



**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN DOSEN MAHASISWA**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN DANDANG GENDIS
(*Clinacanthus nutans*) TERHADAP KERUSAKAN HEPAR PADA TIKUS YANG
DIINDUKSI STREPTOZOTOSIN**



Identitas Peneliti :


Ketua Peneliti : dr. Putri Wulan Akbar, M.Ked.Trop
NIP. 19860828 201903 2 006
Anggota : (1) Muhamad Daffa Abhista Reviansyah (NIM.19910023)
(2) Nur Alqurratu A'yuni Syukri (NIM. 19910009)
(3) Mahasya Khafiralia (NIM. 19910013)


**UNIT PENELITIAN DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
TAHUN 2022**

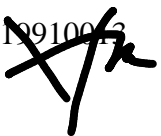
HALAMAN PENGESAHAN

Laporan Penelitian berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Dandang Gendis (*Clinacanthus nutans*) terhadap Kerusakan Hepar pada Tikus yang Diinduksi Streptozotosin” ini disetujui oleh Ketua UPPM UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, pada tanggal 10 September 2022.

Ketua : Nama : dr. Putri Wulan Akbar, M.Ked.Trop
NIP : 19860828 201903 2 006
Tanda Tangan:

Anggota 1 : Nama : Muhamad Daffa Abhista Reviansyah
NIM : 119910023
Tanda Tangan: 

Anggota 2 : Nama : Nur Alqurratu A'yuni Syukri
NIM : 119910009
Tanda Tangan: 

Anggota 3 : Nama : Mahasya Khafiralia
NIM : 119910003
Tanda Tangan: 

Mengetahui,

Dekan FKIK UIN Maulana Malik
Ibrahim Malang,

Ketua UPPM UIN Maulana Malik
Ibrahim Malang,

Prof. Dr. dr. Yuyun Yueniwati P.W.,
M. Kes.,Sp. Rad (K)
NIP. 19681031 1996 012001

Dr. Begum Fauziah, S.Si., M. Farm
NIP. 19830628 2009 122004

PERNYATAAN ORISINALITAS

Kami yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : dr. Putri Wulan Akbar, M.Ked.Trop
NIP : 19860828 201903 2 006
Pangkat/ Gol. : Penata Muda Tk. I/ IIIb
Bidang Keahlian : Kedokteran
Fakultas/ Jurusan : FKIK/ Program Studi Pendidikan Dokter
Jabatan dalam Program : Ketua Pengusul

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa dalam penelitian ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis disebutkan dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka. Apabila dikemudian hari ternyata dalam karya ilmiah ini terbukti terdapat unsur-unsur penjiplakan dan pelanggaran etika akademik, maka kami bersedia mengembalikan dana program yang telah kami terima dan diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, 10 September 2022

Ketua Pengusul



dr. Putri Wulan Akbar, M.Ked.Trop
19860828 201903 2 006

DAFTAR ISI

PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR.....	v
DAFTAR TABEL	vi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 LATAR BELAKANG.....	1
1.2 RUMUSAN MASALAH	3
1.3 TUJUAN PENELITIAN	3
1.4 MANFAAT PENELITIAN	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Diabetes Mellitus.....	5
2.1.1 Definisi dan Klasifikasi	5
2.1.2 Etiopatogenesis	5
2.1.3 Manifestasi Klinis dan Diagnosis	6
2.1.4 Komplikasi.....	7
2.2 Komplikasi Hepar pada Diabetes Mellitus.....	7
2.2.1 Stres Oksidatif pada Diabetes Mellitus.....	7
2.2.2 Malondialdehid	10
2.2.3 Superoksida Dismutase.....	12
2.2.5 Kerusakan Morfologi Hepar pada Diabetes Mellitus	14
2.3 <i>Clinacanthus nutans</i>	17
2.3.1 Taksonomi	17
2.3.2 Morfologi dan Distribusi Geografis.....	17
2.3.3 Penggunaan Tradisional <i>Clinacanthus nutans</i>	18
2.3.4 Kandungan Fitokimia <i>Clinacanthus nutans</i>	18
2.3.5 Aktivitas Farmakologi <i>Clinacanthus nutans</i>	20
BAB 3. METODE PENELITIAN	27
3.1 Desain Penelitian.....	27
3.2 Variabel Penelitian	27
3.3 Definisi operasional.....	28

3.4 Alat dan Bahan Penelitian	28
3.5 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data.....	29
3.5.1 Ekstraksi Daun <i>Clinacanthus nutans</i>	29
3.5.2 Perlakuan Hewan Coba.....	29
3.5.3 Pembuatan Preparat Histopatologi.....	30
3.5.4 Pengukuran Kadar SOD.....	31
3.5.5 Pengukuran Kadar MDA	32
3.6 Analisis Statistik	33
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1 Karakteristik Hewan Coba	34
4.1.1 Berat Badan.....	34
4.1.2 Kadar Glukosa Darah Puasa	36
4.1.3 Berat Organ Hepar	37
4.2 Efek Ekstrak <i>C. nutans</i> pada Kadar SOD Hepar Tikus Model DM.....	38
4.3 Efek Ekstrak <i>C. nutans</i> pada Kadar MDA Hepar Tikus Model DM.....	40
4.4 Efek Ekstrak <i>C. nutans</i> pada Morfologi Hepar Tikus Model DM	41
4.5 Pembahasan	43
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	46
5.1 Kesimpulan.....	46
5.2 Saran	46
DAFTAR PUSTAKA.....	47
LAMPIRAN	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar 4. 1 Berat Badan Tikus Selama Penelitian	34
Gambar 4. 2 Kadar Glukosa Darah Puasa Tikus Selama Penelitian.....	36
Gambar 4. 3 Berat Hepar di Akhir Penelitian	38
Gambar 4. 4 Kadar SOD Hepar	39
Gambar 4. 5 Kadar MDA Hepar	40
Gambar 4. 6 Persentase Kerusakan Morfologi Hepar.....	41
Gambar 4. 7 Gambaran Mikroskopis Hepar (pengecatan HE, perbesaran 400x) .	42

DAFTAR TABEL

Tabel 4. 1 Berat Badan Tikus Selama Penelitian	34
Tabel 4. 2 Kadar Glukosa Darah Puasa Selama Penelitian.....	36
Tabel 4. 3 Berat Hepar di Akhir Penelitian.....	37
Tabel 4. 4 Kadar SOD Hepar	39
Tabel 4. 5 Kadar MDA Hepar.....	40

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Diabetes Mellitus (DM) adalah gangguan metabolisme kronis yang ditandai dengan hiperglikemia yang disebabkan oleh defisiensi sekresi insulin, kerja insulin, atau keduanya (ADA, 2019). Mayoritas kasus DM adalah DM tipe 2, sekitar 90-95% kasus DM (WHO, 2019). Prevalensi global DM berkisar 536,6 juta pada tahun 2021 atau 10,5% penduduk berusia 20-79 tahun dan diperkirakan akan meningkat hingga 783 juta pada tahun 2045 atau 12,2% populasi dunia. Indonesia menempati urutan kelima jumlah penderita DM terbanyak setelah China, India, Pakistan, dan Amerika, dengan prevalensi DM berkisar 19,5 juta pada tahun 2021 dan diperkirakan jumlahnya akan meningkat hingga 28,6 juta pada tahun 2045 (Sun et al., 2022). Mortalitas DM sangat tinggi, diperkirakan mencapai 6,7 juta kematian di seluruh dunia pada tahun 2021. Pengeluaran kesehatan untuk diabetes mengalami peningkatan yang cukup besar dari USD 232 miliar pada tahun 2007 menjadi USD 966 miliar pada tahun 2021, dan diperkirakan akan mencapai satu triliun USD pada tahun 2030 (IDF, 2021).

Hiperglikemia kronis akibat DM menyebabkan berbagai komplikasi, diantaranya komplikasi makrovaskular, seperti penyakit jantung koroner, stroke dan penyakit pembuluh darah perifer, serta komplikasi mikrovaskular, seperti penyakit ginjal stadium akhir, retinopati dan neuropati (Harding et al., 2019). DM juga dikaitkan dengan berbagai spektrum kelainan hepar, mulai dari *nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)*, *nonalcoholic steatohepatitis (NASH)*, sirosis hepatis, karsinoma hepatoseluler, dan gagal hati akut (Ahmadieh & Azar, 2014). Pasien dengan DM memiliki prevalensi penyakit hepar yang tinggi. Studi kohort prospektif menunjukkan lebih dari 80% pasien dengan sirosis hepatis menderita DM (García-compeán et al., 2012). Prevalensi pasien DM yang berkembang menjadi NAFLD sekitar 55,5% dan NASH sekitar 37,3% (Younossi et al., 2019).

Mekanisme yang mendasari komplikasi DM di hepar adalah stres oksidatif. Sebagai jaringan yang sensitif insulin, hepar merupakan salah satu organ yang rentan mengalami stres oksidatif yang diinduksi hiperglikemia (Mohamed et al., 2016). Hiperglikemia menyebabkan aktivasi jalur alternatif untuk metabolisme

glukosa yaitu jalur poliol, heksosamin, aktivasi protein kinase C, glikasi, dan autooksidasi gliseraldehid yang menginduksi produksi ROS (Román-Pintos et al., 2016). Peningkatan ROS menyebabkan oksidasi makromolekul dan kerusakan jaringan hepar (Leung & Nieto, 2013). Peroksidasi lipid pada membran sel menghasilkan produk berupa Malondialdehyde (MDA) yang merupakan penanda stres oksidatif (Tiwari et al., 2013). Stres oksidatif juga memicu disfungsi sistem antioksidan yang menyebabkan penurunan aktivitas faktor transkripsi enzim antioksidan *nuclear factor-erythroid-2 related factor-2* (Nrf2), sehingga menyebabkan kadar Superoksida Dismutase (SOD) menurun (Gonzalez et al., 2020). SOD merupakan lini pertama pertahanan terhadap ROS dengan mengkatalisasi perubahan radikal superoksida menjadi oksigen atau hidrogen peroksida (Younus, 2018).

Modulasi kapasitas antioksidan dengan menggunakan tanaman herbal dapat menjadi alternatif upaya pencegahan komplikasi DM. Pemanfaatan tanaman herbal sebagai obat ini merupakan bukti syukur kepada Allah SWT. yang telah menumbuhkan tanaman dengan beragam jenis dan manfaat. Sebagaimana firman Allah SWT.:

أَو لَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ [الشعراء:7]

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?” (Q.S. Asy-Syu’ara (62):7).

Salah satu tanaman herbal yang berpotensi dikembangkan sebagai antioksidan adalah Dandang Gendis (*Clinacanthus nutans*). *Clinacanthus nutans* banyak dikenal dan digunakan di Asia Tenggara seperti Malaysia, Thailand dan Indonesia sebagai herbal tradisional untuk tujuan pengobatan yang beragam (Alam et al., 2016). Kandungan fitokimia utama dari *C. nutans* diantaranya adalah golongan flavonoid, triterpenoid, steroids phytosterol, dan glikosida (Khoo et al., 2018). Beberapa publikasi menunjukkan bahwa *Clinacanthus nutans* memiliki aktivitas farmakologis diantaranya antioksidan, analgetik, antiinflamasi, antidiabetes, antihiperlipidemia, antikanker, antivirus, antimikroba, antivenom, antifungi, imunomodulator, dan neuroprotektif (Kamarudin et al., 2017, Yeo et al., 2018).

Efek antidiabetik tanaman ini telah dibuktikan dari beberapa penelitian sebelumnya dimana ekstrak daun *C. nutans* dapat menurunkan kadar glukosa darah puasa pada tikus yang diinduksi diabetes (Umar Imam et al., 2019, Dewinta et al., 2020). Belum dijumpai penelitian yang membuktikan manfaatnya untuk memperbaiki kerusakan hepar yang diakibatkan oleh diabetes mellitus. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh ekstrak daun *Clinacanthus nutans* dalam memperbaiki kerusakan hepar pada tikus diabetes yang diinduksi streptozotosin, dimana kerusakan hepar yang diamati adalah stres oksidatif dan gambaran morfologi sel hepar.

1.2 RUMUSAN MASALAH

Adapun rumusan masalah penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah ekstrak etanol 70% daun *Clinacanthus nutans* dapat menurunkan kadar MDA hepar pada tikus DM yang diinduksi streptozotosin?
2. Apakah ekstrak etanol 70% daun *Clinacanthus nutans* dapat meningkatkan kadar SOD hepar pada tikus DM yang diinduksi streptozotosin?
3. Apakah ekstrak etanol 70% daun *Clinacanthus nutans* dapat memperbaiki morfologi hepar pada tikus DM yang diinduksi streptozotosin ?

1.3 TUJUAN PENELITIAN

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk membuktikan bahwa ekstrak etanol 70% daun *Clinacanthus nutans* dapat menurunkan kadar MDA hepar pada tikus DM yang diinduksi streptozotosin.
2. Untuk membuktikan bahwa ekstrak etanol 70% daun *Clinacanthus nutans* dapat meningkatkan kadar SOD hepar pada tikus DM yang diinduksi streptozotosin.
3. Untuk membuktikan bahwa ekstrak etanol 70% daun *Clinacanthus nutans* dapat memperbaiki morfologi hepar pada tikus DM yang diinduksi streptozotosin.

1.4 MANFAAT PENELITIAN

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat diantaranya dapat menambah khasanah keilmuan mengenai pengaruh pemberian *Clinacanthus nutans* terhadap perbaikan kerusakan hepar pada tikus diabetes, menjadi bahan referensi untuk pembelajaran dan penelitian lanjutan yang terkait, serta untuk mengembangkan potensinya sebagai obat herbal yang bermanfaat dalam memperbaiki komplikasi diabetes mellitus.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Mellitus

2.1.1 Definisi dan Klasifikasi

Diabetes melitus (DM) merupakan sekumpulan gangguan metabolik yang ditandai oleh hiperglikemia sebagai akibat dari defek pada sekresi insulin, kerja insulin atau keduanya dan disertai gangguan metabolisme lemak, protein dan karbohidrat, (WHO, 2019). Berdasarkan etiologinya, DM diklasifikasikan menjadi 4 jenis, yaitu 1) DM tipe 1, disebabkan oleh karena penghancuran sel β autoimun, yang menyebabkan defisiensi insulin absolut; 2) DM tipe 2, disebabkan oleh karena hilangnya sekresi insulin sel β yang adekuat secara progresif akibat resistensi insulin; 3) DM tipe spesifik karena penyebab lain, misalnya sindrom diabetes monogenik (diabetes neonatal dan diabetes onset maturitas pada usia muda), penyakit pankreas eksokrin (*cystic fibrosis* dan pankreatitis), dan diabetes yang diinduksi obat atau kimia (penggunaan glukokortikoid, pengobatan HIV/AIDS, atau setelah transplantasi organ); 4) DM gestasional, yaitu DM yang didiagnosis pada trimester kedua atau ketiga kehamilan yang tidak jelas diabetes sebelum kehamilan (ADA, 2021).

2.1.2 Etiopatogenesis

Insiden DM tipe 1 pada masa kanak-kanak telah meningkat, dan usia saat diagnosis telah menurun karena perubahan lingkungan. Defek yang diturunkan pada toleransi imun sentral dan perifer memungkinkan timbulnya respons autoimun terhadap pulau pancreas yang diinisiasi oleh dua jalur utama yaitu autoantibodi insulin dan autoantibodi asam glutamat dekarboksilase. Faktor lingkungan yang mengubah sistem kekebalan, seperti komposisi mikrobiota, infeksi mikroba dan nutrisi, mempengaruhi perkembangan dan jalannya respons autoimun (Ilonen et al., 2019). Autoimun menyebabkan kerusakan sel β pankreas sehingga terjadi defisiensi sekresi insulin. Selain pada sel β pankreas, fungsi sel pankreas yang lain juga menjadi abnormal, misalnya pada sel α terjadi sekresi glukagon yang berlebihan pada pasien DMT1. Kadar glukagon yang berlebihan memperburuk defek metabolik karena defisiensi insulin. Defisiensi insulin menyebabkan peningkatan

kadar asam lemak bebas dalam plasma, yang menurunkan metabolisme glukosa di jaringan perifer seperti otot rangka sehingga mengganggu pemanfaatan glukosa (Banday et al., 2020).

Insiden DM tipe 2 sangat bervariasi tergantung pada etnis dan wilayah geografis. Bangsa Jepang, Hispanik, dan penduduk asli Amerika memiliki risiko tertinggi DM tipe 2. Riwayat keluarga berperan penting pada risiko perkembangan DM, beberapa studi menghubungkan genome dengan sifat poligenik kompleks yang meningkatkan risiko DM tipe 2 melalui efek pada sekresi insulin dan penurunan aksi insulin. Risiko intoleransi glukosa meningkat seiring dengan bertambahnya usia (Galicia-Garcia et al., 2020). Obesitas juga merupakan faktor utama yang berperan pada perkembangan DM tipe 2 karena dapat menginduksi resistensi insulin (Y. Parmar, 2018).

Kondisi nutrisi yang berlebih seperti obesitas akan memicu timbulnya hiperglikemia dan hiperlipidemia. Hiperglikemia dan hiperlipidemia akan menimbulkan peradangan, stres metabolik/oksidatif, stres inflamasi, stres amiloid, dan stres Retikulum Endoplasma (RE) yang menyebabkan terjadinya disfungsi sel β pankreas yang mengakibatkan sekresi insulin berkurang. Penurunan sekresi insulin akan meningkatkan progresifitas hiperlipidemia dan mempengaruhi kerusakan reseptor dan post-reseptor sehingga terjadi resistensi insulin. Resistensi insulin menyebabkan peningkatan produksi glukosa di hati dan penurunan pengambilan glukosa oleh organ sensitif insulin ekstra-pankreas seperti otot, hati, dan jaringan adiposa. Penurunan sekresi insulin dan perkembangan resistensi insulin secara sistemik menyebabkan DM tipe 2 (Ozougwu, 2013).

2.1.3 Manifestasi Klinis dan Diagnosis

Manifestasi klinis muncul pada DM tidak khas, diantaranya keluhan klasik DM yaitu polidipsia, poliuria, polifagia dan penurunan berat badan yang tidak diketahui penyebabnya dan keluhan lain yaitu badan lemas, mata kabur, kesemutan, gatal, disfungsi ereksi pada pria, dan pruritus vulva pada wanita. Diagnosis DM ditegakkan berdasarkan pemeriksaan kadar glukosa darah dengan kriteria 1) Pemeriksaan glukosa plasma puasa ≥ 126 mg/dL; atau 2) Pemeriksaan glukosa plasma ≥ 200 mg/dL 2 jam setelah Tes Toleransi Glukosa Oral (TTGO) dengan

beban glukosa 75 gram; atau 3) pemeriksaan glukosa plasma sewaktu ≥ 200 mg/dL dengan keluhan klasik; atau 4) Pemeriksaan HbA1c $\geq 6,5\%$ (PERKENI, 2021).

2.1.4 Komplikasi

Komplikasi akut DM dapat berupa hipoglikemia dan kegawatdaruratan hiperglikemi. Hipoglikemia yaitu kadar glukosa darah yang rendah (≤ 70 mg/dL) yang biasa terjadi pada pasien penerima sulfoniurea atau insulin. Kegawatdaruratan hiperglikemia dapat berupa Diabetik Ketoasidosis (DKA), Hyperosmolar Hyperglycaemix State (HHS) dan asidosis laktat. Sebagian besar komplikasi akut ini dapat dicegah, akan tetapi kondisi ini masih menjadi penyebab morbiditas dan mortalitas yang tinggi pada penderita diabetes dan berkontribusi signifikan terhadap tingginya morbiditas dan mortalitas diabetes (Harding et al., 2019).

Komplikasi kronis DM umum terjadi, meliputi komplikasi mikrovaskular yaitu penyakit kardiovaskular yang diderita sekitar 27% pasien DM, dan komplikasi mikrovaskuler diantaranya retinopati, nefropati, neuropati, disfungsi ereksi, dan penyakit kaki diabetes yang diderita oleh hamper 50% pasien DM. DM juga dapat meningkatkan risiko gangguan pada sistem muskuloskeletal, hati dan pencernaan, serta gangguan fungsi kognitif dan kesehatan mental, dan dapat meningkatkan insiden beberapa kanker, misalnya kanker hati, pankreas, dan endometrium. Beberapa komorbiditas utama berhubungan dengan DM, seperti penyakit hati berlemak non-alkohol (*non-alkoholic fatty liver disease/ NAFLD*), apnea tidur obstruktif (*obstructive sleep apnoea/ OSA*) dan depresi (Zheng et al., 2018).

2.2 Komplikasi Hepar pada Diabetes Mellitus

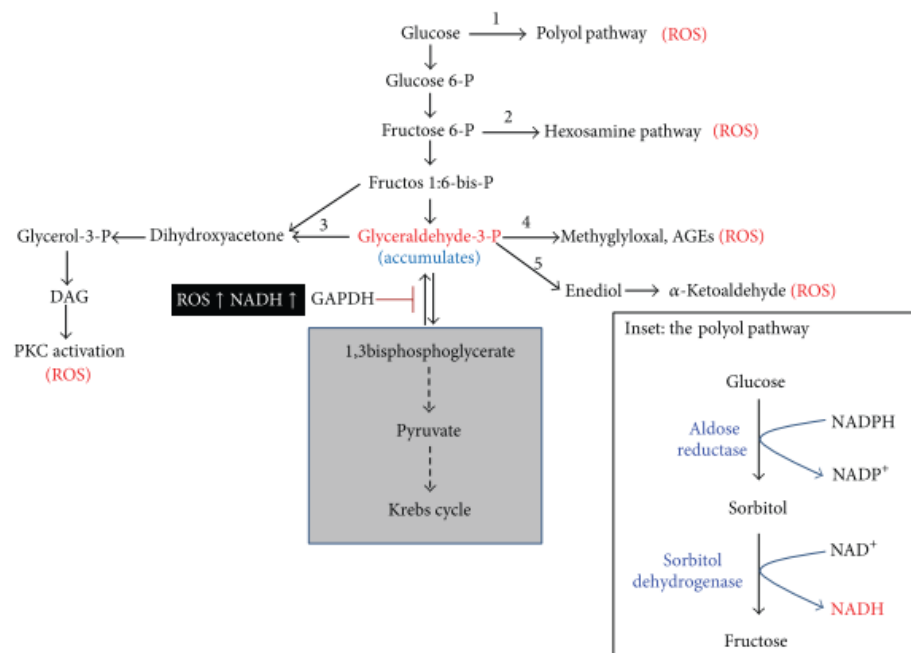
2.2.1 Stres Oksidatif pada Diabetes Melitus

Stres oksidatif terbentuk ketika terjadi ketidakseimbangan antara produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan kapasitas antioksidan, yang menyebabkan fungsi seluler terganggu. ROS adalah produk sampingan dari respirasi seluler yang terdiri dari spesies kimia tidak stabil yang mengandung oksigen, termasuk superoksida dan radikal hidroksil. ROS berperan dalam pensinyalan dan homeostasis sel, tetapi ketika terjadi disregulasi dapat menyebabkan kerusakan

pada makromolekul seluler yang menyebabkan peroksidasi lipid, protein dan asam nukleat (Elsayed Azab et al., 2019).

Peningkatan stres oksidatif berperan penting dalam etiologi DM dan komplikasinya. Pada DM, hiperglikemia persisten merangsang produksi ROS dari berbagai sumber dan menyebabkan pertahanan antioksidan melemah. SOD mengkatalisis konversi O₂⁻ (radikal anion superoksida) menjadi H₂O₂. Dalam kondisi hiperglikemik, sel endotel menghasilkan peningkatan kadar O₂⁻. Overproduksi O₂⁻ dapat menghambat gliseraldehida-3-fosfat dehidrogenase yang merupakan enzim penting dari jalur glikolitik. Hal ini menyebabkan akumulasi glukosa dan metabolit perantara lainnya dari jalur ini dan bergeser ke jalur alternatif lain dari metabolisme glukosa bersama dengan peningkatan produksi produk akhir glikasi lanjut (Younus, 2018).

Jalur pembentukan ROS pada kondisi hiperglikemia digambarkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Pembentukan ROS pada Hiperglikemia (Yan, 2014)

1. Jalur Polioliol

Pada kondisi hiperglikemia, persentase glukosa yang dimetabolisme melalui jalur polioliol meningkat empat hingga lima kali lipat. Pada jalur polioliol, Aldosa

Reduktase (AR) mereduksi glukosa menjadi sorbitol dengan merubah NADPH menjadi NADP⁺ seperti pada Gambar 2.6. Kemudian sorbitol melalui sorbitol dehidrogenase dioksidasi menjadi fruktosa dengan merubah NAD⁺ menjadi NADH. Aktivasi jalur poliol menurunkan NADPH yang penting terhadap pembentukan glutathion, sementara peningkatan NADH memicu pembentukan Gliserol-3-fosfat yang memicu jalur Protein Kinase C (PKC). Fruktosa yang meningkat yang dihasilkan pada jalur poliol juga dapat memicu peningkatan Advance Glycation End Product (AGE) (Katakami, 2017).

2. Jalur Heksosamin

Jalur heksosamin terlibat dalam glikolisis fruktosa-6-P. Jumlah fruktosa-6-P yang meningkat dalam kondisi hiperglikemia akan diubah oleh enzim Glutamin-Fruktosa 6-P Amidotransferase (GFAT) menjadi glukosamin 6-fosfat, yang kemudian diubah menjadi UDP-N-Acetyl glucosamine (UDP-GlcNAc) melalui aktivitas UDP-N-Acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase. Akumulasi UDP-GlcNAc memicu hiperaktivitas O-glukosamin-N-Acetyl transferase, yang dikaitkan dengan peran toksik dan pro-oksidatif jalur heksosamin pada diabetes (Ighodaro & Akinloye, 2018).

3. Jalur Aktivasi Protein Kinase C

Jumlah gliseraldehida-3-fosfat pada kondisi hiperglimia akan meningkat karena terjadi penghambatan gliseraldehida-3-fosfat dehidrogenase (GAPDH). Fruktosa 1:6-bifosfat dapat terurai untuk membentuk dihidroksiaseton fosfat dan gliseraldehida 3-fosfat (Yan, 2014). Baik fruktosa 1:6-bifosfat dan gliseraldehida 3-fosfat akan menyebabkan peningkatan metilglioksal yang mampu meningkatkan Diasilgliserol (DAG), dan selanjutnya peningkatan Protein Kinase C (PKC). PKC mampu meningkatkan ROS intraseluler dan telah dikaitkan dengan disfungsi miokard yang menyebabkan kardiomiopati dan gagal jantung (Shah & Brownlee, 2016).

4. Jalur Produk Akhir Glikasi Lanjutan

Akumulasi gliseraldehida-3-fosfat menyebabkan pembentukan metilglioksal yang memicu defosforilasi nonenzimatik yang menghasilkan metilglioksal yang mampu bereaksi dengan gugus amino protein intraseluler dan ekstraseluler untuk membentuk Advanced Glycation End Products (AGE) (Lazo-

de-la-Vega-Monroy & Fernandez-Mej, 2013). AGE dapat berikatan dengan beberapa reseptor AGE (AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3, dan RAGE) atau berinteraksi secara abnormal dengan komponen matriks ekstraseluler yang menyebabkan pembentukan ROS, yang juga dapat mengaktifkan PKC dengan memicu sintesis Diacylglycerol (DAG) (Ighodaro & Akinloye, 2018).

5. Jalur Autooksidasi Gliseraldehid

Akumulasi gliseraldehid 3-fosfat dapat mengalami autooksidasi yang dapat menimbulkan radikal enediol. Radikal ini mereduksi molekul oksigen untuk menghasilkan radikal superoksida dan menjadi teroksidasi menjadi ketoaldehid yang berperan dalam pembentukan ROS (Ali Khan et al., 2012).

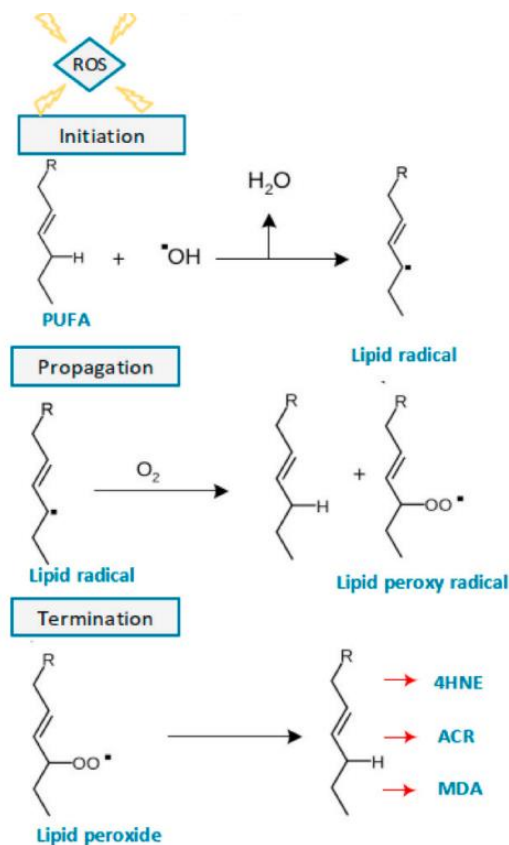
2.2.2 Malondialdehid

Lipid merupakan salah satu target utama ROS. Radikal peroksil dapat menghilangkan hidrogen dari lipid dan menghasilkan hidrogen peroksida yang meningkatkan radikal bebas (Tiwari et al., 2013). MDA adalah produk akhir yang dihasilkan oleh dekomposisi asam arakidonat dan PUFAs (*polyunsaturated fatty acids*) melalui proses enzimatis atau nonenzimatis. Proses enzimatis pembentukan MDA yaitu melalui biosintesis TXA₂ dan HHT (*12-1-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid*), sedangkan proses nonenzimatis yaitu melalui peroksidasi lipid. MDA yang terbentuk akan dimetabolisme dan bereaksi dengan DNA, protein seluler, dan jaringan kemudian menghasilkan produk tambahan yang menyebabkan kerusakan biomolekuler (Ayala et al., 2014).

Stres oksidatif pada DM menyebabkan gangguan pada struktur lipid dan menghasilkan radikal peroksil dan hidroperoksida lipid yang merusak membran sel (Jacobo et al., 2017). Fosfolipid bilayer yang merupakan golongan PUFA sebagai basis komponen membran sel sangat rentan terhadap serangan ROS karena adanya ikatan rangkap antara rantai karbonnya (Al-Rasheed et al., 2017). Peroksidasi lipid dapat mengganggu susunan membran lipid bilayer, menginaktivasi reseptor transmembran dan kerja dari enzim yang terikat dengan membran yang berujung pada meningkatkan permeabilitas seluler dan apoptosis (Birben et al., 2012).

Proses pembentukan peroksida lipid dijelaskan pada Gambar 2.2. Fase inisiasi, dimulai ketika ROS merusak fosfolipid membran sel dan membebaskan

polyunsaturated fatty acids (PUFA) (Al Hroob et al., 2019). Setelah bergabung dengan radikal hidroksil (OH^*), air (H_2O) dilepaskan bersama dengan radikal lipid. Tahap propagasi ditandai dengan reaksi radikal lipid yang tidak stabil dengan oksigen (O_2) dan menghasilkan radikal peroksil (Singh, 2014). Untuk menjadi stabil, molekul-molekul ini memiliki kecenderungan untuk bereaksi lebih lanjut dengan atom hidrogen dari lipid dalam membran sel, sehingga memicu reaksi berantai yang terus merusak membran fosfolipid bilayer. Produk akhir yang stabil terbentuk ketika terjadi fase terminasi dan menghasilkan produk akhir seperti 4-hidroksinonenal (4HNE), malondialdehid (MDA), dan akrolein (ACR) (Evans et al., 2021). MDA telah digunakan secara luas sebagai biomarker kerusakan lipid yang dimediasi oleh stres oksidatif. Kadar MDA dapat diukur dengan metode TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substance*) menggunakan spektrofotometer (Ore & Akinloye, 2019).



Gambar 2.2 Mekanisme Pembentukan Peroksida Lipid (Lorente et al., 2013).

2.2.3 Superoksida Dismutase

Antioksidan adalah mekanisme pertahanan tubuh untuk menetralkan radikal bebas di dalam tubuh sebelum terjadi kerusakan sel (Gupta, 2015). Pertahanan antioksidan terjadi melalui beberapa mekanisme diantaranya adalah: 1) Memblokir produksi radikal bebas, 2) mengais radikal bebas, 3) mengubah radikal bebas toksik menjadi zat yang kurang toksik, 4) Menghambat produksi metabolit toksik sekunder dan mediator inflamasi, 5) memblokir propagasi rantai oksidan sekunder, 6) memperbaiki molekul yang rusak, 7) inisiasi dan peningkatan sistem pertahanan antioksidan endogen (Elsayed Azab et al., 2019).

Sistem antioksidan dalam tubuh manusia terdiri dari antioksidan non-enzimatik dan enzimatik. Antioksidan non enzimatik diantaranya Glutathion, Alpha-lipoic acid, Coenzyme Q, Ferritin, asam urat dan bilirubin. Sedangkan enzim antioksidan yang diproduksi tubuh diantaranya adalah sebagai berikut:

1. Superoksida dismutase (SOD) berfungsi mengkatalisis dismutasi dua molekul anion superoksida (HAI_2^-) diubah membentuk hidrogen peroksida (H_2HAI_2) dan molekul oksigen (O_2), akibatnya membuat anion superoksida yang berbahaya menjadi kurang berbahaya bagi tubuh (Ighodaro & Akinloye, 2018). Superoksida dismutase mengubah radikal peroksida (O_2^-) yang bersumber dari faktor lingkungan dan respirasi seluler menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2), yang masih reaktif.
2. Katalase (CAT) melakukan katalisis peroksida dengan menggunakan satu elektron donor yaitu molekul H_2O_2 dan satu akseptor seperti molekul H_2O_2 sehingga terdapat dua molekul H_2O_2 . Pada eritrosit dan jaringan lain dua molekul H_2O_2 membentuk 2 H_2O dan O_2 .
3. Glutation peroksidase (GPx) juga sebagai katalisis peroksida H_2O_2 dan lipid hidroperoksida dengan menggunakan glutation tereduksi (GSH) untuk menjaga lipid membran dan hemoglobin dari serangan oksidasi H_2O_2 , sehingga tidak terjadi hemolisis akibat peroksida. H_2O_2 yang tidak membentuk H_2O dapat diubah menjadi radikal hidroksil reaktif (OH). Radikal hidroksil bersifat berbahaya dan reaktif jika bereaksi dengan logam karena dapat mengakibatkan kerusakan sel akibat peroksidasi lipid, DNA dan protein yang bersifat reaktif dan berbahaya (Aguilar et al., 2016).

Superoxide dismutase (SOD), merupakan pertahanan lini pertama untuk melawan ROS. Superoksida dismutase adalah *metalloenzyme* yang membutuhkan kofaktor logam untuk aktivitasnya. Ion logam yang biasanya berikatan dengan SOD adalah tembaga (Cu), mangan (Mn), besi (Fe) dan seng (Zn). Fungsi SOD adalah menjaga sel tubuh dari dampak radikal oksigen yang tinggi, radikal bebas dan senyawa-senyawa berbahaya yang menyebabkan kematian sel serta menjaga kesehatan sel (Ighodaro & Akinloye, 2018). Superoksida adalah senyawa berbahaya dan berperan penting terhadap patogenesis diabetes melitus. Antioksidan terbanyak didalam tubuh adalah SOD. Superoksida dismutase mampu mengubah superoksida menjadi senyawa yang tidak berbahaya atau kurang toksik dengan memecah molekul oksigen yang memiliki potensi bahaya jika berada di dalam sel sehingga mengurangi efek toksik senyawa tersebut (Tiwari et al., 2013).

Antioksidan kuat yang berada di dalam organ hepar salah satunya adalah SOD yang berfungsi melindungi sel-sel hati dari kerusakan oksidatif dan menetralkan radikal bebas. Pada keadaan hiperglikemia, produksi ROS meningkat yang mengakibatkan penurunan aktivitas Nrf2, sehingga menginduksi antioksidan endogen seperti SOD. Kombinasi peningkatan pelepasan ROS dan penurunan aktivasi SOD menyebabkan kerusakan hati yang diinduksi stres oksidatif (Mohamed et al., 2016). SOD dapat diklasifikasikan menjadi 3 jenis, yaitu 1) SOD 1 (Cu/Zn-SOD), berada di sitoplasma intraseluler dan mengandung tembaga dan seng, bekerja untuk mengubah superoksida menjadi hidrogen peroksida. Ketika terjadi kenaikan ROS maka SOD 1 memberikan persinyalan oksidatif, SOD 1 dengan cepat berpindah ke dalam nukleus untuk menjaga kestabilan genom; 2) SOD 2 (Mn-SOD), berada di mitokondria dan mengandung mangan, bekerja dengan menangkap dan mengubah radikal bebas menjadi zat yang kurang reaktif di dalam sel; 3) SOD 3 (EC-SOD), berada di ekstraseluler dan mengandung tembaga dan seng, bekerja di permukaan sel dan berguna menjaga sel dari efek stres oksidatif. Superoksida dismutase tiga merupakan enzim antioksidan yang berperan sebagai pertahanan antioksidan utama terhadap penyakit pembuluh darah, kardiovaskular, penyakit neurologis, penyakit paru-paru, aterosklerosis, diabetes, hipertensi, dan kondisi inflamasi (Fakhrudin et al., 2017).

2.2.5 Kerusakan Morfologi Hepar pada Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus menyebabkan akumulasi berlebihan dari sel-sel lemak di hepar yang mengakibatkan perlemakan hati (NAFLD). Sekitar 2-3% pasien NAFLD mengalami peradangan, nekrosis dan fibrosis hepar, yang merupakan gejala steatohepatitis non-alkoholik (NASH) (Romagnoli et al., 2010). Hepar yang rusak dapat berkembang menjadi sirosis, yang kemudian dapat memicu karsinoma hepatoseluler dan pada akhirnya dapat menjadi gagal hati (Cohen et al., 2011). Prevalensi NAFLD pada pasien DM tipe 2 lebih dari 2 kali lebih tinggi dibandingkan populasi umum, yaitu sekitar 55,5%. Sedangkan prevalensi NASH pada pasien dengan DM tipe 2 adalah 37,3%. Dari jumlah tersebut yang melakukan biopsi hepar diketahui 17% diantaranya mengalami perkembangan menjadi fibrosis (Younossi et al., 2019).

Hepar berperan penting dalam mengatur kadar glukosa. Resistensi insulin di hati akan menyebabkan hiperglikemia dan gangguan metabolisme glukosa. Bahkan pada kondisi hiperglikemik yang parah, hepar tidak mendeteksi ketersediaan glukosa sehingga memproduksi glukosa lebih banyak melalui modulasi beberapa enzim seperti glukosa-6-fosfat dehidrogenase, fruktosa-1,6-difosfat, heksokinase dan glukokinase (Crawford, 2009). Produksi glukosa berlebihan di hepar dapat meningkatkan oksidasi asam lemak dan sintesis trigliserida. Defisiensi insulin meningkatkan hormon-sensitif lipase (HSL) di jaringan adiposa yang menyebabkan peningkatan lipolisis dan sirkulasi asam lemak bebas yang akan terakumulasi di hepar (Al-Hussaini et al., 2012). Akumulasi lipid di hepar akan menyebabkan resistensi insulin dan peningkatan sitokin pro-inflamasi, seperti leptin dan TNF- α , yang berkontribusi pada terjadinya stres oksidatif (Regnell & Lernmark, 2011).

Hiperglikemia memicu glikasi protein dan autoksidasi glukosa yang menghasilkan radikal bebas (ROS). Produksi ROS yang berlebih menyebabkan oksidasi lipid, protein dan karbohidrat, serta menginduksi apoptosis pada hepatosit dan pelepasan sitokin inflamasi yang menyebabkan kerusakan jaringan hepar (Leung & Nieto, 2013). Pada kondisi hiperglikemik terjadi penurunan aktivitas enzim antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT) dan glutathion (GSH) (Abolfathi et al., 2012).

Diabetes Melitus menyebabkan kelainan hepar antara lain kerusakan hepatosit, steatosis, dan fibrosis. Pertama diawali dengan kerusakan hepatosit, Mekanisme resistensi insulin dapat meningkatkan stres oksidatif dan mengaktivasi sinyal inflamatorik kemudian mekanisme tersebut dapat mengarah kepada kerusakan hepar. Kedua dilanjutkan dengan pembentukan gambaran steatosis, gambaran steatosis yang disertai dengan degenerasi balon dan inflamasi lobus dapat menentukan keadaan non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Ketiga yaitu fibrosis, fibrosis sebagai respon multi-seluler dapat muncul akibat adanya kerusakan hepar dengan kematian sel hepar. Kerusakan hepar akut dapat dipicu oleh inflamatorik dan kaskade fibrogenik dengan aktivasi sel stellata hepatik (HSC) yang merupakan sumber utama pembentukan matriks ekstraseluler (ECM) yang kaya akan kolagen. Tujuan pembentukan ini untuk mempertahankan arsitektur dan fungsi organ hepar setelah mengalami kerusakan yang serius. Jika dalam penyembuhan luka pada organ hepar berkepanjangan akibat pemicu kerusakan tidak dapat dihilangkan, maka inflamasi akan menjadi kronik dan pembentukan fibrosis tidak hanya mempengaruhi sel hepar saja tetapi juga akan berdampak pada arsitektur vaskuler (Ramadan et al., 2022).

Hati merupakan organ penting dalam mengatur kadar glukosa dalam keadaan fisiologis dan patologis seperti DM. Pada DM tipe 2, resistensi insulin di hati akan menyebabkan hiperglikemia dan distorsi lebih lanjut dari glukosa metabolisme. Hati juga mengatur homeostasis glukosa dengan memodulasi ekspresi berbagai jenis gen yang mengkode protein sekretori. Berbagai jenis hepatokin melalui jalur yang berbeda mengaktifkan mekanisme umpan balik positif atau negatif untuk mengontrol proses metabolisme. Resistensi insulin menyebabkan adiposit perifer mengalami lipolisis. Asam lemak bebas kemudian dilepaskan ke aliran darah dan akhirnya menumpuk di hati. Pada saat yang sama, adipositokin melepaskan faktor nekrosis tumor- α dan leptin, memperburuk kerusakan hepatosit dengan meningkatkan stres oksidatif di mitokondria. Aksi gabungan stres oksidatif mitokondria, hiperinsulinemia dan hiperglikemia menghasilkan radikal bebas yang pada gilirannya menginduksi peradangan dan nekrosis seluler. Peradangan jaringan merangsang sel-sel stellata hati untuk memproduksi kolagen, yang menyebabkan fibrosis, sirosis dan, akhirnya, karsinoma hepatoseluler. Sebuah peningkatan stres

oksidatif mitokondria juga akan menyebabkan kerusakan mutasi DNA dan memicu serangkaian efek merusak pada rantai pernapasan mitokondria dengan memproduksi spesies oksigen reaktif (ROS). Lingkaran setan ini akan meningkat secara eksponensial ke tingkat yang tidak sesuai, yang akan dilawan oleh umpan balik fisiologis normal dan dengan demikian menyebabkan kerusakan hati. Hiperinsulinemia dapat menurunkan regulasi adiponektin, yang mengarah ke lipogenesis hati dan selanjutnya menurunkan oksidasi asam lemak bebas. Dengan demikian, hiperinsulinemia dapat bertindak sebagai kontributor utama perkembangan kerusakan hati (Mohamed et al., 2016).

Nekrosis pada hepatosit ditandai dengan nukleus mengkerut, nukleus pecah menjadi beberapa fragmen, lisis nukleus, dan membrane sel sehingga batas tidak jelas. Derajat kerusakan hepatosit dinilai dengan grading. Pengamatan preparat dievaluasi menggunakan mikroskop optik dengan perbesaran 400 kali dan menggunakan 5 lapang pandang. Skoring dilakukan pada masing masing lapang pandang (Andreas et al., 2015).

Perubahan histopatologi yang menonjol pada hepar pasien dengan DM meliputi akumulasi lemak di vesikel menggantikan sitoplasma hati, yang dikenal sebagai steatosis mikrovesikular. Selanjutnya apabila kelebihan lipid merusak nukleus, maka akan berkembang menjadi steatosis makrovesikular. Selain nukleus terglukogenasi, ciri-ciri lain yang menonjol dari steatosis meliputi limfositik ringan, neutrofilik dan infiltrat inflamasi lainnya. Steatohepatitis dan NASH dikenali dengan adanya steatosis hepatoseluler, peradangan lobular dan berbagai tingkat fibrosis periseluler, perisinusoidal dan periportal, termasuk sirosis. Gambaran lainnya meliputi pembengkakan hepatosit, berbagai tingkat nekrosis hepatosit dan adanya badan Mallory. Perubahan degeneratif ditandai dengan vakuolasi hepatosit di area sentrizonal sel dan perbedaan ukuran ruang nukleus dan sinusoidal yang melebar (Guyen et al., 2006).

Sirosis menunjukkan gambaran histologis utama yaitu pembentukan nodul makro dan mikro, jembatan septum fibrosa dan gangguan arsitektur hepar. Retikulum endoplasma kasar berkurang secara signifikan pada DM. Selain itu, terjadi peningkatan volume mitokondria dengan kepadatan krista mitokondria yang

sangat berkurang, inti piknotik dengan membran inti yang rusak dan perluasan area perinuklear (Lucchesi et al., 2015).

2.3 *Clinacanthus nutans*

2.3.1 Taksonomi

Taksonomi dan klasifikasi *Clinacanthus nutans* adalah sebagai berikut:

Kingdom: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Subclass: Asteridae

Order: Lamiales

Family: Acanthaceae

Genus: Clinacanthus

Species: nutans—Lindau

Scientific name: Clinacanthus nutans Lindau (L. T.-H. Tan et al., 2020).

Tanaman ini memiliki sejumlah sinonim yang mencakup *Clinacanthus burmannii* Nees., *Clinacanthus burmannii* var. *robinsonii* Benoist dan *Justicia nutans* Burm. f. (Aslam et al., 2015). Tanaman ini juga dikenal di beberapa negara dengan nama umum diantaranya belalai gajah atau *sabah snake grass* di Malaysia, *phaya yo* atau *phaya plongtong* di Thailand, *Alligator flower* atau *e zui hua* di Cina, *yudunsou* (Jepang), *yōuduncho* (Korea), *mảnh công* atau *xuong khi* (Vietnam). Di Indonesia dikenal dengan nama ki tajam (Sunda), dandang gendis (Jawa), gendis (Jawa Tengah) (Aslam et al., 2015, Kosai et al., 2016).

2.3.2 Morfologi dan Distribusi Geografis

Clinacanthus nutans berasal dari wilayah tropis Asia Tenggara, yaitu Malaysia, Thailand, Indonesia, Vietnam dan juga dapat ditemukan di wilayah selatan Cina, seperti Guangdong, Guangxi, Hainan dan Yunnan (Arullappan et al., 2014). *Clinacanthus nutans* merupakan tanaman perdu berukuran kecil dengan tingginya bisa mencapai sekitar 1–3 m dan bercabang. Batangnya berbentuk silinder, sedangkan tangkai daunnya ganda dengan panjang sekitar 3-20 mm (Gunasekaran, 2014, Fong et al., 2014). Daun tanaman ini berwarna hijau pucat,

berbentuk lonjong sempit dengan pucuk tajam, panjang daun 2–12 cm dan lebar 0,5-1,5 cm. Terdapat 6-7 pasang garis yang tampak menonjol pada permukaan daun dan ditutupi oleh bulu halus. Tanaman ini merupakan angiospermae dengan bunga yang muncul di bagian atas dari cabang berwarna merah dengan garis kuning di bagian bawah dan dasar hijau (Kamarudin et al., 2017, Tan et al., 2020). *Clinacanthus nutans* biasanya dibudidayakan dengan stek batang, akan tetapi dapat ditemukan liar di hutan tropis (Gunasekaran, 2014).



Gambar 2.3. Morfologi *Clinacanthus nutans*
Keterangan: (a) bunga, (b) daun
Sumber: Kamarudin et al. (2017)

2.3.3 Penggunaan Tradisional *Clinacanthus nutans*

Clinacanthus nutans adalah tanaman herbal yang banyak dimanfaatkan di Asia Tenggara untuk berbagai tujuan pengobatan. Secara tradisional digunakan dalam beberapa cara untuk pengobatan infeksi herpes, kanker, diabetes, peradangan, dan berbagai masalah kulit (Alam et al., 2016). Nama rumput ular sabah diyakini berasal dari aplikasinya sebagai antivenom ular berbisa di kalangan praktisi tradisional (Kamarudin et al., 2017). Daun *C. nutans* dapat dikonsumsi sebagai sayuran mentah atau dicampur dengan jus seperti apel, tebu, atau teh hijau. Daun kering tanaman ini bisa direndam dalam air panas dan disajikan sebagai teh. Saat ini banyak produk *C. nutans* yang beredar di pasaran dalam bentuk teh herbal, kapsul, tablet dan ekstrak tanaman (Shim et al., 2013).

2.3.4 Kandungan Fitokimia *Clinacanthus nutans*

Bagian tanaman, metode pengeringan dan metode ekstraksi menghasilkan kisaran senyawa antioksidan yang bervariasi dan menunjukkan aktivitas antioksidan yang berbeda. Ekstrak *C. nutans* dengan pelarut etanol 70% menunjukkan kadar phenolik total bagian daun (3.19–7.29 mg GAE/g dw) lebih

baik dari pada batang (1.04–2.24 mg GAE/g dw). Metode ekstraksi dengan sonikasi dan metode pengeringan dengan oven dan udara menunjukkan kadar phenolik total dan aktivitas antioksidan yang lebih baik dibandingkan dengan metode perendaman dan pengeringan beku (Khoo et al., 2015).

Uji fitokimia menunjukkan bahwa *C. nutans* mengandung berbagai macam senyawa bioaktif terutama daun dan batangnya. Kandungan metabolit sekunder pada *C. nutans* berhubungan dengan umur tanaman karena mempengaruhi kandungan fenolik dan flavonoid, dimana konsentrasi metabolit sekunder paling tinggi didapatkan pada umur tanaman 6 bulan (Ghasemzadeh et al., 2014). Teknik ekstraksi juga berpengaruh signifikan terhadap jenis komponen kimia yang akan diekstraksi dari tanaman. Ekstraksi soklet karbon dioksida subkritis lebih selektif untuk menghasilkan senyawa kimia dari fenolik dan terpenoid, sehingga meningkatkan potensi antioksidan (Alam et al., 2017).

Clinacanthus nutans memiliki kandungan flavonoid C-glikosida yang diisolasi dari ekstrak etanol dan methanol yaitu *vitexin*, *isovitexin*, *schaftoside*, *isomollupentin*, *7-O-b-glucopyranoside*, *orientin* dan *isoorientin*, yang menunjukkan efek sebagai antioksidan, antiinflamasi, antivirus, antidiabet dan hepatoprotektif (Chelyn et al., 2014). *Clinacanthus nutans* memiliki kandungan fitosterol meliputi *stigmasterol*, *lupeol*, dan *beta-sitosterol* yang diketahui memiliki efek menurunkan kolesterol dan kandungan terpenoid yaitu *betulin*, yang memiliki efek anti tumor, anti HIV, antibakteri, antiinflamasi dan antimalarial (Teoh et al., 2017)(Sami et al., 2006). Komponen lain yang diisolasi ekstrak metanol *Clinacanthus nutans* yaitu 5 glukosida yang mengandung sulfur yaitu *clinacoside A*, *B*, *C*, *cycloclinacoside A1*, *A2* (Teshima et al., 1998) serta 2 gliserolipid yaitu *trigalactosyl* dan *digalactosyl diglycerides* (Janwitayanuchit et al., 2003).

Kandungan lipid yang terdiri dari 9 serebrosida dan monoasilmonogalaktosil gliserol diisolasi dari fraksi etil asetat dari ekstrak etanol *C. nutans* (Tuntiwachwuttikul et al. 2004). Terdapat delapan senyawa yang berhubungan dengan klorofil a dan klorofil b yang diisolasi dari ekstrak kloroform daun *Cinacanthus nutans* yaitu *132-hidroksi-(132-S)-klorofil b*, *132-hidroksi-(132-R)-klorofil b*, *132-hidroksi-(132-S)-phaeophytin b*, *132-hydroxy-(132-R)-phaeophytin b*, *132-hydroxy-(132-S)-phaeophytin a*, *132-hydroxy-(132-R)-phaeophytin a*,

purpurin 18 phytol ester dan *phaeophorbide-a* (Sakdarat et al., 2009). Selain itu juga diisolasi dari ekstrak etanol *C. nutans* sebanyak 4 komponen yang mengandung sulfur yaitu *clinamides A, B, C* dan *2-cis-entadamide* (Tu et al. 2014), serta komponen lain yaitu *gendarucin A, gendarucin A isomer, 3,3-di-O-methylelagic acid, ascorbic acid* dan 2 isomer *oxoprolinate* (Khoo et al., 2015). Analisis GCMS dari fraksi dichloromethane ekstrak methanol *Clinacanthus nutans* didapatkan komponen yaitu *palmitic acid* dan *linolenyl alcohol* yang memiliki aktivitas antiproliferatif (Ismail et al., 2020). Ekstrak etanol daun *C. nutans* juga memiliki kandungan kompleks polisakarida-peptida *CNP 1-2* (Huang et al., 2016).

2.3.5 Aktivitas Farmakologi *Clinacanthus nutans*

1. Aktivitas antivirus dan antibakteri

Clinacanthus nutans diketahui memiliki aktivitas antivirus terhadap HSV-1 dan HSV-2, dimana ekstrak n-metana menunjukkan penghambatan paling kuat terhadap HSV-1 dengan IC₅₀ 37,39 µg/mL, sedangkan ekstrak metanol menunjukkan penghambatan paling kuat terhadap HSV-2 dengan IC₅₀ pada 65.13 µg/mL (Kunsorn et al., 2013). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat *C. nutans* terbukti efektif dalam menghambat pembentukan plak HSV-1 dengan IC₅₀ 7,6 µg/mL (Thongchai et al., 2008, Sakdarat et al., 2009). Fraksi etanol ekstrak daun *C. nutans* dapat menghambat HSV-2 secara signifikan pada dosis 200 µg/mL. Efek ini terjadi melalui mekanisme inaktivasi protein permukaan struktural virus yang penting untuk perlekatan virus HSV oleh senyawa aktif dalam ekstrak (Vachirayonstien et al. 2010). Uji klinis terhadap 60 pasien yang terinfeksi herpes zoster dengan krim ekstrak *C. nutans* menunjukkan perbaikan dalam waktu 7-14 hari (Sangkitporn et al. 1995).

Clinacanthus nutans dapat digunakan untuk pencegahan infeksi human papilloma virus (HPV). Penelitian menunjukkan bahwa ekstrak *C. nutans* dapat menghambat infeksi awal HPV dengan mengikat langsung reseptor sel inang atau partikel HPV16 dan menghambat internalisasi HPV oleh sel inang (Sookmai et al., 2011). Senyawa klorofil yang diisolasi dari daun *C. nutans* terbukti memiliki aktivitas anti-dengue dengan menghambat replikasi virus dengue sero-tipe 2 (DENV-2) selama pasca-inkubasi pada sel A549 dengan IC₅₀ 25 µg/mL (Sakdarat

et al., 2010). Penelitian lain pada sel Huh-7 menunjukkan bahwa ekstrak etanol 80% *C. nutans* memiliki aktivitas anti virus dengue terhadap strain DENV-216681 dengan IC50 31,04 µg / mL (Tu et al., 2014).

Ekstrak etil asetat *C. nutans* terbukti dapat menghambat pertumbuhan *Bacillus cereus* dan *C. albicans* dengan konsentrasi hambat minimum sebesar 1,39 mg/mL. Ekstrak tersebut lebih efektif dalam menghambat bakteri gram positif dibandingkan dengan bakteri gram negatif (*E. coli* dan *Salmonella typhimurium*) karena senyawa fenolik dalam ekstrak mampu menembus melalui lapisan peptidoglikan bakteri gram positif lebih mudah dibandingkan lipopolisakarida dari bakteri gram negatif (Arullappan et al., 2014). Sedangkan ekstrak metanol *C. nutans* diketahui memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *E. coli* dengan konsentrasi hambat minimum sebesar 12,5 mg / mL (Yang et al., 2013).

2. Aktivitas Antivenom

Secara tradisional *C. nutans* telah digunakan untuk mengobati gigitan serangga dan ular, akan tetapi penelitian menunjukkan tidak ada aktivitas antivenom terhadap neurotoksin Naja naja siamensis (Cherdchu et al., 1977). Penelitian tentang potensi penghambatan ekstrak *C. nutans* terhadap pengikatan antibodi anti-ular kobra ke bisa ular kobra menunjukkan aktivitas rendah yaitu 35% (Daduang et al., 2005). Demikian juga, ekstrak *C. nutans* terhadap bisa anti-Apis mellifera (lebah) menunjukkan aktivitas yang rendah (Uawonggul et al., 2011). Sedangkan aktivitas antivenom yang lebih efektif didapatkan dari ekstrak air daun *C. nutans* terhadap bisa *Heterometrus laoticus* (kalajengking) dengan efisiensi 46,51% pada konsentrasi 0,706 mg/mL (Uawonggul et al., 2006).

3. Antiinflamasi dan Imunomodulator

Clinacanthus nutans telah digunakan secara tradisional untuk mengurangi inflamasi dan beberapa hasil penelitian mendukung efek ini. Pemberian ekstrak *C. nutans* secara oral dengan dosis 50, 100 dan 200 mg/kg dapat menghambat pembentukan edema akibat inflamasi yang diinduksi oleh karagenan dan pemberian secara topikal dengan dosis 3, 6, 9 mg/20 µL efektif dalam menghambat

pembentukan edema setelah diinduksi oleh etil fenilpropiolat, dimana mekanismenya melibatkan respon neutrophil (Wanikiat et al., 2008). Ekstrak polar *C. nutans* juga menunjukkan aktivitas anti-inflamasi dengan menghambat TLR-4 dan produksi sitokin proinflamasi IL-1 β , TNF- α , IFN- γ sebagai respons terhadap stimulasi lipopolisakarida pada sel makrofag RAW264.7 (Mai et al., 2016).

4. Aktivitas antikanker

Penelitian aktivitas antikanker *C. nutans* paling banyak dilakukan. Penelitian *in vitro* menunjukkan ekstrak *C. nutans* memiliki aktivitas antiproliferatif pada berbagai kultur sel kanker, seperti usus besar, hepatoseluler, neuroblastoma, paru-paru, eritoleukemia, servik dan limfoma Burkitt (Yong et al., 2013). Ekstrak metanol *C. nutans* menunjukkan aktivitas antikanker terhadap sel HepG2 dengan IC50 13 $\mu\text{g/mL}$ (Quah et al., 2017). Penelitian *in vivo* menunjukkan efek penghambatan ekstrak etanol *C. nutans* terhadap pertumbuhan hepatoma pada tikus model xenograf, secara intragastrik pada 10 mg/kg menyebabkan penurunan ukuran dan berat tumor secara signifikan melalui mekanisme induksi apoptosis pada sel tumor (Huang et al. 2016). Ekstrak *C. nutans* menunjukkan efek antikanker melalui berbagai mekanisme, diantaranya menginduksi apoptosis dan autofagi (Wang et al. 2019), menahan siklus sel (Lu et al.2018), anti-migrasi dan anti-angiogenesis (Ng et al.2017).

5. Aktivitas antioksidan

Aktivitas antioksidan *C. nutans* telah banyak diteliti dimana daun memiliki potensi antioksidan yang lebih tinggi dari pada batang (Kong et al., 2016). Uji DPPH menunjukkan aktivitas pembersihan radikal bebas pada ekstrak etanol dengan IC50 sebesar 110,4 \pm 6,59 $\mu\text{g/mL}$ dan ekstrak methanol sebesar 63.07 \pm 0.11 (M A Alam et al., 2017). *C. nutans* juga memiliki aktivitas pereduksi besi, penghambatan pada produksi radikal bebas yang diinduksi oleh *phorbol myristate acetate* pada sel makrofag (30, 100 dan 300 $\mu\text{g/mL}$) serta penghambatan pada hemolisis yang diinduksi oleh inisiator radikal peroksil (IC50 359,38 \pm 14,02 $\mu\text{g/mL}$) (Pannangpetch et al., 2007). Penelitian lain menunjukkan aktivitas antioksidan terhadap DPPH, radikal galvinoksil, nitrit oksida, dan hidrogen

peroksida dengan kapasitas antioksidan $7852,63 \pm 449,9 \mu\text{g}$ (Yong et al., 2013). Ekstrak *C. nutans* juga menunjukkan efek perlindungan pada integritas DNA plasmid *E. coli* dari radikal anion superoksida yang dihasilkan dari foto dekomposisi riboflavin yang meningkatkan pembelahan DNA (Yuann et al., 2012).

6. Aktivitas Neuroprotektif

Penelitian menunjukkan bahwa ekstrak *C. nutans* menunjukkan efek neuroprotektif terhadap cedera akibat kekurangan oksigen dengan menekan ekspresi fosfolipase A2 yang bertanggung jawab untuk sintesis mediator inflamasi (C. S. Tan et al., 2016). Penelitian lain menunjukkan bahwa infus *C. nutans* intracerebroventricular dapat menghambat iskemik otak pada model tikus oklusi arteri serebral tengah (Wu et al., 2018). Ekstrak air *C. nutans* dengan dosis 500 mg/kg terbukti memberikan efek protektif terhadap inflamasi saraf yang diinduksi oleh LPS pada tikus, melalui mekanisme modulasi beberapa jalur metabolik, termasuk regulasi metabolisme asam amino, siklus TCA dan glikolisis/glikoneogenesis (Azam et al., 2019).

7. Aktivitas Analgetik

Clinacanthus nutans memiliki aktivitas analgesik yang potensial. Penelitian Abdul Rahim et al. (2016), menunjukkan bahwa ekstrak metanol *C. nutans* dengan EC50 227,7 mg/kg memiliki aktivitas antinoseptif sentral yang diinduksi oleh formalin melalui modulasi jalur opioid/ nitrik oksida (NO) dan *Cyclic Guanosine Monophosphate* (cGMP). Selain itu, efek analgesik yang diinduksi oleh uji *hot plate* menunjukkan bahwa ekstrak metanol 500 mg/kg efektif dalam mengurangi respon nyeri dengan interval 60-210 menit sedangkan ekstrak etanol dan butanol tidak menunjukkan efek analgesik hingga 5g/kg. Penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak petroleum *C. nutans* memiliki aktivitas antinosiseptif perifer dan sentral, dengan menghambat reseptor opioid μ , δ , κ dan modulasi jalur yang dimediasi NO (Zakaria et al., 2019).

8. Aktivitas Antidiabetik

Penelitian *in vitro* menunjukkan aktivitas antidiabetik *C. nutans* melalui penghambatan terhadap α -glukosidase dan α -amilase. α -glukosidase adalah enzim yang menghidrolisis karbohidrat menjadi glukosa di usus halus, sedangkan α -amilase adalah enzim yang menghidrolisis ikatan α -1,4-glukan pada pati, maltodekstrin dan maltooligosakarida menjadi gula sederhana (dekstrin, maltotriosa, maltosa dan glukosa) (Tundis et al., 2010). Meskipun enzim ini tidak secara langsung terlibat dalam etiologi diabetes, penghambatan α -glukosidase dan α -amilase dapat secara signifikan mengurangi kadar glukosa post-prandial dan oleh karena itu dapat menjadi strategi penting dalam pengelolaan gangguan metabolisme, termasuk diabetes mellitus tipe 2 (Riyaphan et al., 2018).

Lee et al. (2014) menunjukkan bahwa ekstrak metanol *C. nutans* menghambat aktivitas α -glukosidase (daun 13,57% dan batang 17,67%) pada konsentrasi 5 mg/mL. Wong et al. (2014) menunjukkan bahwa ekstrak air *C. nutans* pada dosis yang lebih tinggi (50 mg/mL) menyebabkan penghambatan aktivitas α -glukosidase yang tinggi (88,2%, IC₅₀: 30 mg/mL). Khoo et al. (2015) menunjukkan bahwa ekstrak etanol *C. nutans* menghambat aktivitas α -glukosidase hingga 41% pada konsentrasi 5 mg/mL. Alam et al. (2017) melaporkan aktivitas penghambatan α -glukosidase ekstrak metanol *C. nutans* menunjukkan bahwa fraksi butanol memiliki aktivitas penghambatan α -glukosidase yang jauh lebih tinggi (72,16%, IC₅₀: 37,47 g/mL), yang mendekati standar Quersetin sebagai kontrol positif (IC₅₀: 38,54 g/mL). Murugesu et al. (2019) menunjukkan bahwa ekstrak metanol *C. nutans* dengan fraksi n-hexan dan etil asetat menunjukkan penghambatan aktivitas α -glukosidase (IC₅₀ 3,07 g/ml). Abdullah & Kasim (2017) menunjukkan bahwa ekstrak etanol dan air *C. nutans* menghambat aktivitas α -amilase (64,25%). Berdasarkan penelitian ini, ekstrak metanol daun *C. nutans* merupakan jenis ekstrak yang menunjukkan aktivitas penghambatan α -glukosidase terbaik, dimana fraksi butanol menunjukkan efek penghambatan yang lebih besar. Selain itu, terdapat korelasi yang signifikan antara penghambatan α -glukosidase dengan aktivitas antioksidan dan kandungan flavonoid total dari ekstrak (M. A. Alam, Zaidul, Ghafoor, Sahena, et al., 2017).

Dalam penelitian eksperimental dengan model *in vivo*, efek *C. nutans* diamati dalam berbagai dosis dari 15 mg/kg sampai 500 mg/kg dengan periode perlakuan

yang berbeda antara 9 sampai 28 hari. Efek antidiabetik telah ditunjukkan dari daun *C. nutans* yang diekstraksi dengan pelarut aqueos, metanol dan etanol. Efek penurunan glukosa *C. nutans* telah dilaporkan secara signifikan dalam beberapa penelitian, diantaranya pemberian ekstrak air daun *C. nutans* 150 mg/kg selama 9 hari pada mencit yang diinduksi aloksan 50 mg/kg (Nurulita et al., 2012), pemberian ekstrak etanol daun *C. nutans* 15 mg/kg selama 14 hari pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak dan fruktosa (Retnaningsih et al., 2019), dan pemberian ekstrak etanol daun *C. nutans* 75 mg /kg selama 14 hari pada tikus yang diinduksi STZ 50 mg/kg (Dewinta et al., 2020).

Pengaruh *C. nutans* dalam meningkatkan kadar insulin serum secara signifikan telah dilaporkan dalam penelitian Umar Imam et al., (2019) pada pemberian ekstrak air daun *C. nutans* 200 mg/kg selama 28 hari pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak dan streptozotocin. Penelitian lain oleh Sarega et al. (2016) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak air dan metanol daun *C. nutans* dosis 500 dan 250 mg/kg selama 7 minggu pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak dan kolesterol dapat meningkatkan kadar insulin serum. Tidak ada data yang menunjukkan bahwa peningkatan sekresi insulin disebabkan oleh perbaikan disfungsi sel β pankreas. Penelitian tentang resistensi insulin menggunakan model homeostatik telah menunjukkan bahwa ekstrak air dan metanol daun *C. nutan* dapat meningkatkan sensitivitas insulin yang ditandai dengan penurunan biomarker resistensi insulin *retinol binding protein 4* (RBP4) melalui upregulation dari gen yang mengkode *insulin receptor substrate* (IRS), *phosphatidylinositol-3-phosphate* (PI3K), reseptor adiponektin dan leptin (Sarega, Imam, Esa, et al., 2016).

Aktivitas antidiabetik *C. nutans* dihubungkan dengan sifat antioksidan yang dimiliki telah dilaporkan dalam 2 penelitian in vivo. Sarega et al., (2016) menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan *C. nutans* dikaitkan dengan kemampuan untuk memodulasi ekspresi berbagai gen antioksidan termasuk superoksida dismutase, katalase, glutathion reduktase, dan glutathion peroksidase. Umar Imam et al., (2019) menunjukkan bahwa ekstrak *C. nutans* dengan dosis 200 mg/kg selama 4 minggu secara signifikan dapat menurunkan penanda stres oksidatif dan meningkatkan kadar antioksidan total pada tikus model DM tipe 2. Berdasarkan data tersebut, tampak bahwa aktivitas antioksidan *C. nutans* terjadi karena

kemampuannya dalam menangkap radikal bebas dan memodulasi ekspresi berbagai enzim antioksidan.

C. nutans memiliki efek dalam memperbaiki obesitas dan dislipidemia yang berkontribusi terhadap gangguan homeostasis glukosa pada diabetes. Sarega et al. (2016) melaporkan bahwa setelah 7 minggu pemberian *C. nutans* pada tikus yang diberi diet tinggi lemak dan tinggi kolesterol, menunjukkan perbaikan profil lipid, meliputi penurunan kadar kolesterol total, TG, LDL-C, VLDL-C dan peningkatan kadar HDL-C. Abdulwahid Kurdi et al. (2019) menunjukkan bahwa diet tinggi lemak yang diterapi dengan *C. nutans* (1500 mg/kg) menyebabkan penurunan berat badan dan lemak visceral yang relatif signifikan.

Efek menguntungkan dari *C. nutans* pada pencegahan komplikasi neuropati dan nefropati diabetik akibat akumulasi sorbitol telah dievaluasi oleh Umar Imam et al., (2019). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak air *C. nutans* dapat menurunkan kandungan sorbitol di ginjal dan saraf secara signifikan. Diabetes juga dikaitkan dengan komplikasi perkembangan aterosklerosis dan penyakit kardiovaskular. Potensi *C. nutans* dalam memperbaiki komplikasi disfungsi endotel juga telah dilaporkan dalam penelitian Azemi et al. (2020), dimana pemberian *C. nutans* dapat meningkatkan vasodilatasi endotel dan menurunkan kontraksi endotel melalui peningkatan ekspresi protein eNOS.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah eksperimental murni dengan desain *randomized post test only control group*. Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei-September 2022 di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, Laboratorium Hewan Coba Program Studi Pendidikan Dokter FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, Laboratorium Genetika Program Studi Biologi FST UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, Laboratorium Farmakologi FK Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr. Sutomo Surabaya.

Sampel penelitian ini adalah tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar dengan kriteria inklusi jantan, umur 3 bulan, berat badan \pm 200 gram, sehat dan aktif, terdiagnosis DM dengan kadar GDP >200 mg/dl. Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu:

- a. kontrol 1 (K1) adalah tikus normal
- b. kontrol 2 (K2) adalah tikus DM yang diinduksi STZ
- c. perlakuan 1 (P1) adalah tikus DM yang diinduksi STZ dan diberikan ekstrak *C. nutans* dosis 100 mg/kgBB
- d. perlakuan 2 (P2) adalah tikus DM yang diinduksi STZ dan diberikan ekstrak *C. nutans* dosis 200 mg/kgBB
- e. perlakuan 3 (P3) adalah tikus DM yang diinduksi STZ dan diberikan ekstrak *C. nutans* dosis 400 mg/kgBB.

Perkiraan besar sampel dihitung dengan menggunakan rumus Lemeshow (1997) dan didapatkan 6 ekor per kelompok perlakuan. Untuk mengantisipasi resiko kematian, maka sampel ditambah dengan faktor koreksi 20% sehingga menjadi 7,2 dan dibulatkan menjadi 8 ekor per kelompok perlakuan.

3.2 Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak *Clinacanthus nutans*.
- b. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar MDA, SOD, morfologi hepar.

3.3 Definisi operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat ukur	Satuan	Skala
1	Ekstrak daun <i>Clinacanthus nutans</i>	daun <i>Clinacanthus nutans</i> yang di ekstraksi dengan pelarut etanol 70% menggunakan metode UAE, diberikan pada dosis 100, 200 dan 400 mg/kgBB per sonde selama 4 minggu.	Timbangan analitik	mg	Rasio
2	STZ	Agen penginduksi DM, diberikan dosis 45 mg/kgBB dengan injeksi intraperitoneal.	Timbangan analitik	mg	Rasio
3	Kadar MDA	Lipid peroksidase penanda stress oksidatif yang diukur dari jaringan hepar	Spektrofotometer	mg/dl	Rasio
4	Kadar SOD	Enzim antioksidan diukur dari jaringan hepar	Spektrofotometer	U/ml	Rasio
5	Morfologi hepar	Morfologi hepar diamati secara mikroskopis dari preparat histopatologi dengan pengecatan HE	Mikroskop (perbesaran 400x)	% sel	Rasio

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

- a. Ekstraksi: simplisia daun *Clinacanthus nutans*, etanol 70%, aquabidest, neraca analitik, gelas beker, gelas ukur, gelas arloji, spatula, sendok tanduk, gelas erlenmeyer, pipet tetes, batang pengaduk, corong gelas, wadah maserat, cawan porselen, kertas saring, alumunium foil, *Ultrasonic bath*, dan *rotary evaporator*.
- b. Pemeliharaan dan perlakuan hewan coba: tikus Wistar jantan, pakan standar, sekam, air minum, Streptozotosin, bufer natrium sitrat, Kandang tikus berupa box plastik berukuran 49 cm x 37 cm x 15 cm sebanyak 12 buah, penutup kandang dari kawat berbentuk jaring, tempat makanan, botol air minum, sarung tangan karet, masker, timbangan, spuit 1 cc, sonde.
- c. Pengujian sampel: kit spektrofotometri MDA dan SOD, spektrofotometer.
- d. Preparat histopatologi: Bufer formalin 10%, Xylol 2 liter, Alkohol, Parafin cair, Entelan, Tissue cassette, Beaker glass, Mikrotom, Poly-L-Lysine slides,

Deckglass, Humidity chamber vertikal dan horisontal, Mikro pipet, Mikrotube, Mikroskop, kamera, komputer.

3.5 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

3.5.1 Ekstraksi Daun *Clinacanthus nutans*

Ekstraksi Daun *Clinacanthus nutans* dilakukan dengan metode *Ultrasonic-assisted extraction* sebagai berikut:

- a. Serbuk daun *Clinacanthus nutans* didapatkan dari Materia Medika, Batu
- b. 20 g serbuk simplisia dimasukkan ke dalam gelas beker dan ditambahkan 200 ml etanol 70% (1:10), lalu disonikasi selama 60 menit pada 25°C dalam ultrasonicator water bath dan hasilnya disaring dengan kertas whatman.
- c. filtrat yang terkumpul dimasukkan dalam *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dan kecepatan putaran 70 rpm.
- d. ekstrak dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C.
- e. ekstrak yang diperoleh ditimbang dan dihitung nilai rendemen.

3.5.2 Perlakuan Hewan Coba

Sebelum perlakuan, tikus dilakukan aklimatisasi selama 7 hari untuk menyesuaikan dengan suhu, kelembaban, dan lingkungan barunya. Tikus ditempatkan dalam kandang yang berisi 4 ekor tikus/ kandang. Kandang ditempatkan di lingkungan laboratorium dengan suhu ruang $\pm 28^{\circ}\text{C}$, dan 12 jam siklus gelap terang. Seluruh tikus diberikan pakan dan minum standar sekali sehari pada siang hari sekitar jam 12.00 sebanyak 40 gr/hari/ekor secara *ad libitum*. Untuk menghindari infeksi, kandang dibersihkan dan sekam diganti setiap hari.

Induksi dilakukan dengan injeksi STZ intraperitoneal dosis tunggal 45 mg/kgBB setelah dipuasakan semalam. STZ dilarutkan sebelum digunakan dalam bufer natrium sitrat (0,1 M dan pH 4,5). Tikus pada kelompok kontrol diberikan bufer natrium sitrat dengan volume yang sesuai. Pemeriksaan kadar glukosa darah acak dilakukan pada hari ke-7 setelah injeksi STZ dan tikus didiagnosis DM apabila kadar glukosa darah lebih dari 200 mg/dl (Tabatabaie & Yazdanparast, 2017). Ekstrak *C. nutans* diberikan dengan dosis 100 mg/kgBB (pada kelompok P1) dan 200 mg/kgBB (pada kelompok P2), 400 mg/kgBB (pada kelompok P3) setiap hari selama 4 minggu dengan cara disonde intragastrik (Umar Imam et al., 2019).

Tikus dipuasakan selama 12 jam sebelum pembedahan. Tikus dikorbankan dengan anestesi Ketamin Xylasin 1:1. Setelah tidak sadar, tikus diletakkan diatas alas papan bedah dengan posisi perut menghadap ke atas lalu difiksasi menggunakan jarum injeksi pada keempat telapak kakinya. Selanjutnya dilakukan insisi pada dinding perut dengan pinset dan gunting, lalu rongga peritoneum dibuka secara hati-hati. Organ hepar diambil dengan memotong jaringan sekitar, kemudian organ ditimbang dan dibersihkan dengan menggunakan larutan NaCl 0,9%. Sebanyak 0,4 gram jaringan hepar dibuat homogenat dalam 3,6 ml Phospate Buffer Saline (PBS) dan disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C dan supernatan digunakan untuk pengukuran kadar MDA dan SOD dengan metode spektrofotometri. Sebagian jaringan hepar yang lain difiksasi dalam Normal Buffer Formalin (NBF) 10% untuk pembuatan preparat histopatologi.

3.5.3 Pembuatan Preparat Histopatologi

Langkah-langkah dalam proses pembuatan preparat histopatologi yaitu :

a. Fiksasi

Fiksasi dilakukan untuk mengawetkan dan mengeraskan jaringan. Jaringan hepar difiksasi dengan formalin buffer 4% selama 18-24 jam.

b. Dehidrasi

Dehidrasi merupakan proses pengeluaran air dari dalam jaringan yang telah difiksasi. Jaringan dimasukkan dalam aquades selama 1 jam kemudian didehidrasi dengan alkohol bertingkat 30%, 50%, 70%, 80%, 90% sampai alkohol absolut.

c. Penjernihan (*Clearing*)

Penjernihan (*Clearing*) merupakan proses pengeluaran alkohol dari jaringan dan menggantinya dengan suatu larutan yang berikatan dengan paraffin. Jaringan yang dimasukkan kelarutan alkohol xylol selama 1 jam, larutan xylol murni selama 2 x 2 jam, paraffin 2 x 2 jam.

d. Embedding

Embedding merupakan proses untuk mengeluarkan cairan clearing agent dari jaringan dan diganti dengan paraffin. Jaringan hepar dicelupkan kedalam paraffin cair yang telah dituangkan ke dalam wadah hingga parafin memadat.

e. Pemotongan (*Sectioning*) dan penempelan pada Gelas Objek

Jaringan dipotong dengan blok paraffin dengan mikrotom setebal 4 mikron, secara cross section/ melintang. Irisan diletakan pada polu-1-lysin slide. Potongan terpilih dikeringkan dan diletakan di atas hot plate 38-40 C sampai kering. Selanjutnya preparat disimpan dalam inkubator pada suhu 38- 40 C lalu siap diwarnai dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE).

f. Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE)

Pewarnaan HE ini terdiri dari zat warna yaitu hematoxylin dan eosin. Preparat dimasukan dalam larutan xylol 1 dan 2 selama 5 menit, Kemudian dimasukan dalam etanol bertingkat yang dimulai dari etanol absolut 95%, 90%, 80%, dan 70% selama 5 menit. Jaringan kemudian direndam dalam aquades 5 menit. Preparat selanjutnya diwarnai dengan pewarna hematoksin selama 10 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan dibilas aquades selama 5 menit. Setelah itu, preparat diwarnai dengan pewarna eosin selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir 10 menit dan dibilas aquades selama 5 menit. Setelah preparat diwarnasi, preparat dimasukan pada alkohol dari 80%, 90%, dan 95% hingga alkohol absolut. Selanjutnya preparat dimasukan dalam larutan xylol 1-3 selama 3 menit dan dikering anginkan. Terakhir, dilakukan perekatan menggunakan entelah serta ditutup menggunakan coverglass.

g. Pengamatan

Pengamatan kerusakan morfologi hepatosit tikus model DM dilakukan dengan melihat gambaran hidrofilik, degenerasi lemak, dan nekrosis pada hepatosit. Degenerasi hidrofilik disebabkan oleh karna meningkatnya permeabilitas plasma sehingga air masuk kedalam sel Degenerasi lemak merupakan manifestasi kerusakan hati yang lebih lanjut seperti adanya vakuolisasi sehingga sel hepatosit tampak edema dengan sitoplasma pucat dan mendesak nukleus ke tepi sel.

3.5.4 Pengukuran Kadar SOD

Pengukuran kadar SOD dilakukan dengan metode spektrofotometri menggunakan SOD Assay kit. Adapun prosedurnya sebagai berikut:

- a. Tabung sampel: Tabung sampel dimasukkan 1 ml reagen 1 dan 100 µl sampel

- b. Tabung kontrol: Tabung control dimasukkan 1 ml reagen 1 dan 100 μ l aquabides
- c. Pada langkah pertama ditambahkan 0,1 ml reagen 2; 0,1 ml reagen 3; 0,1 ml reagen 4.
- d. Larutan dicampurkan menggunakan vortex mixer dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 40 menit.
- e. Tabung pada langkah tiga ditambahkan 2 ml agen chromogenic.
- f. Larutan diaduk rata dan didiamkan pada suhu ruangan selama 10 menit.
- g. Mengatur ke angka nol dengan aquabides kemudian mengukur nilai OD setiap tabung pada gelombang 550 nm, sebelumnya larutan dipindahkan ke dalam kuvet quartz 1 cm.

Setelah mendapatkan nilai OD pada spektrofotometer, maka dimasukkan rumus untuk mendapatkan nilai TSOD activity, sebagai berikut:

$$\text{T-SOD Activity (U/mgprot)} = i \div 50\% \times (V1:V2) \times f \div \text{Cpr}$$

Keterangan:

i : inhibition ratio, $i = \frac{\text{OD control} - \text{OD sample}}{\text{OD control}} \times 100\%$

V1 : volume total larutan reaksi (mL)

V2 : volume sampel yang ditambahkan (mL)

F : faktor pengenceran sampel sebelum pengujian

Cpr : konsentrasi protein dalam sampel (mgprot/mL)

3.5.5 Pengukuran Kadar MDA

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan metode *Thiobarbituric Acid Reactive Substance* (TBARS). Adapun prosedurnya sebagai berikut:

- a. TBA dicampurkan dengan asam asetat glasial 50%.
- b. Supernatan dicampur dengan TCA dan TBA-asam asetat glasial.
- c. Dilakukan proses inkubasi menggunakan *waterbath* pada suhu 95°C selama 45 menit lalu didiamkan hingga suhunya menurun.
- d. Disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 15 menit.
- e. Dimasukkan ke dalam *kuffet* untuk diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 532 nm.

- f. Dibuat kurva standar dan konsentrasi MDA dihitung berdasarkan rumus yang didapat dikali dengan faktor pengenceran.

3.6 Analisis Statistik

Data disajikan dalam bentuk tabel rerata dan standar deviasi serta grafik. Analisis statistik dilakukan dengan SPSS 26.0 *for windows*. Uji normalitas menggunakan *Saphiro Wilk*, sedangkan uji homogenitas menggunakan *Levene*. Apabila syarat parametrik terpenuhi, maka analisis komparatif menggunakan uji *one way ANOVA* dan perbedaan pada masing-masing kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan *Post Hoc Test*. Apabila syarat parametrik tidak terpenuhi, maka analisis komparatif menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan perbedaan pada masing-masing kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan *Mann Whitney*. Perbedaan signifikan dinyatakan pada derajat kepercayaan 95% ($p < 0,05$) dan $\alpha = 0,05$.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakteristik Hewan Coba

4.1.1 Berat Badan

Penurunan berat badan merupakan tanda umum diabetes mellitus (Hanchang et al., 2019). Penimbangan berat badan tikus dilakukan sebelum induksi DM (hari -7), pada saat terdiagnosis DM (hari 0), dan setiap minggu perlakuan (hari 7, 14, 21, dan 28). Data berat badan tikus dapat dilihat pada Tabel 4.1 dan Gambar 4.1. Dalam penelitian ini, tikus model diabetes mellitus menunjukkan penurunan berat badan dibandingkan dengan tikus normal. Pemberian terapi ekstrak daun *C. nutans* selama 4 minggu pada tikus model diabetes mellitus menunjukkan perubahan yang signifikan pada peningkatan berat badan apabila dibandingkan dengan tikus model diabetes mellitus yang tidak mendapat terapi.

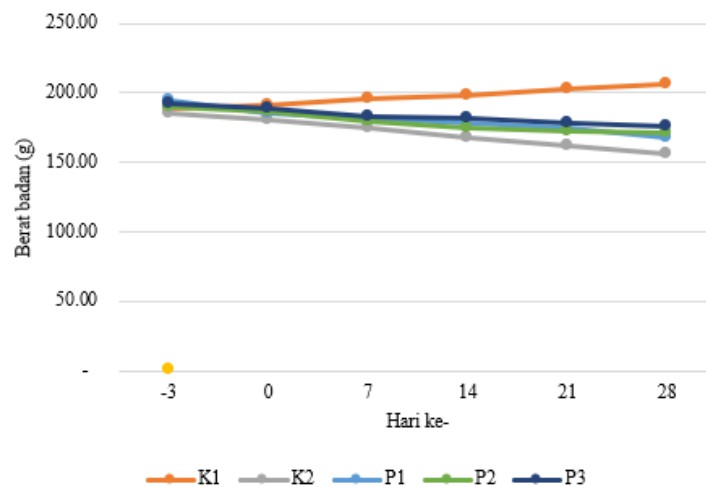
Tabel 4. 1 Berat Badan Tikus Selama Penelitian

Hari ke-	Berat Badan (g)				
	K1	K2	P1	P2	P3
-7	188.33 ± 4.97	185.60 ± 3.45	194.00 ± 6.72	189.67 ± 5.20	191.83 ± 4.49
0	190.83 ± 4.58	180.60 ± 3.14	185.00 ± 7.64	186.00 ± 5.48	188.67 ± 4.32
7	195.50 ± 5.75	175.00 ± 3.43	181.50 ± 6.57	179.17 ± 5.85	183.17 ± 4.54
14	198.00 ± 4.60	167.33 ± 3.50 [#]	178.33 ± 5.72 [*]	174.83 ± 4.31 [*]	181.33 ± 5.72 [*]
21	202.33 ± 6.41	162.17 ± 4.17 [#]	174.67 ± 4.84 [*]	172.33 ± 7.17 [*]	178.50 ± 5.86 [*]
28	206.33 ± 5.92	155.67 ± 3.83 [#]	168.17 ± 4.45 [*]	170.67 ± 6.41 [*]	175.67 ± 6.09 [*]

Data disajikan dalam mean ± SD (n=6).

* P<0.05 berbeda signifikan dengan K2 (Kontrol DM).

P<0.05 berbeda signifikan dengan K1 (Kontrol Normal).



Gambar 4. 1 Berat Badan Tikus Selama Penelitian

Uji normalitas rata-rata berat badan sebelum induksi DM memiliki distribusi normal dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,972$) dan uji homonegitas termasuk kategori homogen dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,454$), sehingga dapat diuji dengan statistik parametrik. Dengan uji *One way ANOVA* diketahui bahwa dari kelima kelompok perlakuan tersebut tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,100$). Uji normalitas rata-rata berat badan saat diagnosis DM memiliki distribusi normal dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,817$) dan uji homonegitas rata-rata berat badan awal termasuk kategori homogen dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,122$), sehingga dapat diuji dengan statistik parametrik. Dengan uji *One way ANOVA* diketahui bahwa dari kelima kelompok perlakuan tersebut tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,902$).

Uji normalitas rata-rata berat badan hari ke-7 memiliki distribusi normal dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,105$) dan uji homonegitas rata-rata berat badan awal termasuk kategori homogen dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,140$), sehingga dapat diuji dengan statistik parametrik. Dengan uji *One way ANOVA* diketahui bahwa dari keempat kelompok perlakuan tersebut memiliki perbedaan yang signifikan dengan nilai $p < 0,05$ ($p = 0,002$). Uji normalitas rata-rata berat badan hari ke-14 memiliki distribusi normal dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,155$) dan uji homonegitas rata-rata berat badan awal termasuk kategori homogen dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,201$), sehingga dapat diuji dengan statistik parametrik. Dengan uji *One way ANOVA* diketahui bahwa dari keempat kelompok perlakuan tersebut tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan nilai $p < 0,05$ ($p = 0,001$).

Uji normalitas rata-rata berat badan hari ke-21 memiliki distribusi normal dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,105$) dan uji homonegitas rata-rata berat badan awal termasuk kategori homogen dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,07$), sehingga dapat diuji dengan statistik parametrik. Dengan uji *One way ANOVA* diketahui bahwa dari keempat kelompok perlakuan tersebut memiliki perbedaan yang signifikan dengan nilai $p < 0,05$ ($p = 0,000$). Uji normalitas rata-rata berat badan hari ke-28 memiliki distribusi normal dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,155$) dan uji homonegitas rata-rata berat badan awal termasuk kategori homogen dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,10$), sehingga dapat diuji dengan statistik parametrik. Dengan uji *One way ANOVA* diketahui

bahwa dari keempat kelompok perlakuan tersebut tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan nilai $p < 0,05$ ($p = 0,001$).

4.1.2 Kadar Glukosa Darah Puasa

Kadar Glukosa Darah Puasa (GDP) diukur sebelum induksi DM, pada saat terdiagnosis DM, dan di akhir perlakuan. Data kadar GDP dapat dilihat pada Tabel 4.2 dan Gambar 4.2.

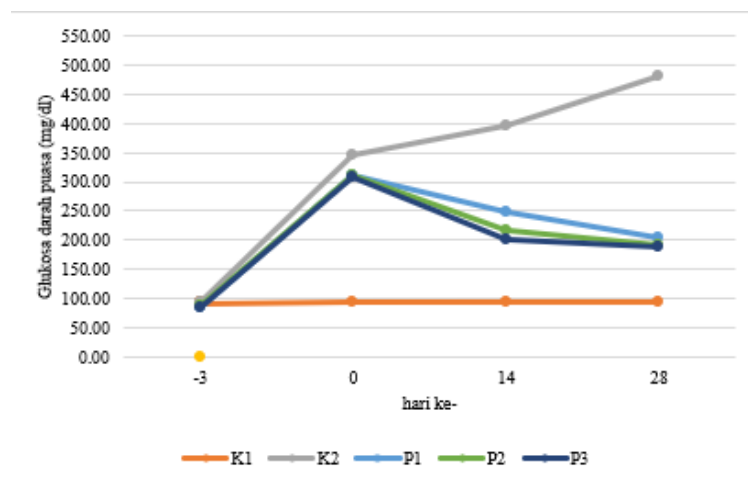
Tabel 4. 2 Kadar Glukosa Darah Puasa Selama Penelitian

Kelompok Perlakuan	Kadar Glukosa Darah Puasa (mg/dl)				Laju Hipoglikemik
	-3	0	14	28	
K1	93.83 ± 3.43	95.50 ± 2.35	94.67 ± 3.08	94.50 ± 3.02	
K2	94.17 ± 2.23	346.50 ± 26.76 [#]	396.67 ± 15.02	479.50 ± 23.43	
P1	85.17 ± 2.99	310.83 ± 16.15 [#]	249.00 ± 26.26 [*]	203.00 ± 15.43 [*]	35%
P2	87.67 ± 5.61	311.00 ± 11.12 [#]	218.17 ± 17.24 [*]	191.67 ± 4.76 [*]	38%
P3	86.17 ± 2.93	308.17 ± 9.02 [#]	200.67 ± 7.00 [*]	187.33 ± 5.85 [*]	39%

Data disajikan dalam mean ± SD (n=6).

* $P < 0.05$ berbeda signifikan dengan K2 (Kontrol DM).

$P < 0.05$ berbeda signifikan dengan K1 (Kontrol Normal).



Gambar 4. 2 Kadar Glukosa Darah Puasa Tikus Selama Penelitian

Dari tabel 4.2 dan gambar 4.2 dapat dilihat bahwa GDP sebelum diinduksi DM berada pada kadar < 200 mg/dl yang berarti bahwa semua tikus memiliki kadar glukosa darah normal. Kadar GDP setelah diinduksi DM mengalami peningkatan dibandingkan sebelum induksi DM dan berada pada kadar > 200 mg/dl yang berarti

bahwa semua tikus telah terdiagnosis DM. Kadar glukosa darah puasa pada akhir penelitian tikus kontrol DM (K2) tetap tinggi yaitu 479.50 ± 23.43 mg/dl dan tikus kontrol normal (K1) tetap normal yaitu 94.50 ± 3.02 mg/dl. Pemberian terapi dengan ekstrak *C. nutans* pada tikus model diabetes mellitus mengalami penurunan kadar GDP baik pada pertengahan terapi maupun akhir terapi apabila dibandingkan dengan tikus kontrol DM yang tidak mendapat terapi. Penurunan kadar GDP pada kelompok yang mendapat terapi ekstrak dosis 100 mg/kgBB (P1) sebesar 35%, pada kelompok yang mendapat terapi ekstrak dosis 200 mg/kgBB (P2) sebesar 38% dan pada kelompok yang mendapat terapi ekstrak dosis 400 mg/kgBB (P3) sebesar 39%.

Uji normalitas terhadap kadar GDP di akhir penelitian menunjukkan nilai $p < 0.05$ ($p = 0.037$) yang berarti bahwa data tidak terdistribusi normal, sehingga asumsi statistik parametrik tidak terpenuhi dan data diuji dengan statistik non parametrik. Hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada kadar glukosa darah puasa setelah pemberian ekstrak *C. nutans* dengan nilai $p < 0.05$ ($p = 0.001$). Uji lanjut dengan *Mann Whitney U* menunjukkan bahwa perbedaan tersebut terdapat pada kelompok K dengan kelompok P1 dengan nilai $p < 0.05$ ($p = 0.000$), kelompok K dengan kelompok P2 dengan nilai $p < 0.05$ ($p = 0.000$), dan kelompok K dengan kelompok P3 dengan nilai $p < 0.05$ ($p = 0.001$).

4.1.3 Berat Organ Hepar

Berat organ hepar ditimbang setelah pembedahan. Data berat organ hepar dapat dilihat pada Tabel 4.3 dan Gambar 4.3.

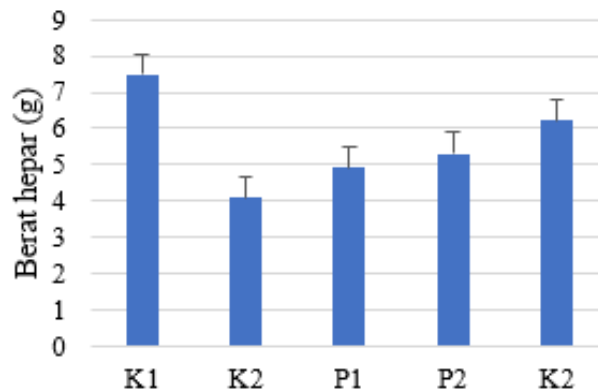
Tabel 4. 3 Berat Hepar di Akhir Penelitian

Kelompok Perlakuan	Berat hepar (g)
K1	7.48 ± 1.16
K2	$4.10 \pm 0.35^{\#}$
P1	4.92 ± 1.29
P2	5.31 ± 1.07
P3	$6.23 \pm 0.92^*$

Data disajikan dalam mean \pm SD (n=6).

* $P < 0.05$ berbeda signifikan dengan K2 (Kontrol DM).

$P < 0.05$ berbeda signifikan dengan K1 (Kontrol Normal).



Gambar 4. 3 Berat Hepar di Akhir Penelitian

Dari tabel 4.3 dan gambar 4.3 dapat dilihat bahwa berat organ hepar di akhir penelitian pada tikus DM rendah, sedangkan tikus yang mendapat terapi ekstrak *C. nutans* mengalami peningkatan berat organ hepar yaitu pada P1 sebesar 20%, P2 sebesar 29,5%, dan P3 sebesar 52%.

Uji normalitas terhadap berat organ hepar di akhir penelitian menunjukkan nilai $p > 0.05$ ($p = 0.370$) dan uji homonegitas berat organ hepar termasuk kategori homogen dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,100$), sehingga dapat diuji dengan statistik parametrik. Dengan uji *One way ANOVA* diketahui bahwa kelompok kontrol berbeda signifikan dibandingkan kelompok P1, P2 dan P3 dengan nilai $p < 0,05$ ($p = 0,002$). Uji lanjut dengan *Post hoc* menunjukkan bahwa perbedaan tersebut terdapat pada kelompok K1 dengan kelompok K2 dengan nilai $p < 0.05$ ($p = 0.030$) dan kelompok K2 dengan kelompok P3 dengan nilai $p < 0.05$ ($p = 0.020$).

4.2 Efek Ekstrak *C. nutans* pada Kadar SOD Hepar Tikus Model DM

Kadar SOD Hepar diukur dengan metode spektrofotometri. Data kadar SOD Hepar dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan Gambar 4.4.

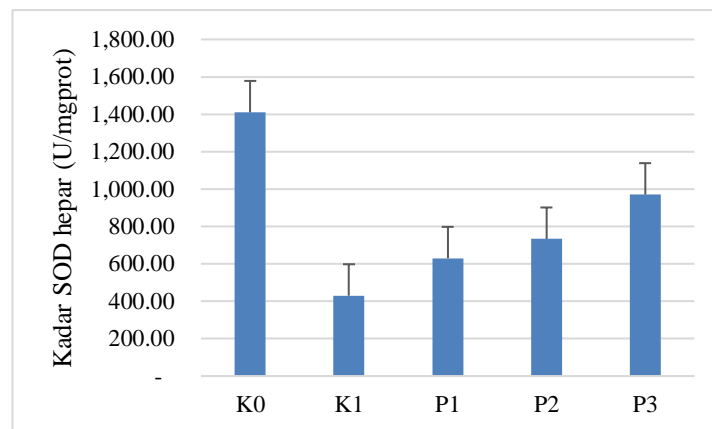
Tabel 4. 4 Kadar SOD Hepar

Kelompok Perlakuan	Kadar SOD Hepar (U/mgprot)
K1	1,410.11 ± 26.94
K2	429.87 ± 97.01 [#]
P1	629.82 ± 235.76
P2	733.35 ± 221.96 [*]
P3	970.36 ± 195.68 [*]

Data disajikan dalam mean ± SD (n=6).

* P<0.05 berbeda signifikan dengan K2 (Kontrol DM).

P<0.05 berbeda signifikan dengan K1 (Kontrol Normal).



Gambar 4. 4 Kadar SOD Hepar

Dari tabel 4.4 dan gambar 4.4 dapat dilihat bahwa kadar SOD hepar di akhir penelitian pada tikus DM rendah, sedangkan tikus yang mendapat terapi ekstrak *C. nutans* mengalami peningkatan kadar SOD hepar yaitu pada kelompok P1 sebesar 47%, pada kelompok P2 sebesar 71%, dan pada kelompok P3 sebesar 126%.

Uji normalitas terhadap berat organ hepar di akhir penelitian menunjukkan nilai $p > 0.05$ ($p = 0.200$) dan uji homonegitas berat organ hepar termasuk kategori homogen dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,327$), sehingga dapat diuji dengan statistik parametrik. Dengan uji *One way ANOVA* diketahui bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok kontrol dan perlakuan dengan nilai $p < 0,05$ ($p = 0,001$). Uji lanjut dengan *Post hoc* menunjukkan bahwa perbedaan tersebut terdapat pada kelompok K1 dengan K2 dengan nilai $p < 0.05$ ($p = 0,000$), kelompok K2 dengan kelompok P2 dengan nilai $p < 0.05$ ($p = 0,014$) dan kelompok K2 dengan kelompok P3 dengan nilai $p < 0.05$ ($p = 0,000$), sedangkan antara kelompok K2 dengan kelompok P1 tidak berbeda signifikan dengan nilai $p > 0.05$ ($p = 0,091$).

4.3 Efek Ekstrak *C. nutans* pada Kadar MDA Hepar Tikus Model DM

Kadar MDA Hepar diukur dengan metode spektrofotometri . Data Kadar MDA Hepar dapat dilihat pada Tabel 4.5 dan Gambar 4.5.

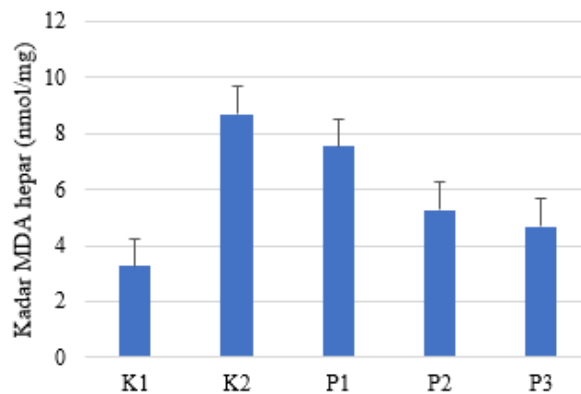
Tabel 4. 5 Kadar MDA Hepar

Kelompok Perlakuan	Kadar MDA Hepar (nmol/mg)
K1	3.25 ± 1.05
K2	8.69 ± 2.29 [#]
P1	7.52 ± 1.87
P2	5.25 ± 1.42 [*]
P3	4.67 ± 0.80 [*]

Data disajikan dalam mean ± SD (n=6).

* P<0.05 berbeda signifikan dengan K2 (Kontrol DM).

P<0.05 berbeda signifikan dengan K1 (Kontrol Normal).



Gambar 4. 5 Kadar MDA Hepar

Dari tabel 4.5 dan gambar 4.5 dapat dilihat bahwa kadar MDA hepar di akhir penelitian pada tikus DM tinggi, sedangkan tikus yang mendapat terapi ekstrak *C. nutans* mengalami penurunan kadar MDA hepar yaitu pada kelompok P1 sebesar 13%, kelompok P2 sebesar 40%, dan kelompok P3 sebesar 46% dibandingkan dengan kontrol normal.

Uji normalitas terhadap kadar MDA hepar di akhir penelitian menunjukkan nilai $p > 0.05$ ($p = 0.957$) dan uji homonegitas berat organ hepar termasuk kategori homogen dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,276$), sehingga dapat diuji dengan statistik parametrik. Dengan uji *One way ANOVA* diketahui bahwa kelompok kontrol berbeda dibandingkan kelompok P1, P2 dan P3 dengan nilai $p < 0,05$ ($p = 0,031$). Uji lanjut dengan *Post hoc* menunjukkan bahwa perbedaan tersebut terdapat pada

kelompok K1 dengan K2 dengan nilai $p < 0.05$ ($p = 0.010$), kelompok K2 dengan kelompok P2 dengan nilai $p < 0.05$ ($p = 0.020$), dan kelompok K2 dengan kelompok P3 dengan nilai $p < 0.05$ ($p = 0.000$), sedangkan K2 dengan P1 tidak berbeda signifikan.

4.4 Efek Ekstrak *C. nutans* pada Morfologi Hepar Tikus Model DM

Morfologi hepar diamati dengan pemeriksaan histopatologi menggunakan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE). Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x pada 5 lapang pandang yang berbeda. Hasil pengamatan disajikan pada Tabel 4.6 dan Gambar 4.6.

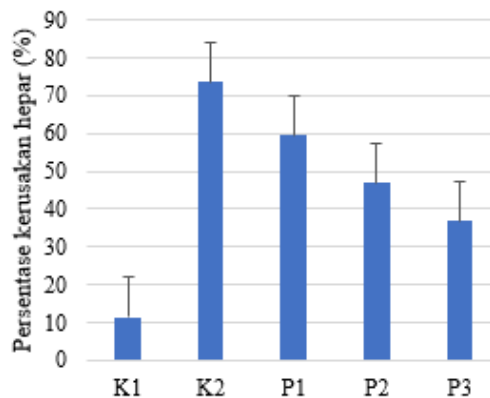
Tabel 4. 6 Persentase Kerusakan Morfologi Hepar

Kelompok Perlakuan	Persentase Kerusakan Hepar (%)
K1	11.50 ± 1.01
K2	73.67 ± 6.92 [#]
P1	59.58 ± 3.29 [*]
P2	47.00 ± 2.76 [*]
P3	36.92 ± 2.27 [*]

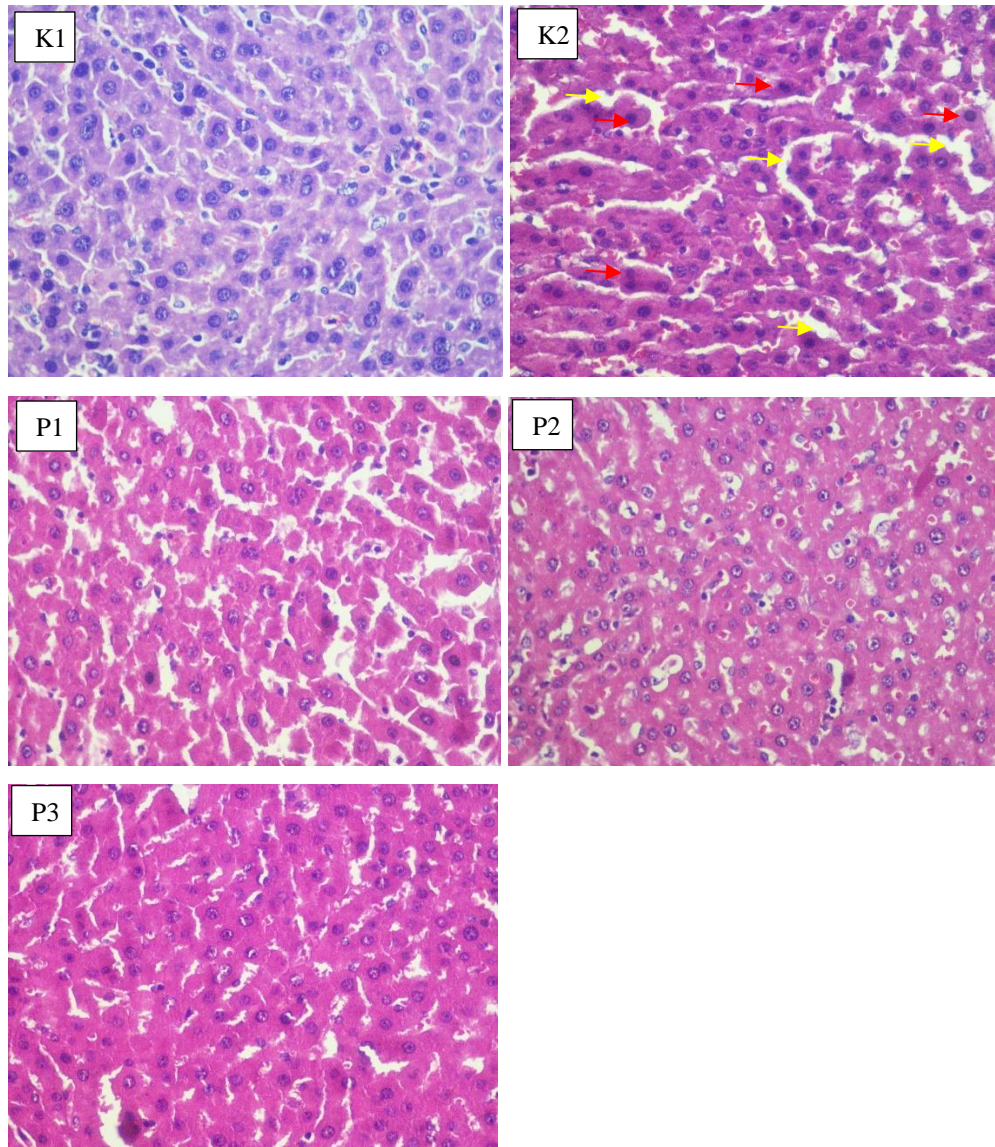
Data disajikan dalam mean ± SD (n=6).

* $P < 0.05$ berbeda signifikan dengan K2 (Kontrol DM).

$P < 0.05$ berbeda signifikan dengan K1 (Kontrol Normal).



Gambar 4. 6 Persentase Kerusakan Morfologi Hepar



Gambar 4. 7 Gambaran Mikroskopis Hepar (pengecatan HE, perbesaran 400x)

Dari tabel 4.6 dan gambar 4.6 dapat dilihat bahwa morfologi hepar pada tikus DM mengalami perubahan patologis diantaranya batas sel tidak jelas dan inti piknotik (panah merah) dan sinusoid melebar (panah kuning). Sedangkan tikus yang mendapat terapi ekstrak *C. nutans* mengalami perbaikan morfologi hepar yang bermakna, sebagaimana ditunjukkan pada gambar 4.7.

Uji normalitas terhadap persentase kerusakan hepar menunjukkan nilai $p < 0.05$ ($p = 0.009$) dan uji homonegitas termasuk kategori homogen dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,076$), sehingga asumsi parametrik tidak terpenuhi dan data diuji dengan statistic non parametrik. Dengan uji *Kruskal Wallis* diketahui bahwa kelompok kontrol berbeda dibandingkan kelompok P1, P2 dan P3 dengan nilai

$p < 0,05$ ($p = 0,000$). Uji lanjut dengan *Mann Whitney* menunjukkan bahwa perbedaan tersebut terdapat pada kelompok K1 dengan kelompok K2 dengan nilai $p < 0,05$ ($p = 0,000$), K2 dengan kelompok P1 dengan nilai $p < 0,05$ ($p = 0,000$), kelompok K2 dengan kelompok P2 dengan nilai $p < 0,05$ ($p = 0,000$), dan kelompok K2 dengan kelompok P3 dengan nilai $p < 0,05$ ($p = 0,000$).

4.5 Pembahasan

Tikus yang diinduksi diabetes mellitus menggunakan Streptozotocin, menunjukkan peningkatan kadar glukosa darah dan penurunan berat badan karena penurunan jumlah sel β pankreas penghasil insulin (Bayramoglu et al., 2014). Temuan dalam penelitian ini mirip dengan karakteristik diabetes mellitus ini. Streptozotocin menginduksi penghancuran sel β pankreas dan menyebabkan penurunan sintesis dan sekresi insulin serta menyebabkan hiperglikemia (Galicia-Garcia et al., 2020). Berkurangnya sekresi insulin juga menyebabkan penurunan berat badan karena kurangnya pemanfaatan karbohidrat sebagai sumber energi, sehingga meningkatkan pemecahan protein dan lemak melalui proses glikogenolisis, lipolisis dan proteolisis yang pada akhirnya menyebabkan hilangnya lemak dan jaringan otot (Eleazu et al., 2013).

Dalam penelitian ini, pemberian ekstrak *C. nutans* secara signifikan dapat menurunkan kerusakan oksidatif hepar yang disebabkan oleh diabetes. Dalam penelitian ini, sesuai dengan penelitian sebelumnya, kami menunjukkan bahwa STZ secara signifikan mampu meningkatkan konsentrasi glukosa darah, yang mengkonfirmasi keakuratan penelitian ini dalam induksi diabetes. Diabetes yang diinduksi STZ juga dikaitkan dengan perubahan signifikan pada disfungsi hati dan penanda stres oksidatif. Pembentukan radikal bebas dan penurunan kapasitas antioksidan adalah mekanisme utama untuk komplikasi diabetes (Giacco & Brownlee, 2010). Hepar merupakan salah satu organ yang terpengaruh oleh stres oksidatif akibat DM. Stres oksidatif yang diinduksi hiperglikemia dan gangguan pada metabolisme karbohidrat, protein dan lipid adalah penyebab paling penting dari kerusakan hepar pada pasien diabetes (Mohamed et al., 2016).

Berdasarkan hasil penelitian ini, tikus diabetes yang diinduksi STZ dan diberikan ekstrak *C. nutans* secara signifikan dapat menurunkan kadar glukosa

darah dibandingkan dengan kontrol tikus diabetes. Efek penurunan glukosa *C. nutans* ini juga telah dilaporkan secara signifikan dalam beberapa penelitian sebelumnya, diantaranya pemberian ekstrak air daun *C. nutans* 150 mg/kg selama 9 hari pada mencit yang diinduksi aloksan 50 mg/kg (Nurulita et al., 2012), pemberian ekstrak etanol daun *C. nutans* 15 mg/kg selama 14 hari pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak dan fruktosa (Retnaningsih et al., 2019), dan pemberian ekstrak etanol daun *C. nutans* 75 mg /kg selama 14 hari pada tikus yang diinduksi STZ 50 mg/kg (Dewinta et al., 2020).

Berdasarkan penelitian terdahulu, kemungkinan mekanisme yang terlibat dalam aktivitas antidiabetik *C. nutans* diantaranya: 1) *C. nutans* menurunkan penyerapan karbohidrat dari usus halus dan mencegah kenaikan kadar glukosa darah postprandial, 2) *C. nutans* meningkatkan sekresi insulin dari sel β pankreas, 3) *C. nutans* menurunkan hiperglikemia puasa kemungkinan akibat penurunan produksi glukosa endogen di hati, 4) *C. nutans* menurunkan resistensi insulin di jaringan perifer kemungkinan terkait dengan penurunan obesitas, perbaikan profil lipid, penurunan stres oksidatif dan peningkatan enzim antioksidan, 5) *C. nutans* mencegah komplikasi diabetes di organ akibat akumulasi sorbitol dan memperbaiki disfungsi endotel (Sarega et al., 2016; Sarega, Imam, Esa, et al., 2016; Abdullah & Kasim, 2017; Umar Imam et al., 2019; Abdulwahid Kurdi et al., 2019; Azemi et al. 2020).

Stres oksidatif meningkat pada Diabetes Mellitus sebagai akibat dari peningkatan tingkat produksi radikal bebas dan berkurangnya kemampuan antioksidan sel, yang semuanya dapat menyebabkan stres oksidatif dan kerusakan jaringan pada pasien diabetes (Chang & Chuang, 2010). Aktivitas antioksidan baik eksogen maupun endogen, memberikan kontribusi penting dalam pertahanan terhadap radikal bebas (Chtourou et al., 2010). Streptozotocin (STZ) menyebabkan sitotoksitas sel beta pankreas secara selektif dan telah banyak digunakan untuk menginduksi diabetes mellitus pada hewan, dan juga mengganggu mekanisme oksidatif metabolik seluler. Model hewan diabetes menunjukkan stres oksidatif yang tinggi karena hiperglikemia kronis yang mengakibatkan penurunan sistem pertahanan antioksidan dan memicu pembentukan radikal bebas (Maritim et al., 2003).

Pada hewan model diabetes yang diinduksi STZ, terbukti meningkatkan marker stres oksidatif seperti MDA dan menurunkan aktivitas enzim antioksidan endogen seperti SOD. Stres oksidatif menyebabkan peroksidasi lipid menyebabkan kerusakan langsung pada hepatosit dengan mengganggu membran, protein, dan DNA (Chang & Chuang, 2010). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada tikus model diabetes yang diinduksi STZ menunjukkan kadar MDA yang tinggi yaitu 8.69 ± 2.29 dan kadar SOD yang rendah yaitu 429.87 ± 97.01 U/mgprot. Pemberian terapi dengan ekstrak *C. nutans* dapat menurunkan kadar MDA hepar ($p < 0,05$) dan meningkatkan kadar SOD hepar ($p < 0,05$) secara signifikan. Efek ini dihubungkan dengan perbaikan stress oksidatif oleh ekstrak *C. nutans*. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya oleh (Sarega et al., 2016), dimana pemberian ekstrak air dan metanol dosis 250 mg/kgBB pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak dan kolesterol dapat menurunkan kadar MDA dan SOD serum secara signifikan.

Hati merupakan organ penting untuk penyimpanan, detoksifikasi, dan metabolisme sehingga sangat rentan terhadap kerusakan oksidatif. Hati merupakan organ penting yang fungsi utamanya adalah memelihara dan mengontrol glukosa darah dengan glikogenesis dan glikogenolisis. Kerusakan hepatosit dan produk peroksidasi lipid menginduksi respon inflamasi. Mekanisme kerusakan hati karena stres oksidatif melibatkan sekresi sitokin, terutama TNF- α , interleukin IL-1, dan IFN-c (Sugano et al., 2006). Dalam penelitian ini, pemeriksaan histopatologi hepar pada tikus DM menunjukkan perubahan degeneratif seperti adanya banyak hepatosit mengerut berwarna gelap dan inti gelap kecil (apoptosis). Pemberian ekstrak *C. nutans* pada berbagai dosis dapat memperbaiki morfologi struktural normal jaringan hepar pada tikus diabetes STZ, sehingga menunjukkan peran protektif terhadap kerusakan hati.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Adapun kesimpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Ekstrak etanol 70% daun *Clinacanthus nutans* dapat menurunkan kadar MDA hepar pada tikus DM yang diinduksi streptozotosin.
- b. Ekstrak etanol 70% daun *Clinacanthus nutans* dapat meningkatkan kadar SOD hepar pada tikus DM yang diinduksi streptozotosin.
- c. Ekstrak etanol 70% daun *Clinacanthus nutans* dapat memperbaiki morfologi hepar pada tikus DM yang diinduksi streptozotosin.

5.2 Saran

Mengingat masih banyaknya kekurangan dalam penelitian ini, peneliti menyarankan untuk melakukan penelitian lanjutan untuk:

- a. Mengamati penanda kerusakan hepar akibat diabetes mellitus yang lebih spesifik diantaranya apoptosis dengan pewarnaan imunohistokimia.
- b. Mengamati ekspresi beberapa protein yang terlibat dalam jalur kerusakan hepar akibat diabetes mellitus.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul Rahim, M. H., Zakaria, Z. A., Mohd Sani, M. H., Omar, M. H., Yakob, Y., Cheema, M. S., Ching, S. M., Ahmad, Z., & Abdul Kadir, A. (2016). Methanolic extract of *clinacanthus nutans* exerts antinociceptive activity via the opioid/nitric oxide-mediated, but cGMP-independent, pathways. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/1494981>
- Abolfathi, A. A., Mohajeri, D., Rezaie, A., & Nazeri, M. (2012). Protective effects of green tea extract against hepatic tissue injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/740671>
- ADA. (2019). Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in Diabetes-2019. *Diabetes Care*, 42(1), S13–S28. <https://doi.org/10.2337/dc18-S002>
- ADA. (2021). 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2021. *Diabetes Care*, 44(1), S15–S33. <https://doi.org/10.2337/dc21-S002>
- Aguilar, T. A. F., Navarro, B. C. H., & Pérez, J. A. M. (2016). Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress. In *A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2* (pp. 1–18). <https://doi.org/10.5772/65715>
- Ahmadieh, H., & Azar, S. T. (2014). Liver disease and diabetes: Association, pathophysiology, and management. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 104(1), 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.01.003>
- Al-Hussaini, A. A., Sulaiman, N. M., AlZahrani, M. D., Alenizi, A. S., & Khan, M. (2012). Prevalence of hepatopathy in type 1 diabetic children. *BMC Pediatrics*, 12(160), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2431-12-160>
- Al-Rasheed, N. M., Al-Rasheed, N. M., Hasan, I. H., Al-Amin, M. A., Al-Ajmi, H. N., Mohamad, R. A., & Mahmoud, A. M. (2017). Simvastatin Ameliorates Diabetic Cardiomyopathy by Attenuating Oxidative Stress and Inflammation in Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1092015>
- Al Hroob, A. M., Abukhalil, M. H., Hussein, O. E., & Mahmoud, A. M. (2019). Pathophysiological mechanisms of diabetic cardiomyopathy and the therapeutic potential of epigallocatechin-3-gallate. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109(October 2018), 2155–2172. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.086>
- Alam, A., Ferdosh, S., Ghafoor, K., Hakim, A., Juraimi, A. S., Khatib, A., & Sarker, Z. I. (2016). *Clinacanthus nutans*: A review of the medicinal uses, pharmacology and phytochemistry. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 1–8. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764516300116>
- Alam, M. A., Zaidul, I. S. M., Ghafoor, K., Ferdosh, S., Ali, M. E., Mirhosseini, H., Kamaruzzaman, B. Y., Jahurul, M. H. A., & Khatib, A. (2017). Identification of bioactive compounds with GC–Q–TOF–MS in the extracts from *Clinacanthus nutans* using subcritical carbon dioxide extraction. *Separation*

- Alam, M. A., Zaidul, I. S. M., Ghafoor, K., Sahena, F., Hakim, M., Rafii, M. Y., Abir, H. M., Bostanudin, M. F., Perumal, V., & Khatib, A. (2017). In vitro antioxidant and, α -glucosidase inhibitory activities and comprehensive metabolite profiling of methanol extract and its fractions from *Clinacanthus nutans*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(181), 1–10. <https://link.springer.com/article/10.1186/s12906-017-1684-5>
- Ali Khan, M. W., Banga, K., & Ali, W. (2012). Gluco-Oxidation of Proteins in Etiology of Diabetic Retinopathy. *Diabetic Retinopathy*. <https://doi.org/10.5772/29090>
- Andreas, H., Trianto, H. F., & Ilmiawan, M. I. (2015). Gambaran Histologi Regenerasi Hati Pasca Penghentian Paparan Monosodium Glutamat pada Tikus Wistar. *EJournal Kedokteran Indonesia*, 3(1), 29–36. <https://doi.org/10.23886/ejki.3.4804>.
- Arullappan, S., Rajamanickam, P., Thevar, N., & Kodimani, C. C. (2014). In vitro screening of cytotoxic, antimicrobial and antioxidant activities of *Clinacanthus nutans* (Acanthaceae) leaf extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(9), 1455–1461. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i9.11>
- Aslam, M. S., Ahmad, M. S., & MAMAT, A. (2015). A review on phytochemical constituents and pharmacological activities of *Clinacanthus nutans*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 7(2), 30–33. http://www.academia.edu/download/38621769/clinacanthus_nutans.pdf
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1–31. https://doi.org/10.1007/978-3-211-33303-7_2
- Azam, A. A., Ismail, I. S., Shaikh, M. F., Shaari, K., & Abas, F. (2019). Effects of *Clinacanthus nutans* leaf extract on lipopolysaccharide -induced neuroinflammation in rats: A behavioral and 1H NMR-based metabolomics study. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 9(2), 164–186. <https://doi.org/10.22038/ajp.2018.11787>
- Banday, M. Z., Sameer, A. S., & Nissar, S. (2020). Pathophysiology of diabetes: An overview. *Avicenna Journal of Medicine*, 10, 174–188. https://doi.org/10.4103/ajm.ajm_53_20
- Bayramoglu, G., Senturk, H., Bayramoglu, A., Uyanoglu, M., Colak, S., Ozmen, A., & Kolankaya, D. (2014). Carvacrol partially reverses symptoms of diabetes in STZ-induced diabetic rats. *Cytotechnology*, 66, 251–257. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9563-5>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Chang, Y. C., & Chuang, L. M. (2010). The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: From molecular mechanism to clinical implication. *American Journal of Translational Research*, 2(3), 316–331.
- Chelyn, J. L., Omar, M. H., Mohd Yousof, N. S. A., Ranggasamy, R., Wasiman, M. I., & Ismail, Z. (2014). Analysis of flavone C- glycosides in the leaves of

- clinacanthus nutans (Burm. f.) Lindau by HPTLC and HPLC-UV/DAD. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/724267>
- Cherdchu, C., Poopyruchpong, N., Adchariyasucha, R., & Ratanabanangkoon, K. (1977). The absence of antagonism between extracts of *Clinacanthus nutans* Burm . and *Naja naja siamensis* venom. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 8(2), 249–254.
- Chtourou, Y., Fetoui, H., Sefi, M., Trabelsi, K., Barkallah, M., Boudawara, T., Kallel, H., & Zeghal, N. (2010). Silymarin, a natural antioxidant, protects cerebral cortex against manganese-induced neurotoxicity in adult rats. *BioMetals*, 23, 985–996. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9345-x>
- Cohen, J. C., Horton, J. D., & Hobbs, H. H. (2011). Human fatty liver disease: Old questions and new insights. *Science*, 332(6037), 1519–1523. <https://doi.org/10.1126/science.1204265>
- Crawford, J. (2009). Liver and biliary tract. In *Robbins Pathologic Basis of Disease* (pp. 833–890). <https://doi.org/10.4236/jct.2013.46121>
- Daduang, S., Sattayasai, N., Sattayasai, J., Tophrom, P., Thammathaworn, A., Chaveerach, A., & Konkchaiyaphum, M. (2005). Screening of plants containing *Naja naja siamensis* cobra venom inhibitory activity using modified ELISA technique. *Analytical Biochemistry*, 341, 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.03.037>
- Dewinta, N. R., Mukono, I. S., & Mustika, A. (2020). Pengaruh Pemberian Ekstrak Dandang Gendis (*Clinacanthus nutans*) Terhadap Kadar Glukosa Darah pada Tikus Wistar Model Diabetes Melitus. *Jurnal Medik Veteriner*, 3(1), 76–81. <https://e-journal.unair.ac.id/JMV/article/view/16260/9959>
- Eleazu, C. O., Eleazu, K. C., Chukwuma, S., & Essien, U. N. (2013). Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 12(60), 1–7. <https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-60>
- Elsayed Azab, A., A Adwas, Almokhtar, Ibrahim Elsayed, A. S., A Adwas, A., Ibrahim Elsayed, Ata Sedik, & Quwaydir, F. A. (2019). Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, 6(1), 43–47. <https://doi.org/10.15406/jabb.2019.06.00173>
- Evans, E. P. P., Scholten, J. T. M., Mzyk, A., Reyes-san-martin, C., Llumbet, A. E., Hamoh, T., Arts, E. G. J. M., Schirhagl, R., Astrid, E., & Cantineau, P. (2021). Redox Biology Male subfertility and oxidative stress. *Redox Biology*, 46(May), 102071. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102071>
- Fakhrudin, S., Alanazi, W., & Jackson, K. E. (2017). Diabetes-Induced Reactive Oxygen Species: Mechanism of Their Generation and Role in Renal Injury. *Journal of Diabetes Research*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8379327>
- Fong, S. Y., Piva, T., Urban, S., & Huynh, T. (2014). Genetic homogeneity of vegetatively propagated *Clinacanthus nutans* (Acanthaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(25), 903–914. <https://doi.org/10.5897/jmpr2013.5328>
- Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6275), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>

- García-compeán, D., Jáquez-quintana, J. O., Lavallo-gonzález, F. J., Reyes-cabello, E., González-gonzález, J. A., Muñoz-espinoza, L. E., Vázquez-elizondo, G., Villarreal-pérez, J. Z., & Maldonado-garza, H. J. (2012). The prevalence and clinical characteristics of glucose metabolism disorders in patients with liver cirrhosis . A prospective study. *Annals of Hepatology*, *11*(2), 240–248. [https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)31030-0](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31030-0)
- Ghasemzadeh, A., Nasiri, A., Jaafar, H. Z. E., Baghdadi, A., & Ahmad, I. (2014). Changes in phytochemical synthesis, chalcone synthase activity and pharmaceutical qualities of sabah snake grass (*Clinacanthus nutans* L.) in relation to plant age. *Molecules*, *19*, 17632–17648. <https://doi.org/10.3390/molecules191117632>
- Giacco, F., & Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*, *107*(9), 1058–1070. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>
- Gonzalez, A., Huerta-Salgado, C., Orozco-Aguilar, J., Aguirre, F., Tacchi, F., Simon, F., & Cabello-Verrugio, C. (2020). Role of Oxidative Stress in Hepatic and Extrahepatic Dysfunctions during Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2020*, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2020/1617805>
- Gunasekaran, U. (2014). *CALLUS INDUCTION AND PLANT REGENERATION STUDIES OF CLINACANTHUS NUTANS (SABAH SNAKE GRASS)* [Universiti Tunku Abdul Rahman]. <https://doi.org/10.13140/2.1.2180.5443>
- Gupta, D. (2015). Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *6*(2), 546–566. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(2\).546-66](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(2).546-66)
- Güven, A., Yavuz, O., Cam, M., Ercan, F., Bukan, N., Comunoglu, C., & Gokce, F. (2006). Effects of melatonin on streptozotocin-induced diabetic liver injury in rats. *Acta Histochemica*, *108*, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2006.03.005>
- Hanchang, W., Khamchan, A., Wongmanee, N., & Seedadee, C. (2019). Hesperidin ameliorates pancreatic β -cell dysfunction and apoptosis in STZ streptozotocin-induced diabetic rat model. *Life Sciences*, *235*(2019), 1–9.
- Harding, J. L., Pavkov, M. E., Magliano, D. J., Shaw, J. E., & Gregg, E. W. (2019). Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. *Diabetologia*, *62*, 3–16. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4711-2>
- Huang, D., Li, Y., Cui, F., Chen, J., & Sun, J. (2016). Purification and characterization of a novel polysaccharide-peptide complex from *Clinacanthus nutans* Lindau leaves. *Carbohydrate Polymers*, *137*, 701–708. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.102>
- IDF. (2021). *IDF Diabetes Atlas 10th Edition*.
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, *54*, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Ilonen, J., Lempainen, J., & Veijola, R. (2019). The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, *15*(11), 635–650. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0254-y>

- Ismail, N. Z., Toha, Z. M., Muhamad, M., Kamal, N. N. S. N. M., Zain, N. N. M., & Arsad, H. (2020). Antioxidant Effects, Antiproliferative Effects, and Molecular Docking of *Clinacanthus nutans* Leaf Extracts. *Molecules*, 25(2067), 1–18.
- Jacobo-Velázquez, D. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2017). *molecules Editorial Recent Advances in Plant Phenolics*. <https://doi.org/10.3390/molecules22081249>
- Janwitayanuchit, W., Suwanborirux, K., Patarapanich, C., Pummangura, S., Lipipun, V., & Vilaivan, T. (2003). Synthesis and anti-herpes simplex viral activity of monoglycosyl diglycerides. *Phytochemistry*, 64, 1253–1264. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.09.008>
- Kamarudin, M. N. A., Sarker, M. R., Kadir, H. A., & Ming, L. C. (2017). Ethnopharmacological uses, phytochemistry, biological activities, and therapeutic applications of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau: A comprehensive review. *Journal of Ethnopharmacology*, 206(2017), 245–266. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.05.007>
- Katakami, N. (2017). Mechanism of development of atherosclerosis and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 24, 1–13. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17014>
- Khoo, L. W., Audrey Kow, S., Lee, M. T., Tan, C. P., Shaari, K., Tham, C. L., & Abas, F. (2018). A Comprehensive Review on Phytochemistry and Pharmacological Activities of *Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1–39. <https://doi.org/10.1155/2018/9276260>
- Khoo, L. W., Mediani, A., Zolkeflee, N. K. Z., Leong, S. W., Ismail, I. S., Khatib, A., Shaari, K., & Abas, F. (2015). Phytochemical diversity of *Clinacanthus nutans* extracts and their bioactivity correlations elucidated by NMR based metabolomics. *Phytochemistry Letters*, 14, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.09.015>
- Kong, H. S., Musa, K. H., & Abdullah Sani, N. (2016). *Clinacanthus nutans* (Belalai Gajah / Sabah Snake Grass): Antioxidant optimization on leaves and stems. *AIP Conference Proceedings*, 1784, 1–6. <https://doi.org/10.1063/1.4966768>
- Kosai, P., Sirisidthi, K., & Jiraungkoorskul, W. (2016). Evaluation of total phenolic compound and cytotoxic activity of *Clinacanthus nutans*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 283–286. <https://www.ijpsonline.com/abstract/evaluation-of-total-phenolic-compound-and-cytotoxic-activity-of-iclinacanthus-nutansi-3182.html>
- Kunsorn, P., Ruangrunsi, N., Lipipun, V., Khanboon, A., & Rungsihirunrat, K. (2013). The identities and anti-herpes simplex virus activity of *Clinacanthus nutans* and *Clinacanthus siamensis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(4), 284–290. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60064-7](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60064-7)
- Leung, T. M., & Nieto, N. (2013). CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 58, 395–398. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.08.018>
- Lorente, L., Martín, M. M., Abreu-González, P., Domínguez-Rodríguez, A., Labarta, L., Díaz, C., Solé-Violán, J., Ferreres, J., Cabrera, J., Igeño, J. C., & Jiménez, A. (2013). Sustained high serum malondialdehyde levels are associated with severity and mortality in septic patients. *Critical Care*, 17(6).

<https://doi.org/10.1186/cc13155>

- Lucchesi, A. N., Cassettari, L. L., & Spadella, C. T. (2015). Alloxan-induced diabetes causes morphological and ultrastructural changes in rat liver that resemble the natural history of chronic fatty liver disease in humans. *Journal of Diabetes Research*, 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/494578>
- Mai, C. W., Yap, K. S. I., Kho, M. T., Ismail, N. H., Yusoff, K., Shaari, K., Chin, S. Y., & Lim, E. S. H. (2016). Mechanisms underlying the anti-inflammatory effects of *Clinacanthus nutans* lindau extracts: Inhibition of cytokine production and toll-like receptor-4 activation. *Frontiers in Pharmacology*, 7(7), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00007>
- Maritim, A. C., Sanders, R. A., & Watkins, J. B. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(1), 24–38. <https://doi.org/10.1002/jbt.10058>
- Mohamed, J., Nazratun Nafizah, A. H., Zariyantey, A. H., & Budin, S. B. (2016). Mechanisms of Diabetes-Induced Liver Damage The role of oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 16(2), 132–141. <https://doi.org/10.18295/squmj.2016.16.02.002>
- Ore, A., & Akinloye, O. A. (2019). Oxidative stress and antioxidant biomarkers in clinical and experimental models of non-alcoholic fatty liver disease. *Medicina (Lithuania)*, 55(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/medicina55020026>
- Ozougwu, O. (2013). The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology*, 4(4), 46–57. <https://doi.org/10.5897/jpap2013.0001>
- Pannangpetch, P., Laupattarakasem, P., Kukongviriyapan, V., Kukongviriyapan, U., Kongyingyoes, B., & Aromdee, C. (2007). Antioxidant activity and protective effect against oxidative hemolysis of *Clinacanthus nutans* (Burm.f) Lindau. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 29(SUPPL. 1), 1–9.
- PERKENI. (2021). Pedoman Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 Dewasa di Indonesia 2021. In *GPB Perkeni*. www.ginasthma.org.
- Quah, S. Y., Chin, J. H., Akowuah, G. A., Khalivulla, S. I., Yeong, S. W., & Sabu, M. C. (2017). Cytotoxicity and cytochrome P450 inhibitory activities of *Clinacanthus nutans*. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*, 32(1), 59–65. <https://doi.org/10.1515/dmpt-2016-0034>
- Ramadan, M. A., Pramaningtyas, M. D., & Lusiantari, R. (2022). Derajat Fibrosis Dan Nas Pada Hepar Tikus Diabetes Mellitus Tipe 2 Remaja. *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan : Publikasi Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya*, 9(1), 83–90. <https://doi.org/10.32539/jkk.v9i1.151315>
- Regnell, S. E., & Lernmark, Å. (2011). Hepatic steatosis in type 1 diabetes. *Review of Diabetic Studies*, 8, 454–467. <https://doi.org/10.1900/RDS.2011.8.454>
- Riyaphan, J., Jhong, C. H., Lin, S. R., Chang, C. H., Tsai, M. J., Lee, D. N., Sung, P. J., Leong, M. K., & Weng, C. F. (2018). Hypoglycemic efficacy of docking selected natural compounds against α -glucosidase and α -amylase. *Molecules*, 23(2260), 1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules23092260>
- Romagnoli, M., Gomez-Cabrera, M. C., Perrelli, M. G., Biasi, F., Pallardó, F. V., Sastre, J., Poli, G., & Viña, J. (2010). Xanthine oxidase-induced oxidative stress causes activation of NF- κ B and inflammation in the liver of type I

- diabetic rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.024>
- Román-Pintos, L. M., Villegas-Rivera, G., Rodríguez-Carrizalez, A. D., Miranda-Díaz, A. G., & Cardona-Muñoz, E. G. (2016). Diabetic polyneuropathy in type 2 diabetes mellitus: Inflammation, oxidative stress, and mitochondrial function. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2016/3425617>
- Sakdarat, S., Shuyprom, A., Pientong, C., Ekalaksananan, T., & Thongchai, S. (2009). Bioactive constituents from the leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(5), 1857–1860. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.059>
- Sakdarat, S., Sittiso, S., Ekalaksananan, T., Pientong, C., Charoensri, N., & Kongyingyoes, B. (2010). Study on Effects of Compounds from *Clinacanthus Nutans* on Dengue Virus Type 2 Infection. *Srinagarind Med J*, 25, 272–275. <https://doi.org/10.2139/ssrn.2961652>
- Sami, A., Taru, M., Salme, K., & Jari, Y. (2006). Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.04.006>
- Sarega, N., Imam, M. U., Ooi, D. J., Chan, K. W., Esa, N. M., Zawawi, N., & Ismail, M. (2016). Phenolic rich extract from *Clinacanthus nutans* attenuates hyperlipidemia-associated oxidative stress in rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–16. <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/4137908/abs/>
- Shah, M. S., & Brownlee, M. (2016). Molecular and cellular mechanisms of cardiovascular disorders in diabetes. *Circulation Research*, 118(11), 1808–1829. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.306923>
- Shim, S. Y., Aziana, I., & Khoo, B. Y. (2013). Perspective and insight on *Clinacanthus nutans* Lindau in traditional medicine. *International Journal of Integrative Biology*, 14(1), 7–9.
- Singh, Z., & Kaur, R. (2014). *Review Article Use of Malondialdehyde as a Biomarker for Assessing Oxidative Stress in Different Disease Pathologies : a Review. March 2016.*
- Sookmai, W., Ekalaksananan, T., Pientong, C., Sakdarat, S., & Kongyingyoes, B. (2011). The Anti-Papillomavirus Infectivity of *Clinacanthus nutans* Compounds. *Srinagarind Med J*, 26, 240–243.
- Sugano, M., Yamato, H., Hayashi, T., Ochiai, H., Kakuchi, J., Goto, S., Nishijima, F., Iino, N., Kazama, J. J., Takeuchi, T., Mokuda, O., Ishikawa, T., & Okazaki, R. (2006). High-fat diet in low-dose-streptozotocin-treated heminephrectomized rats induces all features of human type 2 diabetic nephropathy: A new rat model of diabetic nephropathy. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 16, 477–484. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.08.007>
- Sun, H., Saeedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B. B., Stein, C., Basit, A., Chan, J. C. N., Claude, J., Pavkov, M. E., Ramachandaran, A., Wild, S. H., James, S., Herman, W. H., Zhang, P., Bommer, C., Kuo, S., Boyko, E. J., & Magliano, D. J. (2022). IDF Diabetes Atlas : Global , regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 183, 1–13.

<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119>

- Tabatabaie, P. S., & Yazdanparast, R. (2017). Teucrium polium extract reverses symptoms of streptozotocin-induced diabetes in rats via rebalancing the Pdx1 and FoxO1 expressions. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *93*, 1033–1039. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.082>
- Tan, C. S., Ho, C. F., Heng, S., Wu, J., Tan, B. K., Sun, G. Y., Ng, Y., Lin, T., & Ong, W.-Y. (2016). Clinacanthus nutans Extracts Modulate Epigenetic Link to Cytosolic Phospholipase A 2 Expression in SH-SY5Y Cells and Primary Cortical Neurons. *NeuroMolecular Medicine*, *18*(3), 441–452. <https://doi.org/10.1007/s12017-016-8404-z>
- Tan, L. T.-H., Khaw, K. Y., Ong, Y. S., Khan, T. M., Lee, L.-H., Wai-Leng Lee, & Goh, B.-H. (2020). An Overview of Clinacanthus nutans (Burm. f.) Lindau as a Medicinal Plant with Diverse Pharmacological Values. In M. K. Swamy (Ed.), *Plant-derived Bioactives Production, Properties and Therapeutic Applications* (pp. 461–492). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1761-7>
- Teoh, P. L., Cheng, A. Y. F., Liau, M., Lem, F. F., Kaling, G. P., Chua, F. N., & Cheong, B. E. (2017). Chemical composition and cytotoxic properties of Clinacanthus nutans root extracts. *Pharmaceutical Biology*, *55*(1), 394–401. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1242145>
- Teshima, K., Kaneko, T., Ohtani, K., Kasai, R., Lhieochaiphant, S., Picheansoonthon, C., & Yamasaki, K. (1998). Sulfur-containing glucosides from Clinacanthus nutans. *Phytochemistry*, *48*(5), 831–835.
- Thongchai, S., Ekalaksananan, T., Pientong, C., Aromdee, C., Kongyingyoes, B., & Seubsasana, S. (2008). Anti-Herpes Simplex Virus Type 1 Activity of Crude Ethyl Acetate Extract of Clinacanthus nutans Lindau. *J Sci Technol Mahasarakham Univ*, *27*(4), 318–326. <https://doi.org/10.5481/kkujgs.2008.08.2.7>
- Tiwari, B. K., Pandey, K. B., Abidi, A. B., & Rizvi, S. I. (2013). Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. *Journal of Biomarkers*, *2013*, 1–8. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2013/378790>
- Tu, S. F., Liu, R. H., Cheng, Y. Bin, Hsu, Y. M., Du, Y. C., El-Shazly, M., Wu, Y. C., & Chang, F. R. (2014). Chemical constituents and bioactivities of Clinacanthus nutans aerial parts. *Molecules*, *19*, 20382–20390. <https://doi.org/10.3390/molecules191220382>
- Tundis, R., Loizzo, M. R., & Menichini, F. (2010). Natural Products as α-Amylase and α-Glucosidase Inhibitors and their Hypoglycaemic Potential in the Treatment of Diabetes: An Update. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, *10*, 315–331. <https://doi.org/10.2174/138955710791331007>
- Uawonggul, N., Chaveerach, A., Thammasirirak, S., Arkaravichien, T., Chuachan, C., & Daduang, S. (2006). Screening of plants acting against Heterometrus laoticus scorpion venom activity on fibroblast cell lysis. *Journal of Ethnopharmacology*, *103*, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.003>
- Uawonggul, N., Thammasirirak, S., Chaveerach, A., Chuachan, C., Daduang, J., & Daduang, S. (2011). Plant extract activities against the fibroblast cell lysis by honey bee venom. *Journal of Medicinal Plants Research*, *5*(10), 1978–1986.
- Umar Imam, M., Ismail, M., George, A., Chinnappan, S. M., & Yusof, A. (2019). Aqueous leaf extract of Clinacanthus nutans improved metabolic indices and

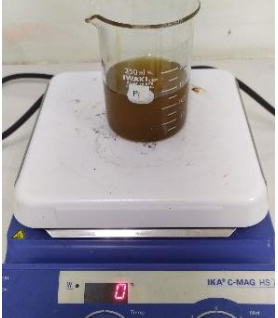






- sorbitol-related complications in type II diabetic rats (T2D). *Food Science and Nutrition*, 7(4), 1482–1493. <https://doi.org/10.1002/fsn3.988>
- Wanikiat, P., Panthong, A., Sujayanon, P., Yoosook, C., Rossi, A. G., & Reutrakul, V. (2008). The anti-inflammatory effects and the inhibition of neutrophil responsiveness by *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.035>
- WHO. (2019). Classification of diabetes mellitus. In *World Health Organization*.
- Wu, J. S., Kao, M. H., Tsai, H. Da, Cheung, W. M., Chen, J. J., Ong, W. Y., Sun, G. Y., & Lin, T. N. (2018). *Clinacanthus nutans* Mitigates Neuronal Apoptosis and Ischemic Brain Damage Through Augmenting the C/EBP β -Driven PPAR- γ Transcription. *Molecular Neurobiology*, 55(7), 5425–5438. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0776-z>
- Y. Parmar, M. (2018). Obesity and Type 2 diabetes mellitus. *Integrative Obesity and Diabetes*, 4(4), 1–2. <https://doi.org/10.15761/iob.1000217>
- Yan, L. J. (2014). Pathogenesis of chronic hyperglycemia: From reductive stress to oxidative stress. *Journal of Diabetes Research*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/137919>
- Yang, H. S., Peng, T. W., Madhavan, P., Shukkoor, M. S. A., & Akowuah, G. A. (2013). Phytochemical analysis and antibacterial activity of methanolic extract of *Clinacanthus nutans* leaf. *International Journal of Drug Development and Research*, 5(3), 349–355.
- Yeo, B. S., Yap, Y. J., Koh, R. Y., Ng, K. Y., & Chye, S. M. (2018). Medicinal properties of *Clinacanthus nutans*: A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 17(2), 375–382. <https://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/167899>
- Yong, Y. K., Tan, J. J., Teh, S. S., Mah, S. H., Ee, G. C. L., Chiong, H. S., & Ahmad, Z. (2013). *Clinacanthus nutans* extracts are antioxidant with antiproliferative effect on cultured human cancer cell lines. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/462751>
- Younossi, Z. M., Golabi, P., De, L., Burns, L., & Afendy, A. (2019). The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes : A systematic review and meta-analysis The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type. *Journal of Hepatology*, 71, 793–801. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.06.021>
- Younus, H. (2018). Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *International Journal of Health Sciences*, 12(3), 88–93.
- Yuann, J. P., Wang, J., Jian, H., Lin, C., & Liang, J. (2012). Effects of *Clinacanthus nutans* (Burm.f) Lindau leaf extracts on protection of plasmid DNA from riboflavin photoreaction. *MC Trans Biotechnol*, 4(e5), 45–58.
- Zakaria, Z. A., Abdul Rahim, M. H., Mohd Sani, M. H., Omar, M. H., Ching, S. M., Abdul Kadir, A., & Ahmed, Q. U. (2019). Antinociceptive activity of petroleum ether fraction obtained from methanolic extract of *Clinacanthus nutans* leaves involves the activation of opioid receptors and NO-mediated/cGMP-independent pathway. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(79), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2486-8>
- Zheng, Y., Ley, S. H., & Hu, F. B. (2018). Global aetiology and epidemiology of

type 2 diabetes mellitus and its complications. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 14, Issue 2, pp. 88–98).
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>

LAMPIRAN

Dokumentasi Penelitian

		
Penyiapan kandang tikus	Penyiapan pakan tikus	Penyiapan minuman tikus
		
Penimbangan berat badan tikus	Kondisi kandang tikus	Ekstrak etanol daun <i>C. nutans</i>
		
Streptozocin merek <i>ChemCruz</i>	Penimbangan STZ	Pembuatan larutan natrium sitrat dan asam sitrat untuk buffer sitrat
		
Larutan buffer sitrat	Larutan STZ yang sudah dilarutkan dengan buffer sitrat diaspirasi	STZ diinjeksikan secara intraperitoneal pada tikus

		
<p>Sodium Carboxymethyl Cellulose (Na CMC)</p>	<p>Penimbangan Na CMC</p>	<p>Na CMC dilarutkan dengan aquades di <i>magnetic steerer</i></p>
		
<p>Ekstrak etanol daun <i>C. nutans</i> ditimbang</p>	<p>Ekstrak etanol daun <i>C. nutans</i> dilarutkan dengan Na CMC</p>	<p>Penyondean tikus</p>
		
<p>Gula darah tikus diukur dari ekor pembuluh darah</p>	<p>Glukometer merek <i>Accu Chek</i></p>	<p>Injeksi Xyla Ketamine pada tikus secara IM</p>
		
<p>Pembedahan tikus</p>	<p>Penimbangan organ hepar tikus</p>	<p>Sentrifus kecepatan 10.000 g selama 10 menit</p>