,21
	2	120	120	134	-11,67
	3	115	115	124	-7,83
K-	1	149	600	583	2,83
	2	146	400	340	15,00
	3	153	246	398	-61,79
BNF 100	1	182	293	269	8,19
	2	73	324	284	12,35
	3	122	201	172	14,43
BNF 200	1	128	470	270	42,55
	2	134	370	158	57,30
	3	148	402	294	26,87
BF 100	1	177	315	109	65,40
	2	123	225	161	28,44
	3	127	293	136	53,58
BF 200	1	157	459	379	17,43
	2	151	427	443	-3,75
	3	125	588	419	28,74

Lampiran 8. Jumlah Sel Hepatosit Mencit

Kelompok	Ulangan	Jumlah Sel Hepatosit		% Kerusakan Sel
		Normal	Nekrosis	
KN	1	75	35	0,47
	2	46	20	0,43
	3	58	36	0,62
	Rata-rata	60	30	0,5
K-	1	3	112	37,33
	2	25	70	2,8
	3	15	36	2,4
	Rata-rata	11	73	6,64
BNF 100	1	31	45	1,45
	2	44	71	1,61
	3	67	28	0,42
	Rata-rata	11	45	4,09
BNF 200	1	9	23	2,56
	2	49	37	0,76
	3	30	62	2,07
	Rata-rata	29	41	1,41
BF 100	1	77	24	0,31
	2	4	59	14,75
	3	10	10	1
	Rata-rata	30	31	1,03
BF 200	1	36	49	1,36
	2	17	54	3,18
	3	22	70	3,18
	Rata-rata	25	58	2,32

Lampiran 9. Hasil Analisis ANOVA

L.9.1 Hasil Uji Normalitas (Saphiro-wilk) Jumlah Sel Hepatosit Mencit

Tujuan : Untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal

Hipotesis: H_0 : Data tidak terdistribusi normal

H_1 : Data terdistribusi normal

Kesimpulan: H_0 diterima apabila nilai signifikansi $\leq 0,05$

H_1 ditolak apabila nilai signifikansi $\geq 0,05$

Tests of Normality

Kelompok		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah sel hepatosit	K (+)	.212	3	.	.990	3	.811
	K(-)	.353	3	.	.824	3	.174
	BNF 100	.239	3	.	.975	3	.696
	BNF 200	.180	3	.	.999	3	.945
	BF 100	.359	3	.	.811	3	.142
	BF 200	.286	3	.	.930	3	.490

Kesimpulan : Nilai signifikansi $\geq 0,05$ yang menunjukkan bahwa data tidak terdistribusi secara normal.

L.9.2 Uji Homogenitas (Uji Levene) pada Jumlah Sel Hepatosit Normal

Tujuan : Untuk mengetahui apakah data mempunyai varian yang sama

Hipotesis : H_0 = Seluruh perlakuan adalah sama

H_1 = Seluruh perlakuan tidak sama

Kesimpulan : H_0 diterima apabila nilai signifikansi $\geq 0,05$

H_0 ditolak apabila nilai signifikansi $\leq 0,05$

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Jumlah sel hepatosit	Based on Mean	2.900	5	12	.061
	Based on Median	.424	5	12	.823
	Based on Median and with adjusted df	.424	5	3.584	.813
	Based on trimmed mean	2.577	5	12	.083

Kesimpulan : Nilai signifikansi $\geq 0,05$ sehingga H_0 diterima dan keseluruhan perlakuan adalah sama.

L.9.3. Hasil Uji ANOVA Jumlah Sel Hepatosit

Tujuan : Untuk mengetahui apakah kelima perlakuan mempunyai rata-rata yang sama

Hipotesis : H_0 : Tidak ada pengaruh perlakuan terhadap jumlah sel hepatosit
 H_1 : Ada pengaruh terhadap jumlah sel hepatosit
 α : 0,05

Kesimpulan : H_0 diterima apabila nilai signifikansi $\geq 0,05$ dan $F_{hitung} \leq F_{tabel}$
 H_0 ditolak apabila nilai signifikansi $\leq 0,05$ dan $F_{hitung} \geq F_{tabel}$

ANOVA

Jumlah sel hepatosit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4139.167	5	827.833	1.770	.194
Within Groups	5611.333	12	467.611		
Total	9750.500	17			

Kesimpulan: Nilai signifikansi $\geq 0,05$ dan nilai F_{hitung} (1,770) $\leq F_{tabel}$ (3,11) sehingga H_0 diterima dan tidak ada pengaruh perlakuan terhadap jumlah sel hepatosit.

Lampiran 10. Dokumentasi

L.10.1 Preparasi Sampel



Bekatul



Pengukuran kadar air



Jamur *Rizhopus oryzae*



Suspensi jamur



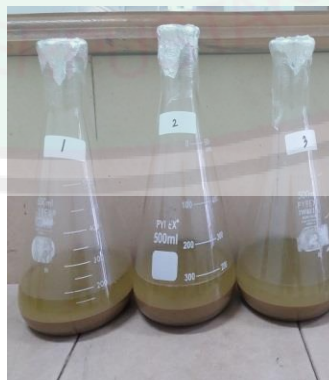
Fermentasi bekatul



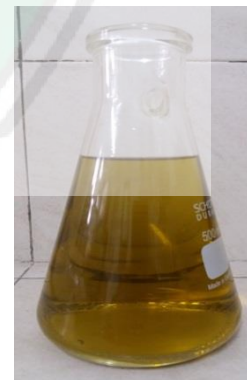
Pengeringan bekatul fermentasi



Sebelum maserasi



Setelah maserasi



Hasil penyaringan



Penghilangan pelarut



Ekstrak pekat bekatul tanpa fermentasi



Ekstrak pekat bekatul terfermentasi

L.10.2 Uji Fitokimia Ekstrak Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi



Alkaloid (Dragendorff)



Alkaloid (Mayer)



Steroid/Terpenoid



Fenolik



Saponin



Flavonoid

L.10.3 Uji Antidiabetes pada Mencit



Kandang mencit



Pemberian pakan dan minum



Pengukuran berat badan



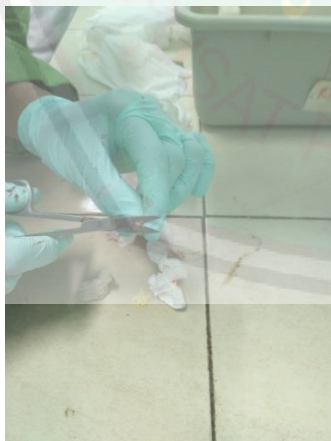
Sprit 1 mL



Larutan aloksan



Injeksi aloksan secara intraperitoneal



Pengambilan darah



Pengukuran Kadar Glukosa Darah



Terapi dengan alat sonde



Larutan CMC Na



Suspensi ekstrak bekatul terfermentasi



Suspensi ekstrak bekatul tanpa fermentasi

L.10.4 Pengamatan Histologi Hepar Mencit



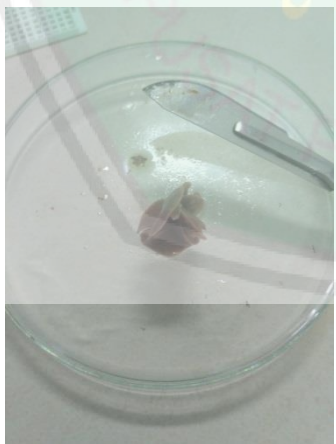
Dislokasi leher



Pembedahan



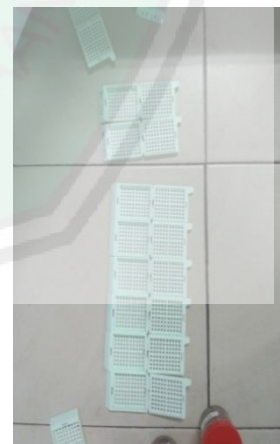
Organ hati



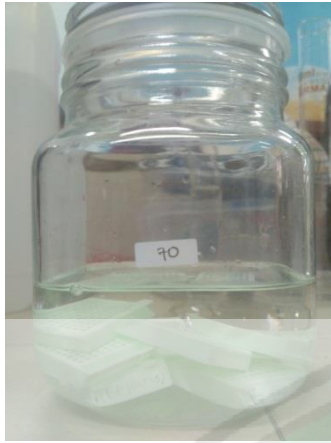
Pemotongan organ



Fiksasi



Kaset preparat



Dehidrasi



Penanaman organ



Blok preparat



Pemotongan peparat

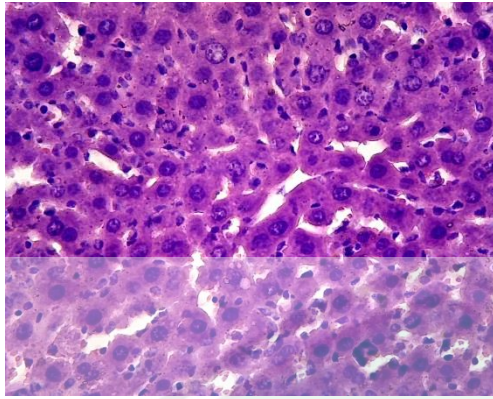


Proses pewarnaan HE

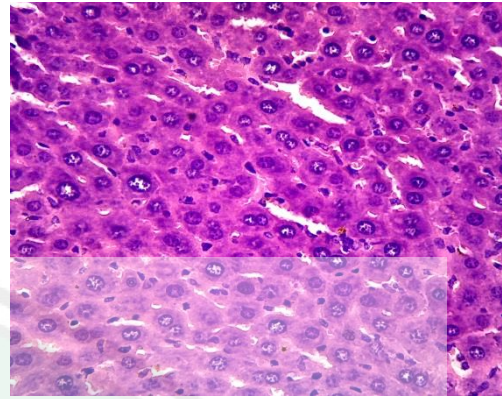


Pengamatan histologi
hepar

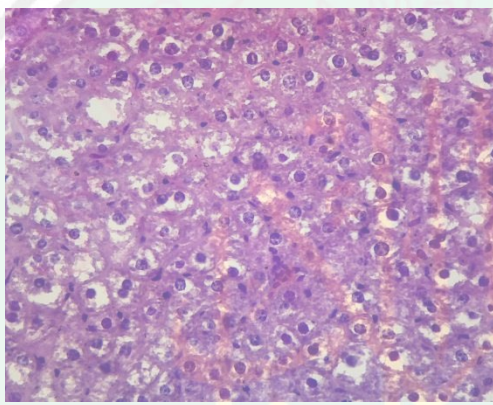
Lampiran 11. Hasil Pengamatan Histologi



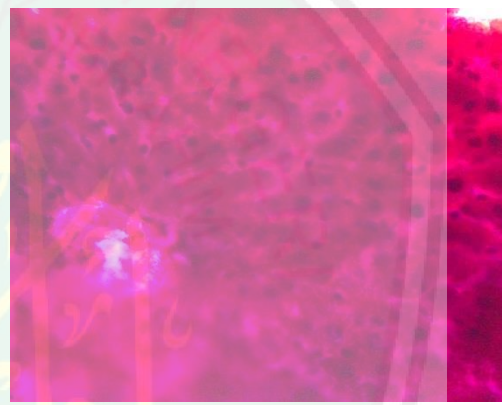
Kontrol Normal 2



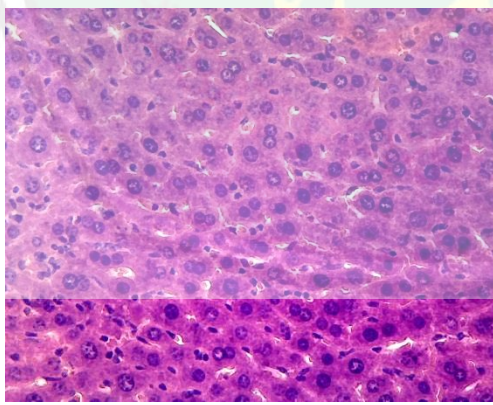
Kontrol Normal 3



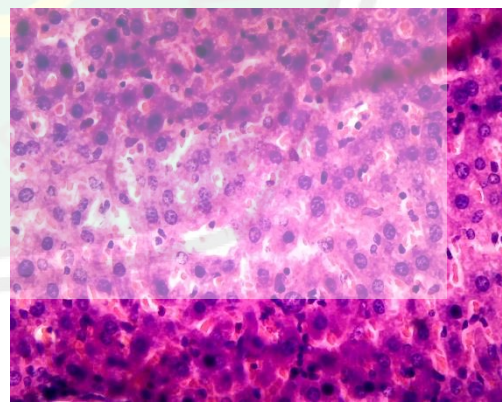
Kontrol Negatif 2



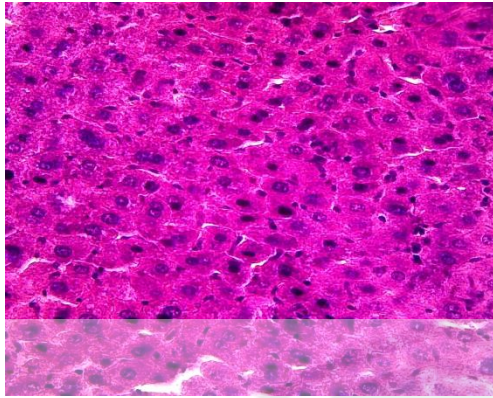
Kontrol Negatif 3



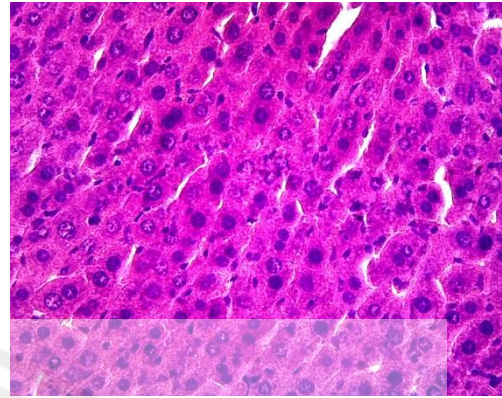
BNF 100 2



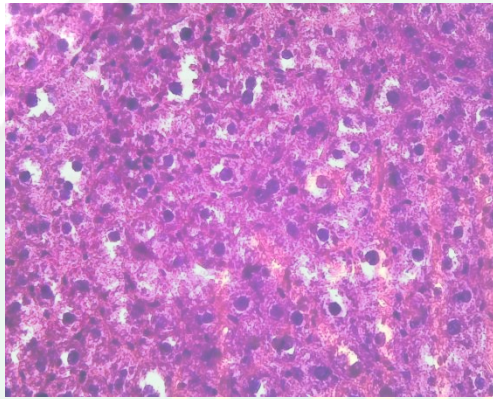
BNF 100 3



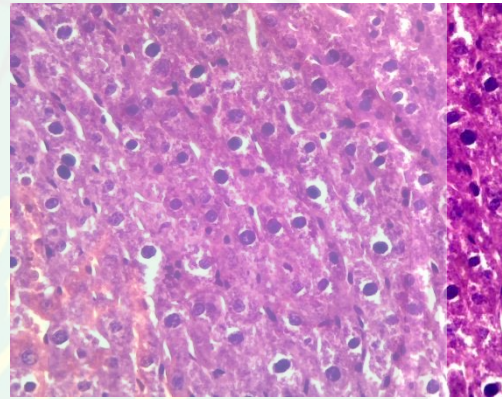
BNF 200 1



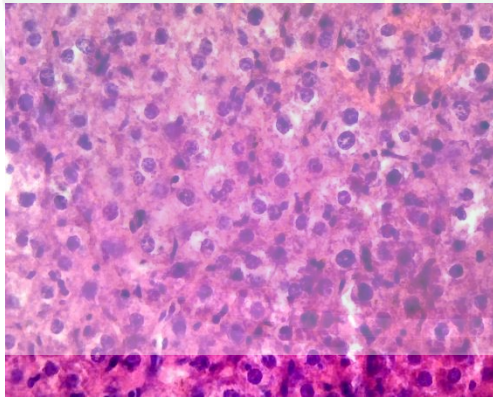
BNF 200 2



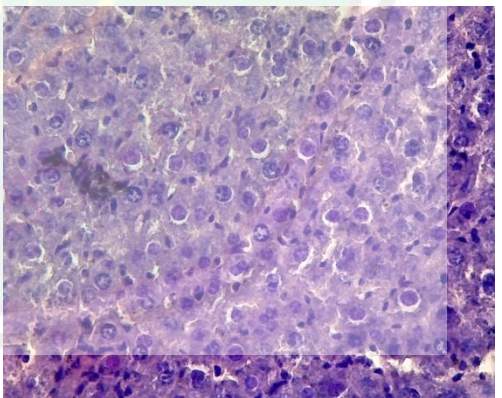
BF 100 2



BF 100 3



BF 200 2



BF 200 3



FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Gedung Klinik UMMI It 2
Jalan Gajayana No. 50, Dinoyo, Kec Lowokwaru, Kota Malang
E-mail: kepk.fkik@uin-malang.ac.id
Website : <http://www.kepk.fkik.uin-malang.ac.id>

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
(ETHICAL CLEARANCE)
No. 027/EC/KEPK-FKIK/2018

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU-ILMU KESEHATAN UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG TELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN :

Judul Identifikasi Senyawa Aktif dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 96% Bekatul (*Rice Bran*) dan Pengaruh Terapinya Terhadap Kadar Glukosa Darah dan MDA (*Malondialdehyde*) Hati, Gambaran Histologi Pankreas, dan Aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) Ginjal Mencit (*Mus Musculus*)

Sub Judul Identifikasi Senyawa Aktif dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 96% Bekatul (*Rice Bran*) dan Pengaruh Terapinya Terhadap Kadar Glukosa Darah dan MDA (*Malondialdehyde*) Hati, Gambaran Histologi Pankreas, dan Aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) Ginjal Mencit (*Mus Musculus*)

Peneliti - Khalimatul Ulyah
- Mar'atus Sholeha
- Nafisatul Fuadah

Unit / Lembaga Program Studi Kimia Fakultas SAINS dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

Tempat Penelitian Laboratorium Hewan Coba Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN TERSEBUT TELAH MEMENUHI SYARAT ATAU LAIK ETIK.

Mengetahui,
Dekan FKIK-UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

Malang, 22 OCT 2018
Ketua



Prof. Dr.dr. Bambang Pardjianto, SpB. SpBP-RE(K)
NIP. 201612011545

dr. Avin Anur F, MBIomed
NIP. 19800203 200912 2 002

- Keterangan:**
- Keterangan Etik Etik Ini berlaku 1 (satu) tahun sejak tanggal dikeluarkan.
 - Pada akhir penelitian, laporan Pelaksanaan Penelitian harus diserahkan kepada KEPK-FKIK dalam bentuk *soft copy*.
 - Apabila ada perubahan protokol dan/atau Perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).