

Pengaruh Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) terhadap Kadar Glukosa Darah dan Kadar Glutation Peroksidase Tikus Jantan Hiperglikemik

Syahrizal Ramadhan^{1)*}, Retno Sri Iswari¹⁾, Aditya Marianti¹⁾

¹⁾Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang, Kampus Sekaran, Gunung Pati, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia

^{*)}Alamat korespondensi: syahrizal.ramadhan23@gmail.com

ABSTRAK

Diabetes mellitus (DM) merupakan penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia. Pada DM mudah terjadi pembentukan radikal bebas. Antioksidan dari flavonoid diketahui dapat mengatasi penyakit disebabkan radikal bebas, seperti DM. Beberapa penelitian melaporkan ekstrak daun sirih merah memiliki aktivitas antioksidan dan antihiperglikemik. Belum ada data yang menunjukkan potensi tersebut secara *in vivo*. Penelitian ini bertujuan menganalisis pengaruh ekstrak daun sirih merah terhadap kadar glukosa darah dan kadar antioksidan glutathione peroksidase (GPx) tikus jantan hiperglikemik. Pada penelitian ini terdapat lima kelompok perlakuan yang terdiri dari kontrol positif (K+), kontrol negatif (K-), perlakuan ekstrak daun sirih merah dosis 100, 200, dan 400 mg/kgBB. Hewan coba yang digunakan adalah tikus jantan strain *Wistar* berumur 8-12 minggu dengan berat badan minimal 180 gram. Prosedur penelitian meliputi pengkondisian hiperglikemik pada hewan uji dengan induksi aloksan 120 mg/kgBB secara intraperitoneal, ekstraksi daun sirih merah menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, perlakuan dengan pemberian ekstrak daun sirih merah secara oral selama 28 hari, serta pengukuran kadar glukosa darah dan kadar GPx. Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak daun sirih merah berpengaruh signifikan pada penurunan kadar glukosa darah dan kenaikan kadar GPx. Pengaruh yang diberikan daun sirih merah terhadap penurunan kadar glukosa darah sebesar 37,5%, sedangkan pengaruh yang diberikan daun sirih merah terhadap kenaikan kadar GPx sebesar 92,9%. Simpulan dari penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun sirih merah pada tikus jantan hiperglikemik berpengaruh terhadap penurunan kadar glukosa darah dan peningkatan kadar GPx. Dosis 100 mg/kgBB merupakan dosis efektif dalam menurunkan kadar glukosa darah dan menaikkan kadar GPx.

Kata kunci: antioksidan, flavonoid, hiperglikemik, radikal bebas

Effect of Red Betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Leaves Extract on Blood Glucose Levels and Glutathione Peroxidase Levels in Hyperglycemic Male Rats

Syahrizal Ramadhan^{1)*}, Retno Sri Iswari¹⁾, Aditya Marianti¹⁾

¹⁾Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Science, State University of Semarang, Campus of Sekaran, Gunung Pati, Semarang, Central Java, Indonesia

^{*)}Email: syahrizal.ramadhan23@gmail.com

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is metabolic diseases with characteristics of hyperglycemia. In diabetes mellitus is very easy to occur the formation of excess free radicals. Antioxidants from flavonoids was knew to overcome diseases caused by free radicals, such as DM. Some reasearch reported that red betel leaf extract has antioxidant and antihyperglycemic activity. There was no data showing its *in vivo* potency. This study aimed to analyze the effect of red betel leaf extract on blood glucose levels and Glutathione Peroxidase (GPx) levels of hyperglycemic male rats. This study consisted of five treatment groups namely positive control, negative control, treatment of red betel leaf extract dose 100 mg/kgBW, 200 mg/kgBW, and 400 mg/kgBW. The experimental animals used Wistar strain male rats with the age of 8-12 weeks and the body weight of 180 grams minimal. The procedure was the conditioning of hyperglycemic experimental animals with alloxan induction 120 mg/kgBW by intraperitoneal, extraction of red betel used maceration method with 70% ethanol solvent, treatment by giving the red betel leaves extract orally

for 28 days, and measure the level of blood glucose and GPx used spectrophotometric. The result showed that red betel leaves extract that given to the male Wistar Rat exhibited a significant effect on the levels of blood glucose and GPx levels. The effect given by red betel leaves on reduced of blood glucose levels was 3.75%. While the effect given by red betel leaves towards the increase of GPx levels was 92.2%. The conclusion of this study is red betel leaves extract that given to the male Wistar Rat gave a significant effect on reduced of blood glucose levels and increased of GPx levels. The dosage of 100 mg/kgBW was an effective dose in reducing blood glucose levels and increasing GPx levels.

Keywords: antioxidants, flavonoids, free radicals, hyperglycemic

PENDAHULUAN

Diabetes mellitus (DM) merupakan penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin, atau keduanya [1]. Hiperglikemia mempercepat pembentukan radikal bebas dan senyawa oksigen reaktif (ROS) sehingga akan terjadi peningkatan stres oksidatif.

Hiperglikemia kronis menyebabkan kerusakan sel-sel β pankreas penghasil insulin. Kerusakan ini dapat disebabkan oleh faktor genetik, infeksi virus seperti virus *Coxsackie*, reaksi autoimun berupa serangan antibodi terhadap sel-sel β , zat diabetogenik seperti aloksan dan streptozotocin, serta dapat disebabkan pembentukan radikal bebas melalui mekanisme oksidasi-reduksi dengan tambahan donor elektron (NADH dan FADH_2) ke dalam rantai transpor elektron di mitokondria [2]. Radikal bebas seperti superoksida, hidrogen peroksida, dan nitrit oksida dapat merusak sel-sel β pankreas dan membuat sel-sel β menjadi degranulasi [3].

Tubuh dalam keadaan normal terlindungi dari serangan radikal bebas oleh antioksidan dalam tubuh seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT/ H_2O_2 oksidoreduktase), dan glutathion peroksidase (GPx) [4] [5]. Glutathion peroksidase (GPx) merupakan antioksidan enzimatik dalam tubuh yang mampu mencegah pembentukan radikal bebas baru. Selain itu GPx dapat mengubah radikal bebas dengan karakteristik molekul yang sangat reaktif menjadi molekul yang kurang reaktif [6]. GPx dengan gugus SH dapat mendetoksifikasi hidrogen peroksida dan lipid hidroperoksida dengan mereduksi glutathion [7]. Menurut penelitian Pasaouglu [8] kadar antioksidan GPx turun dalam kondisi diabetes dan lebih rendah dari kontrol tanpa diabetes. Sel β pankreas yang terganggu fungsinya karena stres oksidatif akan mengalami penurunan kadar enzim antioksidan, salah satunya adalah GPx [9].

Antioksidan berperan penting untuk menangkal dan menetralkan adanya radikal bebas di dalam sel [10]. Apabila antioksidan dalam tubuh tidak mencukupi, tubuh membutuhkan antioksidan dari luar [11]. Aktivitas sebagai antioksidan dimiliki sebagian besar flavonoid dari tumbuhan [12]. Antioksidan dari flavonoid secara empiris diketahui dapat mengatasi penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas, seperti DM [13]. Beberapa penelitian melaporkan bahwa ekstrak daun sirih merah memiliki kandungan senyawa flavonoid sebagai antioksidan.

Daniel [14] telah berhasil mengisolasi senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol daun sirih merah. Penelitian Parildar [15] membuktikan bahwa daun sirih merah mengandung sejumlah senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan, seperti flavonoid, polifenol, golongan alkaloid, terpenoid, dan vitamin E. Aktivitas antioksidan ini merupakan faktor berkhasiat penting, sehingga dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan diabetes mellitus. Belum banyak data yang menunjukkan daun sirih merah dapat menurunkan kadar glukosa darah sekaligus dapat meningkatkan antioksidan dalam tubuh penderita diabetes atau kondisi hiperglikemik.

Berdasarkan uraian di atas diperoleh permasalahan, apakah kadar glukosa darah dan kadar GPx tikus hiperglikemik dapat dipengaruhi oleh pemberian daun sirih merah. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh ekstrak daun sirih merah terhadap kadar glukosa darah dan kadar glutathion peroksidase (GPx) tikus jantan hiperglikemik. Penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi ilmiah mengenai efek pemberian ekstrak daun sirih merah untuk memperbaiki kadar antioksidan endogen tikus jantan hiperglikemik dilihat dari aktivitas glutathion peroksidase (GPx) dan kadar glukosa darah. Berdasarkan informasi ini diharapkan dapat menjadi acuan bagi penelitian selanjutnya untuk pengembangan

potensi daun sirih merah sebagai obat alternatif bagi penderita diabetes mellitus.

METODE PENELITIAN

Hewan Coba. Penelitian ini menggunakan 25 tikus strain *Wistar* jantan sehat berumur 8-10 minggu dengan berat badan minimal 180 gram. Tikus dalam penelitian ini didapatkan dari laboratorium hewan coba Jurusan Biologi Universitas Negeri Semarang. Perlakuan terhadap hewan uji ini sesuai dengan surat lulus etik yang dikeluarkan oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Universitas Negeri Semarang. Penelitian dibagi menjadi lima kelompok yaitu kelompok kontrol positif (K+), kelompok kontrol negatif (K-), dan tiga kelompok perlakuan. Setiap kelompok terdiri dari lima tikus jantan *Wistar* dan ditandai dengan pewarna pikrat. Tujuan pewarnaan pikrat adalah memudahkan peneliti untuk identifikasi hewan coba pada tiap kelompok yang terdiri lebih dari satu individu. Kelompok K+ adalah kelompok yang diberi obat glibenklamid 0,09 mg/200 gBB. Kelompok K- tidak diberi ekstrak daun sirih merah, hanya diberi minum *ad libitum*. Kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 diberi ekstrak daun sirih merah dengan dosis masing-masing 100, 200, dan 400 mg/kgBB. Tikus ditempatkan di kandang dengan ukuran 35x 45x15 cm³ yang berisi sekam padi dan dilengkapi pakan standar. Kandang tikus dibersihkan dan diganti dengan sekam baru tiap 3 hari sekali. Tikus diaklimatisasi selama 7 hari sebelum perlakuan. Aklimatisasi bertujuan agar tikus beradaptasi dengan lingkungan baru dan meminimalisasi efek stres pada tikus yang dapat berpengaruh pada proses penelitian.

Ekstraksi Daun Sirih Merah. Preparasi daun sirih merah dilakukan dengan menyiapkan dan mencuci bersih dengan air mengalir. Daun sirih merah diiris tipis dan dikering anginkan. Pengeringan daun sirih merah diletakkan di atas wadah tampah bambu dan diletakkan di tempat terbuka dengan sirkulasi udara baik dan tidak terkena sinar matahari secara langsung. Daun sirih merah yang telah kering dihaluskan menggunakan blender sampai berbentuk serbuk. Serbuk halus ditimbang sebanyak 100 gram dan dimasukkan ke dalam botol kaca, kemudian ditambahkan dengan pelarut etanol 70% sebanyak 1000 mL (perbandingan serbuk dan pelarut adalah 1:10).

Botol kaca yang berisi serbuk daun sirih merah dan pelarut etanol ditutup dan dibiarkan selama tiga hari sambil diaduk setiap sehari sekali, kemudian dilakukan penyaringan dengan kertas saring untuk mendapatkan cairan dari hasil perendaman. Hasil penyaringan diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental daun sirih merah. Ekstrak kental kemudian diuapkan dengan oven untuk memperoleh ekstrak dalam bentuk serbuk (kering).

Pengkondisian Hiperglikemik. Tikus dipuasakan (10-12 jam) terlebih dahulu namun tetap diberikan air minum *ad libitum*, selanjutnya tikus diinjeksi dengan aloksan monohidrat yang dilarutkan dalam larutan NaCl fisiologis steril dengan dosis 120 mg/kgBB secara intra peritoneal satu kali [16]. Setelah diinjeksi aloksan, kemudian satu hari berikutnya dilanjutkan dengan uji toleransi glukosa oral. Pemberian toleransi glukosa secara oral bertujuan agar tidak terjadi hipoglikemik secara drastis yang dapat menyebabkan kematian pada hewan uji. Pemberian toleransi glukosa dilakukan selama tiga hari berturut-turut dengan volume pemberian 1,35 gram dalam 2 mL larutan. Parameter keberhasilan penginduksian yaitu naiknya kadar glukosa darah puasa yang melebihi 125 mg/dL [1].

Pengambilan Darah. Tikus penelitian dipuasakan selama (10-12 jam) namun tetap diberi minum *ad libitum*, kemudian dilakukan pengambilan darah untuk pemeriksaan kadar glukosa darah puasa. Pengambilan darah dilakukan melalui *sinus retro-orbitalis*. Tikus dikondisikan senyaman mungkin dengan dipegang dan dijepit di bagian tengkuk. *Canthus medialis* (di bawah bola mata) digores menggunakan tabung mikrohematokrit sampai mengenai *vena retro orbitalis*. Sampel darah yang keluar ditampung dalam *microtube* sebanyak 2 mL (10% total volume darah). Pemberhentian darah dilakukan dengan menutup mata dengan kertas *tissue* bersih sampai luka goresan menutup dan darah tidak terus-menerus keluar.

Pemberian Perlakuan. Ekstrak daun sirih merah dilarutkan dengan akuades terlebih dahulu, kemudian diberikan ke kelompok P1, P2, dan P3 sesuai dengan dosis yang telah ditentukan. Kelompok K+ adalah kelompok

yang diberi obat glibenklamid dosis 0,09 mg/200gBB dengan pelarut akuades. Kelompok K- tidak diberi ekstrak daun sirih merah, hanya diberi minum *ad libitum*. Perlakuan ekstrak daun sirih merah maupun glibenklamid pada masing-masing perlakuan diberikan pada pagi hari secara oral selama 28 hari menggunakan sonde lambung. Pemberian perlakuan dilakukan di laboratorium hewan coba Biologi Universitas Negeri Semarang.

Metode Pengambilan Data. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan sebanyak tiga kali pada tiap kelompok perlakuan. Pengukuran pertama bertujuan untuk mengetahui kadar glukosa awal sebelum perlakuan Kadar Glukosa Darah 0 (KGD 0). Pengukuran kedua dilakukan setelah tujuh hari induksi aloksan (KGD 1) dan toleransi glukosa oral untuk mengetahui kondisi hiperglikemik pada tiap hewan uji (KGD 2). Pengukuran ke tiga dilakukan pada hari ke 29 untuk mengetahui hasil akhir kadar glukosa darah setelah perlakuan oral ekstrak daun sirih merah. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan di laboratorium Biokimia Jurusan Biologi Universitas Negeri Semarang. Pengukuran kadar glukosa darah menggunakan metode *Glucose Oxidase-Phenol 4-Aminoantipirin* (GOD-PAP) pada spektrofotometer dengan satuan (mg/dL). Proses pengukuran kadar glukosa dengan mengambil sampel darah dari hematokrit kapiler melalui *sinus retro-orbital* tikus dan disimpan dalam 1,5 mL *microtube*. Sampel darah disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Serum darah diambil sebanyak 10 µL dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian dicampur dengan pereaksi GOD-PAP sebanyak 1000 µL lalu diinkubasi selama 10 menit. Larutan standar yang digunakan sebanyak 10 µL dimasukkan ke dalam kuvet lain. Sedangkan larutan blanko yang digunakan adalah akuades sebanyak 1000 µL. Selanjutnya, pengukuran absorbansi sampel uji dan absorbansi standar dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 546 nm. Prinsip metode GOD-PAP ini adalah kadar glukosa ditentukan setelah terjadi oksidasi enzimatis dengan adanya glukosa oksidase, hidrogen peroksida yang terbentuk akan bereaksi dengan peroksidase, phenol serta 4-aminophenazone membentuk warna quinoneimine (merah violet). Hasil nilai kadar glukosa darah yang

ditetapkan adalah satuan (mg/dL). Pengukuran kadar GPx dilakukan pada hari ke-29 setelah pemberian ekstrak daun sirih merah selama 28 hari. Pengukuran ini dilakukan di Laboratorium PAU (Pusat Antar Universitas) Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Proses pengukuran kadar antioksidan *glutathione peroxidase* (GPx) dengan mengambil 100 µL serum darah dan ditambahkan 200 µL NaCl fisiologis. Kemudian diambil 0,1 mL larutan campuran tersebut dan ditambahkan 0,4 mL triton-X 0,5%, dan campuran ini disebut hemolizat. Sebanyak 100 µL hemolizat dimasukkan ke dalam kuvet dan ditambahkan 100 µL larutan Drabkin lalu dihomogenkan, kemudian ditambahkan 2,6 mL buffer fosfat dan dihomogenkan kembali. Selanjutnya ditambahkan 0,1 mL NADPH; 0,01 mL GSSG-R; 0,01 mL NaN₃; 0,1 mL GSH; 1 mL H₂O₂ dan dikocok perlahan. Larutan blanko yang digunakan adalah 100 µL akuades. Campuran pereaksi kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm. Hasil nilai kadar GPx yang ditetapkan adalah satuan (U/mg).

Analisis Data. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan perhitungan statistik *one way ANOVA (Analysis of Variance)*. Kemudian dilanjutkan *post-hoc Tukey HSD* pada taraf uji 5%. Sedangkan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh yang diberikan ekstrak daun sirih merah, maka digunakan perhitungan analisis statistik regresi linier. Analisis statistik dibantu dengan *software program SPSS versi 23.0*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengkondisian tikus hiperglikemik pada masing-masing kelompok didapatkan data hasil pengamatan dengan melihat kadar glukosa darahnya. Kadar glukosa darah yang didapat sesuai dengan kriteria hiperglikemik tikus eksperimental dengan karakteristik mirip diabetes mellitus tipe 1 pada manusia. Data kadar glukosa darah disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Rerata kadar glukosa darah puasa selama penelitian.

Kelompok	Rerata Kadar Glukosa Darah (mg/dL)					
	KGD 0	X	KGD 1	X	KGD 2	X
	± SD		± SD		± SD	
K+	73,74±16,5		147,37±33		52,50±5,7	
K-	120,97±4,8		178,66±22,1		108,79±27,8	
P1	91,03±10,8		132,57±9,1		62,69±11,2	
P2	106,19±25,4		141,49±10,9		56,49±8,8	
P3	70,06±12,9		162,67±7,2		56,46±12,1	

Keterangan: X (nilai rata-rata); SD (standar deviasi); K+ (kelompok kontrol positif); K- (kelompok kontrol negatif); P1 (kelompok perlakuan 1); P2 (kelompok perlakuan 2); P3 (kelompok perlakuan 3); KGD 0 (kadar glukosa darah puasa sebelum induksi aloksan); KGD 1 (kadar glukosa darah puasa setelah induksi aloksan 120 mg/kgBB); KGD 2 (kadar glukosa darah puasa setelah perlakuan ekstrak daun sirih merah);

Pemberian ekstrak daun sirih merah selama 28 hari terhadap kadar glukosa darah dan kadar GPx tikus jantan hiperglikemik, didapatkan data rerata kadar glukosa darah dan kadar GPx seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Kadar glukosa darah puasa (mg/dL) dan kadar GPx (U/mg) setelah perlakuan.

Kelompok	Rerata	
	KGD 2 (mg/dL)	GPx (U/mg)
	X ± SD	X ± SD
K+	52,50 ± 5,78 ^a	40,59 ± 2,08 ^a
K-	108,79 ± 27,88 ^b	23,15 ± 2,61 ^b
P1	62,69 ± 11,23 ^a	58,03 ± 2,85 ^c
P2	56,49 ± 8,82 ^a	71,61 ± 1,48 ^d
P3	56,46 ± 12,07 ^a	83,50 ± 2,40 ^c

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan signifikan dengan taraf ketelitian p<0,05.

Berdasarkan uji normalitas diketahui bahwa data kadar glukosa darah dan GPx berdistribusi normal dan memiliki varians sama atau homogen. Hasil analisis *One Way* ANOVA menunjukkan ekstrak daun sirih merah berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan kadar glukosa darah dan kenaikan kadar GPx tikus jantan hiperglikemik (p<0,05). Oleh karena itu dilanjutkan uji lanjut Tukey HSD.

Hasil uji Tukey HSD (notasi huruf pada kolom Tabel 2) menunjukkan bahwa kadar glukosa darah pada kelompok K+ berbeda nyata dengan kelompok K- dan tidak berbeda nyata dengan kelompok P1, P2 dan P3. Sedangkan kadar GPx kelompok K+ berbeda

nyata dengan kelompok lainnya (K-, P1, P2, P3). Pada kelompok kontrol negatif memiliki kadar glukosa darah tertinggi dan kadar GPx terendah. Kelompok kontrol negatif digunakan sebagai kontrol hiperglikemik yang tidak diberikan perlakuan ekstrak daun sirih merah.

Pada penelitian ini untuk mengetahui besarnya pengaruh yang diberikan ekstrak daun sirih merah dalam menurunkan kadar glukosa darah dan menaikkan kadar GPx, maka dilakukan uji statistik regresi linier. Adapun ringkasan hasil analisis regresi linier dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil analisis regresi linier kadar glukosa darah dan kadar GPx tikus jantan hiperglikemik.

Perlakuan	Signifikansi (p < 0,05)	R ² (%)	Persamaan Y
KGD 2	0,04	37,5	Y=90,36+(-0,110)x
GPx	0,00	92,9	Y=27,41+0,120x

Hasil analisis statistik regresi linier dari data kadar glukosa darah diperoleh p<0,05. Nilai R² (koefisien determinasi) menunjukkan pengaruh yang diberikan ekstrak daun sirih merah terhadap kadar glukosa darah tikus jantan hanya sebesar 37,5%, dan persamaan regresinya adalah Y = 90,36+(-0,110)x. Koefisien bernilai negatif (-0,110) artinya semakin besar dosis ekstrak daun sirih merah, maka kadar glukosa semakin turun. Sedangkan analisis statistik pengaruh regresi linier data kadar GPx, diketahui bahwa dosis ekstrak daun sirih merah memberikan hubungan pengaruh yang signifikan terhadap kadar GPx darah tikus jantan (p < 0,05). Nilai R² menunjukkan pengaruh yang diberikan ekstrak daun sirih merah terhadap kadar GPx sebesar 92,9%, dan persamaan regresinya adalah Y =27,41+0,120x. Koefisien bernilai positif artinya semakin besar dosis ekstrak daun sirih merah, maka kadar GPx semakin naik.

Pemberian ekstrak daun sirih merah secara oral selama 28 hari memberikan pengaruh signifikan terhadap penurunan kadar glukosa darah tikus jantan hiperglikemik.

Hasil penelitian memperlihatkan pemberian ekstrak daun sirih merah dosis 100, 200, 400 mg/kgBB/hari pada tikus jantan hiperglikemik dapat menurunkan kadar glukosa darah. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Andhi [17] yang menyatakan ekstrak etanol daun sirih merah dosis 50, 100,

dan 200 mg/kgBB dapat menurunkan kadar glukosa darah pada tikus Wistar model diabetes mellitus. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih merah mempunyai potensi sebagai obat antidiabetes. Penelitian lainnya yang dilakukan Dewi [18] dengan menggunakan ekstrak etanol 70% daun sirih merah pada dosis 50 mg/kgBB dan dosis 100 mg/kgBB, mampu menurunkan kadar glukosa darah tikus putih jantan sebanding dengan pemberian glibenklamid 0,02% (dosis 1 mL/kg BB). Menurut Wibawa [19] pemberian ekstrak etanol buah naga daging putih (*Hylocereus undatus*) yang mengandung flavonoid memiliki efek sebanding dengan glibenklamid sebagai penurun kadar glukosa darah.

Penurunan kadar glukosa darah dikarenakan pemberian ekstrak daun sirih merah dapat dijelaskan melalui dua mekanisme utama sebagai akibat kandungan antioksidan di dalamnya, yaitu secara intrapankreatik dan ekstrapankreatik. Mekanisme intrapankreatik bekerja dengan cara memperbaiki atau meregenerasi sel β pankreas yang rusak, melindungi sel β dari kerusakan, serta merangsang pelepasan insulin [20]. Peningkatan sekresi hormon insulin disebabkan oleh efek perangsangan flavonoid terhadap saraf simpatis (simptomimetik). Kappel [18] menegaskan bahwa flavonoid menghasilkan peningkatan konsentrasi ion Ca^{2+} intraseluler dan menghambat kanal KATP (ATP- sensitive potassium channel) di pulau Langerhans pankreas. Di samping itu, mekanisme ekstrapankreatik dengan melalui berbagai mekanisme, seperti flavonoid dapat menurunkan kadar glukosa darah dengan cara menghambat absorpsi glukosa dalam usus, meningkatkan transportasi glukosa di dalam darah, merangsang sintesis glikogen, dan menghambat sintesis glukosa dengan menghambat enzim glukosa 6-fosfatase, dan fruktosa 1,6-bisfosfatase.

Pemberian ekstrak daun sirih merah pada kelompok P1, P2, dan P3 menunjukkan pengaruh signifikan terhadap kenaikan kadar GPx, dan nilai kadar GPx ketiga kelompok perlakuan berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini dikarenakan ekstrak daun sirih merah mengandung senyawa seperti flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin, sehingga diasumsikan zat tersebut berfungsi sebagai antioksidan yang berperan dalam

menurunkan stres oksidatif pada tikus hiperglikemik pasca induksi aloksan [15].

Kelompok kontrol negatif (K-) penelitian ini digunakan sebagai kontrol hiperglikemik yang hanya diberikan aloksan 120 mg/kgBB dan tidak diberikan perlakuan ekstrak daun sirih merah. Induksi aloksan digunakan untuk membuat tikus hiperglikemik. Berdasarkan hasil penelitian [16] induksi aloksan dosis 120 mg/kgBB menghasilkan hewan coba model hiperglikemik autoimun yang mirip dengan DM tipe-1 pada manusia.

Kriteria hiperglikemik yaitu kenaikan kadar glukosa darah puasa >125 mg/dL [1]. Pada penelitian ini keberhasilan penginduksian aloksan dapat dilihat pada (Tabel 1). Aloksan dapat menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas dalam tubuh. Aloksan bersifat sitotoksik spesifik pada sel β pankreas dan dapat memicu gugus radikal yang merusak sel β Langerhans akibat peningkatan radikal bebas dalam tubuh. Selain kondisi tersebut, induksi aloksan pada hewan coba menyebabkan stres oksidatif [22].

Stres oksidatif adalah kondisi ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas yang ada dengan jumlah antioksidan di dalam tubuh [11]. Menurut Gumieniczek [23], stres oksidatif dapat menurunkan status antioksidan pada penderita diabetes akibat peningkatan produksi radikal bebas. Tabel 2 memperlihatkan pada kelompok (K-) nilai kadar GPx lebih rendah dibandingkan kelompok lainnya dimana kelompok K- tikus hiperglikemik tidak diberi perlakuan apapun, sedangkan kelompok perlakuan ekstrak daun sirih merah memiliki kadar GPx lebih tinggi dibandingkan kelompok K-. Hal ini terjadi peningkatan kadar GPx tikus hiperglikemik pasca pemberian ekstrak daun sirih merah.

Menurut Parildar [15] ekstrak daun sirih merah mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin, yang berfungsi sebagai antioksidan yang berperan dalam menurunkan stres oksidatif. Peningkatan kadar GPx pada penelitian ini dapat dijelaskan melalui mekanisme kerja senyawa yang terkandung dalam daun sirih merah. Senyawa antioksidan ekstrak daun sirih merah mampu menetralkan radikal bebas berlebih di dalam sel β pankreas dengan cara menyumbangkan elektronnya atau memutus reaksi berantai dan menyebabkan radikal bebas menjadi stabil [24]. Kandungan zat antioksidan daun sirih merah dapat meredam radikal bebas

berlebih melalui pemberian atom hidrogen secara langsung dan akan meningkatkan aktivitas antioksidan endogen, seperti GPx [25]. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan Kalaivani [26], memberikan ekstrak daun Cassia (*Cassia auriculata*) yang mengandung senyawa aktif flavonoid pada tikus diabetes dapat meningkatkan aktivitas GPx. Demikian pula yang dilakukan Bhattacharjee [27], hasil penelitiannya membuktikan di dalam biji kapulaga terdapat senyawa flavonoid yang dapat menetralkan lipid peroksida dan hidrogen peroksida seperti peran antioksidan GPx dalam tubuh.

Kelompok K⁺ pada penelitian ini digunakan obat antihiperglikemik oral sebagai pembanding. Obat antihiperglikemik yang digunakan yaitu glibenklamid. Glibenklamid merupakan senyawa obat golongan sulfonilurea yang digunakan sebagai antidiabetik oral dan merupakan pilihan pengobatan untuk diabetes melitus pada pasien dengan hiperglikemia [28]. Keadaan hiperglikemik yang terjadi pada tikus jantan setelah diinduksi aloksan adalah kerusakan sel β pankreas, sehingga produksi dan sekresi insulin akan terhambat. Pemilihan glibenklamid sebagai obat antihiperglikemik pembanding dianggap tepat, karena mekanisme kerja glibenklamid dalam tubuh yaitu dengan cara menstimulasi produksi insulin dari sel β pankreas dan meningkatkan sekresi insulin dari sel β pankreas [29].

Pengukuran aktivitas antioksidan suatu senyawa dalam kemampuannya meredam radikal bebas dapat melalui penentuan IC₅₀ dan uji DPPH (2,2-*-diphenyl-1-picrylhydrazyl*). IC₅₀ merupakan konsentrasi substrat atau sampel yang akan menyebabkan reduksi terhadap aktivitas DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀ berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Ekstrak etanol sirih merah memiliki potensi antioksidan 30,20% (IC₅₀) [30]. Penelitian Tonahi [31] melalui pengujian antioksidan ekstrak daun sirih merah memiliki nilai IC₅₀ sebesar 47,45 ppm, dan termasuk ke dalam golongan antioksidan yang kuat.

Senyawa antioksidan ekstrak daun sirih merah mampu menetralkan radikal bebas berlebih di dalam sel β pankreas, dengan cara menyumbangkan elektronnya atau memutus reaksi berantai dan menyebabkan radikal bebas menjadi stabil [24], sehingga dapat menghentikan atau menghambat

kerusakan oksidatif pada sel β pankreas karena pemberian aloksan. Penelitian Erviana [32] mengungkapkan bahwa kapasitas antioksidan dari sirih merah paling tinggi adalah senyawa flavonoid yang berhasil diekstraksi dengan pelarut etanol.

Senyawa fenolik pada tanaman berperan terhadap penangkapan radikal bebas dengan kapasitasnya sebagai antioksidan. Antioksidan pada flavonoid dapat menyumbangkan atom hidrogennya yang akan teroksidasi dan berikatan dengan radikal bebas sehingga radikal bebas menjadi senyawa lebih stabil. Mekanisme lain adalah kemampuan flavonoid terutama *quercetin* dalam menghambat GLUT 2 mukosa usus sehingga dapat menurunkan absorpsi glukosa. Hal ini menyebabkan pengurangan penyerapan glukosa dan fruktosa dari usus sehingga kadar glukosa darah turun. GLUT 2 diduga merupakan *transporter mayor* glukosa di usus pada kondisi normal [25].

Penelitian yang dilakukan Song [25] didapatkan bahwa flavonoid dapat menghambat penyerapan glukosa. Ketika *quercetin* yang tertelan dengan glukosa, hiperglikemia secara signifikan menurun. Hal ini menunjukkan bahwa *quercetin* dapat menghambat penyerapan glukosa melalui GLUT-2 [25]. Flavonoid juga dapat menghambat fosfodiesterase sehingga meningkatkan cAMP pada sel β pankreas [33]. Peningkatan cAMP akan menstimulasi pengeluaran protein kinase A (PKA) yang dapat merangsang sekresi insulin semakin meningkat [34]. Untuk keamanan penggunaan sirih merah, penelitian Kendran [35] membuktikan bahwa pemberian ekstrak etanol 70% sirih merah tidak memengaruhi aktivitas *aspartate transaminase* (AST) dan *alanine transaminase* (ALT) atau disebut sebagai SGOT dan SGPT pada tikus diabetes dan ekstrak tersebut bersifat tidak toksik, sehingga penggunaannya dapat lebih dipertanggungjawabkan.

Pada penelitian ini, didapatkan dosis ekstrak sirih merah efektif dalam menurunkan kadar glukosa darah yaitu dosis 1 pada kelompok P1 (100 mg/kgBB), karena tidak terdapat perbedaan bermakna antara efek yang ditimbulkan oleh kelompok P1 dengan kelompok P2, serta kelompok P1 dengan kelompok P3. Kemungkinan sudah terjadi kejenuhan pada reseptor α -glukosidase sehingga peningkatan dosis tidak

menghasilkan efek yang lebih baik [36-37]. Kadar GPx masing-masing dosis memiliki rata-rata yang berbeda signifikan dengan dosis lainnya, artinya masing-masing dosis dapat memberikan efek menaikkan kadar GPx dan rerata masing-masing dosis berbeda signifikan satu sama lain. Dosis efektif ditentukan berdasarkan tingkatan dosis (seri dosis). Penentuan dosis efektif diupayakan penggunaan dosis rendah yang sudah atau dapat memberikan efek yang bermakna. Hasil yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah dosis efektif ekstrak daun sirih merah dalam menurunkan kadar glukosa darah dan menaikkan kadar GPx adalah 100 mg/kgBB.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak daun sirih merah pada tikus jantan hiperglikemik berpengaruh signifikan terhadap penurunan kadar glukosa darah dan kenaikan kadar glutathione peroksidase (GPx), sedangkan dosis 100 mg/kgBB merupakan dosis efektif dalam menurunkan kadar glukosa darah dan menaikkan kadar GPx.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] American Diabetes Association (ADA) (2014) Diagnoses and classification of diabetes mellitus, *Diabetes Care* 37(1): 81–90.
- [2] Brownlee, M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813–820.
- [3] Muhtadi, Primarianti AU, Sujono TA (2015) Antidiabetic activity of durian (*Durio zibethinus* Murr.) and rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) fruit peels in alloxan diabetic rats. *Procedia Food Science* 3: 255–261.
- [4] Nair SP, Shah NC, Shah RM (2012) Alteration in enzymatic antioxidant defense in diabetes mellitus. *Biomedical Research* 23(3): 402–404.
- [5] Kabel AM (2014) Free radicals and antioxidants: role of enzymes and nutrition. *World Journal of Nutrition and Health* 2(3): 35–38.
- [6] Chevion S, Danny SM, Yuval H, Yoav S, Gilad R, Benny A, Eduard B, Earl RS, Yoram E (2003) Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *PNAS* 100(9): 5119–5123.
- [7] Ozden M, Maral H, Akydin D, Cetnalp P, Kalender B (2002) Erythrocyte glutathione peroxidase activity, plasma malondialdehyde and erythrocyte glutathione levels in hemodialysis and CAPD patients. *Clinical Biochemistry* 35: 269–273.
- [8] Paşaoğlu H, Banu S, Neslihan B (2004) Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Tohoku Journal Experimental Medicine* 203: 211–218.
- [9] Poitout V, Robertson RP (2008) Glucotoxicity: fuel excess and beta cell dysfunction. *Endocrine Reviews* 29(3): 351–366.
- [10] Pradhan D, Suri K, Pradhan DK, Biswasroy P (2013) Golden heart of the nature: *Piper betle*. *Journal of Pharmacogn Phytochem* 1: 147–167.
- [11] Werdhasari A (2014) Peran antioksidan bagi kesehatan. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia* 3(2): 59–68.
- [12] Rohyami Y (2008) Penentuan kandungan flavonoid dari ekstrak metanol daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* Scheff Boerl). *Jurnal Logika* 5(1): 1–8.
- [13] Rosalina TRT, Mohamed S, Samaneh GF, Noordin MM, Goh YM, Manap MYA (2011) Polyphenol rich oil palm leaves extract reduce hyperglycaemia and lipid oxidation in STZ-rats. *International Food Research Journal* 18: 179–188.
- [14] Daniel (2010) Isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat dari daun tumbuhan sirih merah (*Piper Crocatum* Ruiz & Pav). *Mulawarman Scientiae* 9(1): 17–26.
- [15] Parildar H, Serter R, Yesilada E (2011) Diabetes mellitus and phytotherapy in Turkey. *Journal of Pakistan Medical Association* 61(11): 1116–1120.
- [16] Jain S, Bhatia G, Barik R, Kumar P, Jain A, Dixit VD (2010) Antidiabetic activity of *Paspalum scrobiculatum* Linn. in alloxan induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 127: 325–328.
- [17] Andhi JS (2016) Antidiabetic and antioxidant activities of 70% ethanol-diluted extract of *Piper crocatum* leaves

- in streptozotocin induced diabetic rats. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* 29(1): 1-4.
- [18] Dewi YF, Anthara MS, Dharmayudha, AAGO (2014) Efektifitas ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap penurunan kadar glukosa darah tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) yang di induksi aloksan. *Veteriner Udayana* 6(1): 73-79.
- [19] Wibawa PAS, Antara MS, Dharmayuda O (2013) Identifikasi senyawa kimia ekstrak buah naga putih dan pengaruhnya terhadap glukosa darah tikus diabetes. *Indonesia Medicus Veterinus* 2(2): 151-61.
- [20] McWhorter LS (2011) Biological complementary therapies: a focus on botanical products in diabetes. *Journal Diabetes Spectrum* 14(4): 199-208.
- [21] Kappel VD, Frederico MJ, Postal BG, Mendes CP, Cazarolli LH, Silva FR (2013) The role of calcium in intracellular pathways of rutin in rat pancreatic islets: Potential insulin secretagogue effect. *European Journal Pharmacology* 702: 264-268.
- [22] Szkudelski T (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in cells of the rat pancreas. *Physiological Research* 50(6): 537-546.
- [23] Gumieniczek A, Hanna H, Zbigniew W, Justyna N (2002) Changes in antioxidant status of heart muscle tissue in experimental diabetes in rabbits. *Acta Biochimica Polonica* 49(2): 529-535.
- [24] Suarsana N, Priosoeryanto B, Wresdiati T, Bintang M (2006) Sintesis glikogen hati dan otot pada tikus diabetes yang diberi ekstrak tempe. *Jurnal Veteriner* 11(3): 190-195.
- [25] Song J, Kwon O, Chen S, Daruwala R, Eck P, Park JB, Levine M (2002) Flavonoid inhibition of SVCT1 and GLUT2, intestinal transporters for vitamin C and glucose. *Journal of Biological Chemistry* 277(18): 15252-15260.
- [26] Kalaivani A, Umamaheswari A, Vinayagam A, Kalaivani K (2008) Anti-hyperglycemic and antioxidant properties of *Cassia auriculata* leaves and flowers on alloxan induced diabetic rats. *Pharmacologyonline* 1: 204-217.
- [27] Bhattacharjee S, Rana T, Sengupta A (2007) Inhibition of lipid peroxidation and enhancement of GST activity by cardamom and cinnamon during chemically induced colon carcinogenesis in Swiss albino mice. *Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention* 8: 578-582.
- [28] Nathan D, Buse J, Davidson M, Ferrannini E, Holman R, Sherwin R (2009) Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy a consensus statement of the american diabetes association and the european association for the study of diabetes. *Diabetes Care* 32: 193-203.
- [29] Rajasekaran S, Sivagnanam K, Subramanian S (2005) Antioxidant Effect of *Aloe vera* gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmacology* 57: 90-96.
- [30] Maslikah S, Lestari SR, Wulandari L, (2016) Active compounds of red betel (*Piper crocatum*) extract for safe antioxidant as cytotoxicity test revealed. *Journal of ChemTech Research* 9(4): 513-520.
- [31] Tonahi JMM, Nuryanti S, Suherman (2014) Antioxidant of red betel (*Piper crocatum*) leaves. *Jurnal Akademika Kimia* 3(3): 158-164.
- [32] Erviana R, Purwono S (2011) Active compounds isolated from red betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) leaves active against *Streptococcus mutans* through its inhibition effect on glucosyltransferase activity. *Journal of Medical Sciences* 43: 71-78.
- [33] Puspati NKS, Anthara MS, Dharmayudha AAGO (2013) Pertambahan bobot badan tikus diabetes melitus dengan pemberian ekstrak etanol buah naga daging putih. *Indonesia Medicus Veterinus* 2(2): 225-234.
- [34] Harapan, Jamil KF, Hayati Z, Muhammad I (2010) Peran puasa dalam remodelling sel enteroendokrin untuk mencegah diabetes melitus tipe 2 *JIMKI* 1(1): 36-40.
- [35] Kendran AAS, Gelgel KTP, Pertiwi NWL, Anthara, MS, Dharmayuda, AAGO, Anggreni LH (2013) Toxicity of

- red betel extract in diabetic white rat.
Jurnal Veteriner 14 (1): 527-533.
- [36] Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ (2007) Pharmacology, Elsevier's Health Sciences Rights Department, London.
- [37] Rachmania RA, Supandi, Cristina FAD (2016) Analisis penambatan molekul senyawa flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) pada reseptor α -glukosidase sebagai antidiabetes. Pharmacy 13(2): 239-251.