

**PENGARUH KOMBINASI DAUN STEVIA
(*Stevia rebaudiana* Best) DAN EKSTRAK ETANOL
DAUN SAMBILOTO (*Andrographidis folium*)
TERHADAP STRESS OKSIDATIF PADA TIKUS
DIABETES MILITUS YANG DIINDUKSI ALOXAN**

Petrus Rizky P¹⁾, Sepgiarno Ambar Pradini²⁾, Farah Ayu Dian³⁾

^{1,2,3}Prodi D-III Farmasi STIKes Nasional Surakarta

petruzzrizky@gmail.com

ABSTRAK

Global Diabetes Statistic melaporkan bahwa pada tahun 2003 terdapat 194 juta jiwa di dunia menderita DM dan akan meningkat menjadi 333 juta jiwa pada tahun 2025. Keadaan hiperglikemi juga terlibat dalam prose pembedakan radikal bebas yang di tandai dengan adanya kenaikan kadar Lipid Peroksida (LPO) dan penurunan Glutathion (GSH). Pengobatan Diabetes dapat diatasi dengan antioksidan, senyawa antioksidan sintetik maupun alami mampu mengontrol kadar glukosa dalam darah dan mencegah timbulnya komplikasi diabetes. Stevia mempunyai nilai IC₅₀ sebesar 8,02 µg/ml dan sambiloto mempunyai nilai IC₅₀ sebesar 6,5 µg/ml. Penelitian dilakukan untuk mengetahui efektifitas optimal kombinasi ekstrak etanol daun stevia dan daun sambiloto terhadap stress oksidatif pada tikus diabetes melitus dibandingkan dalam bentuk tunggal. Metode penelitian menggunakan uji praklinis dengan menginduksi aloksan pada tikus putih jantan. Penelitian menggunakan 40 tikus putih jantan yang dibagi secara acak menjadi 8 kelompok. Kelompok I sebagai kontrol normal diberi aquadest, kelompok II sebagai kontrol negatif diberi CMC Na 0.5%, kelompok III sebagai kontrol positif diberi glibenklamid dosis 1,26 mg/KgBB, kelompok IV sampai V diberi dosis tunggal ekstrak etanol daun stevia 100% dan sambiloto 100%, dan untuk kelompok VI - VIII berturut-turut diberi kombinasi perbandingan STSA 75:25, STSA 50:50, STSA 25: 75 (dalam persen). Kemudian dilakukan analisis penentuan parameter stress oksidatif dengan pengukuran kadar LPO dan kadar GSH. Pemberian kombinasi ekstrak etanol daun stevia dan daun sambiloto mampu menurunkan kadar LPO (Lipid Peroxidation) dan meningkatkan kadar GSH pada tikus Diabetes Melitus yang diinduksi Aloksan secara signifikan dengan nilai (P<0,05). Dosis optimal ekstrak etanol daun stevia dan ekstrak etanol daun sambiloto yang mampu menurunkan kadar LPO pada tikus Diabetes Melitus yang diinduksi adalah dosis STSA 75% : 25% yaitu 75 mg/kg BB stevia : 5,12 mg/ kg BB sambiloto.

Kata Kunci : LPO, Stevia, Sambiloto, IC50, Diabetes Melitus

ABSTRACT

Global Diabetes Statistic reports that in 2003 there were 194 million people in the world suffering from DM and would increase to 333 million by 2025. The hyperglycemic state is also involved in the free radical free radical process which is marked by elevated levels of lipid peroxide (LPO) and decreased Glutathion (GSH). Treatment Diabetes can be overcome with antioxidants, synthetic or natural antioxidant compounds (from various plants) are able to control blood glucose levels and prevent the occurrence of diabetes complications. Stevia has IC₅₀ value of 8.02 ig / ml and sambiloto has IC₅₀ value of 6.5 ig / ml. This study was conducted to determine the optimal effectiveness of ethanol extract combination of stevia leaves and bitter leaves of oxidative stress in diabetic melitus rats compared in

single form. The method used in this study was by conducting preclinical testing by inducing alloxan in male white rats. The study used 40 male white rats divided randomly into 8 groups. Group I as a normal control was given aquadest, group II as negative control was given CMC Na 0.5%, group III as positive control was given glibenclamide dose 1.26 mg / KgBB, group IV to V were given single dose of 100% stevia ethanol extract and 100 %, And for groups VI - VIII were given a combination of STSA 75:25, STSA 50:50, STSA 25: 75 (in percent), respectively. Then the analysis determines the parameters of oxidative stress with measurement of levels of LPO and GSH levels. The combination of ethanol extract of stevia leaf and bitter leaf was able to decrease LPO (Lipid Peroxidation) and increase GSH level in Aloxan-induced Diabetes Melitus mice significantly with value ($P < 0,05$). The optimal dose of ethanol extract of stevia leaf and ethanol extract of bitter leaf that can decrease LPO level in mouse Diabetes Mellitus induced is 75%: 25% STSA dose ie 75 mg / kg BW stevia: 5.12 mg / kg BB sambiloto.

Keywords: LPO, Stevia, Sambiloto, IC50, Diabetes Mellitus

1. PENDAHULUAN

Diabetes Militus (DM) atau dikalangan masyarakat dikenal sebagai kencing manis adalah suatu penyakit metabolik yang memiliki karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena adanya kelainan sekresi insulin, kerja insulin, ataupun keduanya. Keluhan awal berupa peningkatan rasa haus (*polidipsia*) dan lapar (*polifagia*) yang disertai penambahan volume atau frekuensi berkemih (*poliuria*). DM ditetapkan dengan pemeriksaan kadar gula darah sewaktu mencapai 200 mg/dl atau pemeriksaan kadar gula darah sewaktu puasa mencapai 126 mg/dl (Soegondo, 2010). Terdapat 2 jenis penyakit DM, yaitu DM tipe 1 (*insulin-dependent diabetes melitus*) yaitu kondisi dimana defisiensi produksi insulin oleh pankreas, kondisi ini hanya dapat diobati dengan pemberian insulin. DM tipe 2 (*non insulin dependent diabetes melitus*) yang terjadi akibat ketidakmampuan tubuh untuk berespon dengan wajar terhadap aktivitas insulin yang dihasilkan pankreas (resistensi insulin), sehingga tidak tercapai kadar glukosa normal dalam darah (Maulana, 2008). *Global Diabetes Statistic* melaporkan bahwa pada tahun 2003 terdapat 194 juta jiwa di dunia menderita DM dan akan meningkat menjadi 333 juta jiwa pada tahun 2025.

Pengobatan dan pemeliharaan DM mengeluarkan biaya yang cukup banyak setiap tahunnya. Semakin banyak obat paten yang harus di konsumsi oleh penderita diabetes, biaya pengobatannya pun semakin besar dan tidak terjangkau bagi masyarakat kecil (Tobing et al., 2008). Terapi modern untuk DM mulai

dari modifikasi diet kemudian berlanjut ke antidiabetik oral dan insulin. Penggunaan terapi seperti sulfonilurea dan biguanid terbatas farmakokinetiknya dan efek samping. Komisi diabetes dunia, merekomendasikan penelitian lebih lanjut pengobatan DM menggunakan metode tradisional. Bahan alam dengan efek hipoglikemia dapat memberikan efek Hiperglikemia juga terlibat dalam proses pembentukan radikal bebas. Radikal bebas dapat menjadi faktor penyebab berbagai macam penyakit misalnya, kanker, jantung koroner, arterosklerosis, dan penuaan dini. Tingginya kadar glukosa di dalam tubuh juga menjadi faktor meningkatnya radikal bebas yang dapat ditunjukkan dengan tingginya kadar Lipid Peroksidase (LPO) dan rendahnya kadar Glutathion (GSH) didalam tubuh. Tingginya kadar glukosa di dalam tubuh serta adanya proses auto oksidasi pada hiperglikemia menjadi faktor meningkatnya radikal bebas.

Daun stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) merupakan tanaman yang akhir akhir ini banyak digunakan. Banyak kalangan menggunakannya sebagai pemanis alami. Rasa manis yang di peroleh daun stevia dari zat terpen glikosida yang di sebut steviol yang terdapat dari daun stevia (Bondarev et al., 2010). Terpen merupakan zat alami yang di hasilkan oleh tumbuhan *Stevia rebaudiana* yang mempunyai beberapa efek seperti antihiperglikemia (Paduch et al., 2007). Pengobatan Diabetes dapat dilakukan dengan menggunakan antioksidan, dalam penelitian yang dilakukan Widowati (2008) senyawa antioksidan sintetik maupun alami (dari berbagai tanaman) mampu mengontrol kadar glukosa dalam darah

dan mencegah timbulnya komplikasi diabetes. Selain itu adanya penelitian terkait efektifitas antidiabetes ekstrak etanol daun stevia pernah dilakukan oleh Siti Fatimah (2010) bahwa ekstrak etanol daun stevia pada dosis 20 mg/ 200 g BB mempunyai efektifitas terhadap penurunan kadar glukosa dalam darah.

Daun sambiloto (*Andrographidis folium*) merupakan salah satu tanaman yang di gunakan sebagai obat tradisional. Bagian daun sambiloto ini mempunyai khasiat bagi pengobatan, khasiat itu meliputi antiradang, anti-inflamasi, dan antipiretik (Hariana, 2006). Adanya penelitian terkait efektifitas antioksidan ekstrak etanol daun sambiloto oleh Saranay *et.al* (2010) dibuktikan bahwa ekstrak etanol daun sambiloto mempunyai nilai IC₅₀ sebesar 6,5 µg/ml yang mana ekstrak etanol daun sambiloto ini mempunyai efek antioksidan yang baik hal ini di perkuat dengan adanya analisis LPO pada tikus yang dilakukan oleh (Pérez *et al.*, 2007) yang mana ekstrak etanol daun sambiloto dapat menurunkan kadar lipid peroxidas. Adanya penelitian terkait dengan efek ekstrak etanol daun sambiloto terhadap penurunan kadar glukosa darah yang pernah di lakukan oleh Rosnaini (2010) menunjukkan yang mana bahwa ekstrak etanol daun sambiloto dosis 29,25 mg/kg BB mempunyai efek terhadap penurunan kadar glukosa darah pada mencit yang di induksi aloksan yang potensinya sama dengan glibenklamid.

Tujuan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi ekstrak etanol daun stevia dan daun sambiloto terhadap parameter stress oksidatif pada tikus diabetes melitus yang diinduksi aloksan.

2. METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Sput oral, labu ukur, mortir, stamfer, mikrometer pipet, tabung reaksi, inkubator, bluetip, yellowtip, alluminium foil, spektrofotometer, ekstrak etanol daun stevia dan ekstrak etanol daun sambiloto, Tikus jantan, Aloksan, Glibenclamide (kontrol positif), dan CMC-Na (kontrol negatif), Analisis parameter stress oksidatif: buffer (pH 7,4), *Sodium dodecyl sulfate*(SDS) 8,1 %, asam asetat 20 %, TBA 0,8

%, aquadest, TCA 10 %, Reagen ellman, Sodium Citrat, Na₂HPO₄,

Cara Kerja

A. Preparasi Sampel

Daun Stevia dan daun Sambiloto di haluskan terlebih dahulu untuk membuat daun menjadi serbuk. Maserasi daun sambiloto dan daun stevia menggunakan etanol 70 % untuk untuk mendapatkan ekstrak etanol.

B. Uji Farmakologi

Metode menggunakan uji efek antidiabetes tipe II yang diinduksi aloksan pada tikus putih jantan galur wistar (100-200 gram) yang berumur 2-3 bulan sebanyak 50 ekor dibagi dalam 8 kelompok. Sebelum perlakuan, semua tikus dipuaskan lebih kurang 12-18 jam kemudian diperlakukan sesuai kelompok masing-masing. Kelompok I (Kontrol normal) hanya diberikan aquadest secara per oral; kelompok II (Kontrol negatif) diberikan CMC-Na 0,5% secara per oral; kelompok III (kontrol Positif) diberikan glibenklamid dosis 1,26 mg/kgBB secara per oral; kelompok IV (ST 100%) diberi ekstrak etanol daun stevia dosis 100 mg/kg BB; kelompok V (SA 100%) diberi ekstrak etanol daun sambiloto dosis 29,25 mg/ kg BB; kelompok VI (STSA 75% : 25%) diberi dosis kombinasi stevia : sambiloto perbandingan 75 mg /kg BB :5,12 mg / kg BB; kelompok VII (STSA 50% : 50%) diberi dosis kombinasi stevia : sambiloto dengan perbandingan 50 mg / Kg BB : 10,24 mg / kg BB; kelompok VIII (STSA 25% : 75%) diberi dosis kombinasi stevia : sambiloto dengan perbandingan 25 mg / kg BB : 15,36 mg/ kg BB. Semua kelompok hewan uji diinduksi dengan aloksan 175mg/kgBB dengan stock 1,4 % (Yunita, 2013) kecuali kelompok 1 (kontrol normal) secara intraperitoneal pada hari ke-0, dilanjutkan perlakuan hewan uji dari hari ke-1 hingga sampai hari ke-14. Pada hari ke-14 tikus dikorbankan dan diambil organ hati untuk dianalisa efek antioksidan.

C. Analisa Parameter Stress Oksidatif LPO (Lipid Peroksidase) &GSH Glutathion)

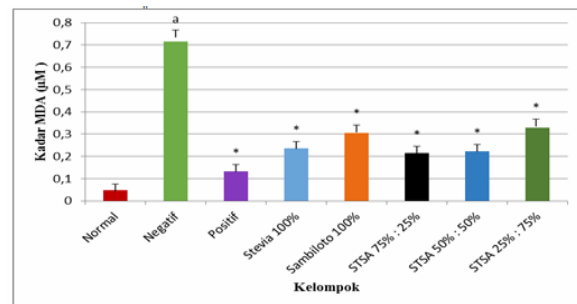
Analisis kadar LPO berdasarkan metode yang dikembangkan oleh Ohkawa *et all.*,

(1979). Jaringan liver dihomogenkan dalam 0,1 M buffer (Ph 7,4). Kadar lipid peroksidase dalam campuran ini ditentukan berdasarkan jumlah terbentuknya malondialdehyde (MDA). Sejumlah 0,2 ml liver yang telah dihomogenkan ditambah 0,2 ml *Sodium dodecyl sulfate (SDS)* 8,1 %, 1,5 ml asam asetat 20% dan 1,5ml TBA 0,8%. Campuran sejumlah 4ml ditambah aquadest, dan dihangatkan suhu 95RC selama 60 menit. Setelah diinkubasi, selanjutnya diamkan dalam suhu kamar. Dengan volume yang sama tambahkan TCA 10% selanjutnya dilakukan sentrifugasi selama 10 menit 3000 rpm. Lapisan atas yang terbentuk diambil dan diukur nilai OD pada panjang gelombang 532 nm terhadap blanko yang tidak diberikan sampel. Jumlah lipid peroksidation (LPO) dinyatakan sejumlah mol thiobarbituric acid reaktive substance (TBARS)/mg protein dengan menggunakan koefisien ekstingsi $1,56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Bose et al., 2007). Pengukuran kadar GSH dalam sampel mengacu metode Ellman dkk., (1959). Untuk mengukur jumlah glutathione(GSH) jaringan hati dihomogenkan dalam 0,1 M phosphate buffer (pH 7,4). Campuran yang telah dihomogenkan ditambah TCA 10 %; dan disentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit. Ambil 500 µl supernatant dan ditambah 2 ml disodium hydrogen phospat 0,3 M, ditambahkan sejumlah 200 µl reagen Ellman's (5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) (0,4 mg/mL dalam sodium citrate 1 %). Larutan diukur pada 412 nm yang dibandingkan dengan blanko (Bose dkk., 2007).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Lipid peroxidation atau lipid hidroperoksida merupakan suatu molekul yang stabil pada suhu fisiologis. Kadar lipid peroxidation diukur dengan metode asam tiobarbiturat (TBA) yang mengukur adanya MDA. TBA akan bereaksi dengan gugus karbonil dari MDA, yaitu satu molekul MDA akan berikatan dengan dua molekul TBA sehingga membentuk senyawa kompleks berwarna merah (Halliwell and Gutteridge, 1999). Terbentuknya warna merah diukur serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm yang sebanding dengan tingkat oksidasi lipid. Pada reaksi ini ada sejumlah senyawa lain yang juga bereaksi dengan TBA, namun karena

jumlahnya kecil maka bisa diabaikan. Senyawa-senyawa itu diantaranya adalah glukosa <0.4 mg (2.2 imol) dan sukrosa <8.56 mg (25.0 imol Ohkawa dkk., 1979).



Keterangan: (a) berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok normal, (*) berbeda signifikan dengan kelompok negatif

Gambar 1 Data Kadar Nilai LPO masing-masing kelompok setelah dilakukan perlakuan

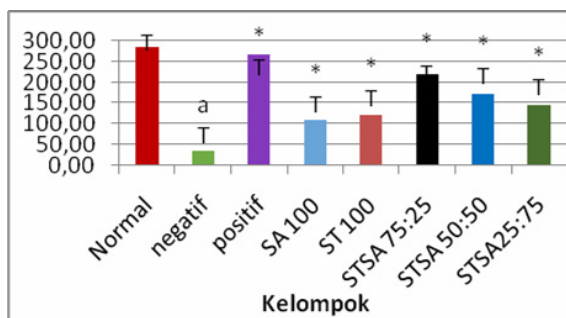
Pada gambar 1 terlihat bahwa pada kontrol negatif atau pada tikus yang hanya diinduksikan aloksan mempunyai grafik kadar MDA yang paling tinggi. Pada penelitian ini kontrol positif mempunyai kadar MDA yang mendekati kontrol normal yang menunjukkan bahwa pada kontrol positif dapat mempengaruhi penurunan kadar MDA pada tikus yang Diabetes melitus yang diinduksi aloksan. Pada sampel terlihat dari grafik maupun tabel bahwa nilai yang mendekati kontrol positif adalah pada kombinasi 1 yang mana pada sampel ini mempunyai nilai MDA yang paling kecil di bandingkan sampel kombinasi dengan perbandingan lain maupun dengan dosis tunggalnya. Dari tabel inilah dapat terlihat bawa kombinasi ekstrak etanol daun stevia dan ekstrak etanol daun sambiloto dapat menurunkan kadar lipid peroksida pada tikus diabetes melitus yang diinduksikan aloksan. Dari perlakuan dosis stevia 100%, sambiloto 100%, STSA 75%: 25%, STSA 50% : 50%, STSA 25% : 75% didapat kadar lipid peroksidase (LPO) terendah pada STSA 75% : 25% (0.215 µM), kemudian meningkat pada STSA 50% : 50% (0.223 µM), kemudian meningkat pada stevia 100 % (0.236 µM), kemudian meningkat pada sambiloto 100% (0.306 µM), dan untuk kadar tertinggi pada STSA 25% : 75% (0.330 µM),. Pada setiap perlakuan dosis pada dasarnya mengalami suatu penurunan

karena kadar LPO pada setiap dosis berada di bawah kadar LPO kelompok negatif.

Untuk memperkuat hasil analisa selain di lihat dari tabel dan grafik kadar MDA maka Kadar MDA (μM) selanjutnya dianalisis normalitas dengan metode *Test of normality*. Pada test ini memperoleh hasil $P < 0,05$ yang artinya terdapat data tidak terdistribusi normal. Kemudian dilanjutkan kepada analisa Nonparametrik menggunakan analisa Man – Whitney. Di mana dari anilisa Man – Whitney didapatkan hasil bahwa antara kontrol negatif dengan kontrol positif mempunyai nilai $< 0,05$ yang mana menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kontrol negatif dengan kontrol positif. Lalu dibandingkan juga antara kontrol negatif dengan kelompok IV – VIII dan didapatkan hasil niali $< 0,05$ yang mana menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara kontrol negatif dengan kelompok IV – VIII.

Pengukuran kadar glutathione menggunakan metode Ellman's (5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid). Prinsip dari pengukuran yaitu reaksi antara 5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acidan GSH menghasilkan senyawa dianion tionitro benzoate yang berwarna kuning (Widowatidkk, 2004),

Pada analisa GSH didaapatkan hasil sebagai berikut :



Gambar 2. Grafik Hasil kadar GSH

Dari gambar 2 dapat dilihat bahwa pada kelompok kontrol negatif mempunyai kadar GSH yang paling kecil dibandingkan dengan kelompok yang lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif mempunyai kemampuan menaikkan kadar GSH paling rendah jika dibandingkan semua kelompok.

Semua perlakuan menunjukkan mampu digunakan sebagai antidiabetes dan antioksidan

terbukti dengan mampu menurunkan kadar glukosa darah, menurunkan kadar LPO dan menaikkan kadar GSH secara signifikan ($p < 0,05$). Bila dilihat dari semua dosis kombinasi yang mempunyai efek sebagai antidiabetes dan antioksidan yang mendekati dengan kelompok positif yaitu pada kelompok STSA 75:25.

Ekstrak etanol daun stevia mempunyai kandungan kimia steviosida dan daun sambiloto mempunyai kandungan kimia andrografolid yang pada penelitian sebelumnya dengan pemberian secara tunggal dapat digunakan sebagai antidiabetes dan antioksidan. Mekanisme kerja dari daun stevia dengan zat yang disebut diterpen glikosida steviosida dan steviol dapat menstimulasi sekresi insulin melalui aksi langsung pada sel beta pankreas dan dapat memperbaiki kerusakan pada sel beta pankreas yang apabila tidak diperbaiki dapat memberikan efek penurunan insulin yang lebih jauh (Subroto, 2006).

4. KESIMPULAN

- Pemberian kombinasi ekstrak etanol daun stevia dan ekstrak etanol daun sambiloto mampu menurunkan kadar LPO (Lipid Peroxidation) dan meningkatkan kadar GSH (Glutathion) pada tikus Diabetes Melitus yang diinduksi Aloksan.
- Dosis optimal kombinasi ekstrak etanol daun stevia dan ekstrak etanol daun sambiloto yang mampu menurunkan kadar LPO pada tikus Diabetes Melitus yang diinduksi adalah dosis 75 mg/ kg BB : 5,12 mg/ kg BB dan dosis untuk manusia sebesar 840 mg : 57, 3 mg

UCAPAN TRIMAKASIH

Pelaksanaan Program Kreatif Mahasiswa yang didanai oleh DIKTI pada Tahun 2016

5. REFERENSI

Aziza, R.Z., 2010, *Gambaran Histomorfologi hati, usus halus, dan limpa pada tikus hiperglikemia yang diberi Ekstrak Sambiloto*, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor

Borhanuddin, M., Shamsuzzoh, M., Hussain, A.H. (1994), Hypoglycaemic effects of *Andrographis paniculata* Nees on non-

- diabetic rabbits, *Bangladesh Medical Research Council Bulletin*, 20 (1), 24-26.
- Chao, P. M., Chao, C. Y., Lin, F. J., Huang, C. J. 2001. Oxidized Frying Oil Upregulates Hepatic Acyl-CoA Oxidase and Cytochrome P450 4 A1 Genes in Rats and Activates PPAR α . *J. Nutr.*, 131:3166-3174.
- Dalimartha, Setiawan, 2000, *Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Diabetes Mellitus*, Penebar Swadaya : Jakarta
- Demple, B. Dan L. Harrison, 1994. *Annual Review Biochemistry*. 63: 915-948.
- Depkes RI, 2005, *Pharmaceutical Care untuk Penyakit Diabetes Melitus*, Departemen Kesehatan RI : Jakarta
- Donne., et al, 2006. *Biomarker of Oxidative Damage in Human Disease*. *Clin Chem*. 1-23
- Pérez ,Y.Y., Jiménez-Ferrer, E. and Zamilpa, A. 2007. Effect of a polyphenol-rich extract from Aloe vera gel on experimentally induced insulin resistance in mice. *American Journal of Clinical Medicine* 35: 1037-1046.
- Retno, T. 2012. Pengaruh Pemberian Isoflavon terhadap Peroksidasi Lipid pada Hati Tikus Normal. *Indonesia Medicus Veterinus* 1 (4) : 483-491. ISSN : 2301-784
- Rosnaeni, dkk, 2010, *Efek Ekstrak Etanol Daun Sambiloto (Andrographidis folium) Terhadap kadar Glukosa Darah Mencit Jantan Swiss Webster yang Diinduksi Aloksan dan Perbandingan Terhadap Jamu D*, Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha, Bandung
- Siti Fatimah, 2012 , *Perbedaan Efek Ekstrak Etanol Daun Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) Dibandingkan Madu Terhadap Perubahan Kadar Glukosa Darah Tikus Wistar Model Diabetes*, Skripsi, Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, Surakarta

-oo0oo-