

LAPORAN TAHUNAN
PENELITIAN HIBAH BERSAING



**PENGEMBANGAN SUPLEMEN HIPOGLIKEMIK BERBASIS Cr(III)
MELALUI UJI PRE KLINIK SEBAGAI SUMBER *NUTRACEUTICAL*
PRODUCT BAGI PENYANDANG DIABETES MELLITUS TIPE-2**

Tahun ke I dari rencana 3 tahun

Tim peneliti :

Dr. KUN SRI BUDIASIH, M.Si

NIDN: 0002027213 (Ketua)

dr. KARTIKA RATNA PERTIWI, M Biomed.Sc

NIDN :0009028101 (Anggota)

UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA

November 2015

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : PENGEMBANGAN SUPLEMEN HIPOGLIKEMIK
BERBASIS Cr(III) MELALUI UJI PRE KLINIK
SEBAGAI SUMBER NUTRACEUTICAL PRODUCT
BAGI PENYANDANG DIABETES MELLITUS TIPE 2

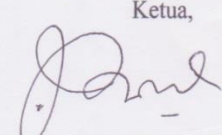
Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr. KUN SRI BUDIASIH S.Pd, M.Si
Perguruan Tinggi : Universitas Negeri Yogyakarta
NIDN : 0002027213
Jabatan Fungsional : Lektor
Program Studi : Kimia
Nomor HP : 081238791606
Alamat surel (e-mail) : kunsb@uny.ac.id

Anggota (1)
Nama Lengkap : dr. KARTIKA RATNA PERTIWI M.Biomed.Sc
NIDN : 0009028101
Perguruan Tinggi : Universitas Negeri Yogyakarta
Institusi Mitra (jika ada) : -
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 57.500.000,00
Biaya Keseluruhan : Rp 207.500.000,00

Mengetahui,
Dekan FMIPA UNY

(Dr. Hartono)
NIP/NIK 196202291987021002

Yogyakarta, 30 - 10 - 2015
Ketua,


(Dr. KUN SRI BUDIASIH S.Pd, M.Si)
NIP/NIK 197202022005012001

Menyetujui,
Ketua LPPM UNY

(Prof. Dr. Anik Ghufro, M.Pd)
NIP/NIK 196211111988031001

RINGKASAN

Prevalensi penyakit Diabetes Mellitus di Indonesia semakin meningkat. Penelitian epidemiologi menunjukkan jumlah penderita DM sebesar 8,4 juta pada tahun 2008. Badan Kesehatan Dunia (WHO) memperkirakan jumlah penderita DM di Indonesia akan meningkat sampai sebesar 21,3 juta di tahun 2030. Manajemen DM meliputi diet, olahraga, suplemen atau *nutraceutical*, obat hipoglikemia dan insulin endogen. Salah satu komponen suplemen yang diperlukan bagi penyandang DM adalah Cr(III). Belum banyak produk *nutraceutical* yang menyediakan asupan Cr(III) ini. Salah satu sumber Cr(III) yang berupa kromium pikolinat telah diteliti dan dipublikasikan oleh sejumlah jurnal ilmiah, memiliki risiko kerusakan DNA.

Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan produk suplemen berbasis Cr(III) yang berguna sebagai sumber *nutraceutical product* pada penyandang diabetes mellitus (DM). Pengembangan suplemen Cr(III) dirancang dengan bahan aktif baru yaitu Cr(III)-asam amino (asam glutamat). Pemilihan ligan asam amino dalam penelitian ini didasarkan pada sifat biavailabilitas dan data referensi yang melaporkan bahwa asam glutamat merupakan salah satu asam amino yang berperan sebagai GTF (*Glucose Tolerance Factor*) pada metabolisme glukosa di dalam tubuh.

Penelitian tentang sintesis bahan aktif suplemen Cr(III)-asam amino telah dilakukan pada penelitian sebelumnya. Tahap-tahap selanjutnya dalam penelitian ini adalah uji pre klinik dan uji klinik dengan sampel Cr(III)-glutamat (Cr-glu), yaitu senyawa kompleks ($[\text{Cr}(\mu\text{-OH})(\text{glu})(\text{OH})_2]_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Aktivitas *in vivo* bahan ini dibandingkan dengan beberapa kontrol yaitu Cr-Pic, dan glibenclamide sebagai obat hipoglikemik, serta kontrol negatif tanpa perlakuan. Pada tahun pertama, penelitian ini secara khusus bertujuan untuk mengetahui efek hipoglikemik senyawa kompleks ($[\text{Cr}(\mu\text{-OH})(\text{glu})(\text{OH})_2]_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) dalam uji pre-klinik secara *in vivo* pada hewan coba yang diinduksi diabetes dengan *nicotinamide* dan *streptozotocin* sebagai model DM tipe II. Parameter yang diperiksa adalah parameter biokimiawi kadar glukosa darah (KGD) serta parameter histopatologi hepar dan ginjal.

Selanjutnya, hasil penelitian tahun I menjadi dasar untuk penelitian tahun kedua, berupa uji toksisitas akut dan kronik produk yang dihasilkan serta pengembangan suplemen diabetes dalam bentuk biskuit melalui upaya fortifikasi. Pada tahap berikutnya (tahun ketiga) dapat dilaksanakan uji klinik RCT- (*randomized clinical trial*).

Kata kunci : diabetes mellitus (DM), Cr(III) -asam amino, nutraceutical, uji pre- klinik, uji klinik

PRAKATA

Laporan Akhir Penelitian Hibah Bersaing, berjudul **Pengembangan Suplemen Hipoglikemik Berbasis Cr(III) Melalui Uji Pre Klinik Sebagai Sumber *Nutraceutical Product* Bagi Penyandang Diabetes Mellitus Tipe-2** ini, disusun sebagai kewajiban dari peneliti sesuai penugasan dalam surat kontrak penelitian NOMOR SUBKONTRAK 02/Hibah Bersaing/UN,34.21/2015 Tanggal 2 Maret 2015. Setelah serangkaian proses penelitian yang meliputi perencanaan, pelaksanaan dan Monitoring-evaluasi, keseluruhan laporan ini dapat dipresentasikan.

Dari penelitian ini telah dihasilkan tiga luaran yaitu produk berupa senyawa kompleks Kromium(III)-glutamat, ($[\text{Cr}(\mu\text{-OH})(\text{glu})(\text{OH})_2]_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (yang merupakan sintesis ulang menurut prosedur yang telah ditentukan pada penelitian sebelumnya), preparat histologi, dan artikel ilmiah. Artikel pertama berjudul *Pre Clinical Study of Cr(III)-based Hypoglycemic Supplement in –Type 2 Diabetic Rats* yang telah dipublikasikan dalam Seminar Internasional : International Conference ICB-Pharma Fakultas Farmasi- Universitas Muhammadiyah Surakarta pada tanggal 31 Oktober 2015. Artikel kedua berjudul *A study on the Hystopatology of Cr(III)-amino acids supplementation on streptozotocin-nicotinamide diabetic Wistar Rats* sedang dipersiapkan untuk proses *submission* pada jurnal internasional : *Journal of Chemical & Pharmaceutical Research*, yang memiliki *impact factor* 0,9.

Ada sejumlah kendala dalam pelaksanaan penelitian ini antara lain selisih waktu yang cukup lama, dari jadwal rencana penelitian dengan waktu pencairan dana. Hal ini akan mempengaruhi proses pengadaan bahan-bahan penelitian. Dalam kasus penelitian bidang Kimia, banyak bahan yang harus dipesan dalam jangka waktu tertentu (1-3 bulan). Ketersediaan dana dalam waktu yang tepat akan sangat mendukung kelancaran penelitian.

Demikian laporan penelitian ini disusun dengan sebaik-baiknya dan diharapkan dapat memenuhi persyaratan penugasan sesuai peraturan yang berlaku.

Yogyakarta, 2 November 2015

Penyusun/ Ketua Peneliti

Dr. Kun Sri Budiasih M.Si

NIP.0202722005012001

DAFTAR ISI

| | | |
|---------|-------------------------------|----|
| | HALAMAN SAMPUL | 1 |
| | HALAMAN PENGESAHAN | 2 |
| | RINGKASAN | 3 |
| | PRAKATA | 4 |
| | DAFTAR ISI | 5 |
| | DAFTAR GAMBAR | 6 |
| | DAFTAR TABEL | 7 |
| | DAFTAR LAMPIRAN | 8 |
| BAB I | PENDAHULUAN | 9 |
| | Latar Belakang | 9 |
| | Batasan dan Rumusan Masalah | 10 |
| BAB II | TINJAUAN PUSTAKA | 12 |
| | Studi Pustaka | 12 |
| | Road map penelitian | 17 |
| BAB III | Tujuan dan Manfaat Penelitian | 18 |
| BAB IV | Metodologi Penelitian | 19 |
| BAB V | Hasil dan Pembahasan | 23 |
| BAB VI | Rencana Tahapan Berikutnya | 43 |
| BAB VII | Kesimpulan dan Saran | 45 |
| | Daftar Pustaka | 46 |
| | Lampiran | 47 |
| | Peralatan | 48 |
| | Tim Pelaksana | 49 |
| | CV | |
| | artikel | |

DAFTAR GAMBAR

| | | |
|-------------|---|-----------|
| Gambar 2.1 | Bagan Roadmap riset | 17 |
| Gambar 5.1 | Produk senyawa kompleks Cr-glu ($[\text{Cr}(\mu\text{-OH})(\text{glu})(\text{OH})_2]_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$) | 24 |
| Gambar 5.2 | Pengaruh suplementasi Cr terhadap kadar gula tikus percobaan | 26 |
| Gambar 5.3 | Histopatologi hepar tikus DM dengan pembedaan glibenklamid dan Cr Pic | 32 |
| Gambar 5.4 | Histopatologi hepar tikus dengan dosis Cr-glu bertingkat | 33 |
| Gambar 5.5 | Histopatologi hepar tikus kontrol DM dengan pembandingan glibenklamid dan Cr-Pic | 34 |
| Gambar 5.6 | Histopatologi glomerulus ginjal tikus kontrol DM dengan pembandingan glibenklamid dan Cr-Pic | 35 |
| Gambar 5.7 | Histopatologi glomerulus ginjal tikus dengan dosis Cr-glu bertingkat | 36 |
| Gambar 5.8 | Histopatologi glomerulus ginjal tikus kontrol DM dengan pembandingan glibenklamid dan Pic Cr-glu | 37 |
| Gambar 5.9 | Histopatologi tubulus proksimal ginjal tikus kontrol DM dengan pembandingan glibenklamid dan Cr-Pic | 38 |
| Gambar 5.10 | Histopatologi tubulus proksimal ginjal tikus dengan dosis Cr-glu bertingkat | 39 |
| Gambar 5.11 | Histopatologi tubulus proksimal ginjal tikus kontrol DM dengan pembandingan glibenklamid dan Pic Cr-glu | 40 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|-----------|---------------------------------|----|
| Tabel 4.1 | Rancangan percobaan uji in vivo | 22 |
| Tabel 5.1 | Persen glucose lowering | 27 |
| Tabel 5.2 | Diskripsi histopatologi hepar | 30 |
| Tabel 5.3 | Diskripsi histopatologi ginjal | 35 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|------------|---------------------------|
| Lampiran 1 | Instrumen Penelitian |
| Lampiran 2 | Organisasi tim peneliti |
| Lampiran 3 | Publikasi |
| Lampiran 4 | Foto |
| Lampiran 5 | CV |
| Lampiran 6 | Berita acara seminar LPPM |

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Prevalensi (kejadian penyakit) Diabetes Mellitus (DM) semakin meningkat di seluruh Indonesia maupun di dunia. Hal ini salah satunya disebabkan oleh perubahan pola hidup masyarakat yang tidak sehat seperti pola konsumsi makanan tinggi lemak dan karbohidrat dalam makanan siap saji. Perkembangan teknologi canggih juga menyebabkan masyarakat kurang melakukan aktivitas fisik. Penelitian epidemiologi dari Pranoto dkk. (2011) menunjukkan jumlah penderita DM sebesar 8,4 juta pada tahun 2010. Badan Kesehatan Dunia (WHO) memperkirakan jumlah penderita DM di Indonesia akan meningkat sampai sebesar 21,3 juta di tahun 2030.

Diabetes mellitus dapat diklasifikasikan sebagai DM Tipe 1, DM Tipe 2, Diabetes gestasional dan DM tipe lain. DM Tipe 1 ditandai oleh penurunan kadar insulin (insulinopenia) karena kerusakan sel-sel beta pankreas, sedangkan DM Tipe 2 didasari oleh gangguan kerja insulin atau yang dinamakan resistensi insulin dengan insulinopenia relatif pada keadaan tertentu seperti stress yang memerlukan insulin lebih banyak. Hiperglikemia pada DM akan bermanifes pada munculnya gejala seperti poliuria atau banyak berkemih, polidipsi atau banyak minum, polifagia atau banyak makan, dan penurunan berat badan. Dalam jangka panjang, DM menimbulkan komplikasi mikrovaskular seperti retinopati, nefropati dan neuropati; serta komplikasi makrovaskular seperti penyakit kardiovaskular, stroke dan penyakit vaskular. Pada akhirnya, penderita DM akan mengalami penurunan kemampuan fisik yang tentu saja akan mengganggu kinerjanya dalam berkarya bagi pembangunan bangsa di bidang keahlian mereka masing-masing. Oleh karena itu, diperlukan upaya penatalaksanaan diabetes mellitus untuk meminimalkan keluhan penderita akan gejala diabetes dan memungkinkannya untuk hidup secara normal tanpa ancaman komplikasi.

Pengelolaan DM menekankan pada empat pilar utama yaitu penyuluhan (edukasi), perencanaan makan, latihan jasmani dan obat hipoglikemik. Tujuan perencanaan makanan dalam pengelolaan DM adalah menjamin ketersediaan

nutrisi yang optimal untuk memenuhi kebutuhan tubuh dengan tetap menjaga kadar glukosa darah dalam batas normal. Makanan fungsional yang dikenal dengan nutraceutical food merupakan bahan nutrisi dengan kandungan biokimiawi-aktif alami dengan fungsi medis pemeliharaan kesehatan, pencegahan penyakit beserta komplikasinya serta terapeutik medis.

Sejumlah penelitian terkini menunjukkan pentingnya spesies kromium [Cr(III)], dalam dunia kesehatan, khususnya pengelolaan penyakit kasus diabetes mellitus terbukti dengan adanya peranan spesies kromium(III) dalam membantu proses metabolisme glukosa. Cr(III) menyimpan potensi untuk menjadi bahan suplemen aktivasi insulin bagi penyandang diabetes. Cr(III) berperan meningkatkan sensitifitas reseptor insulin untuk berinteraksi sehingga dapat membuka aliran insulin bersama glukosa memasuki membran sel. Dengan fungsi ini, distribusi glukosa menjadi lancar dan segera dapat diubah menjadi energi. Cr(III) dengan asam amino mengerjakan fungsinya sebagai Glucose Tolerance Factor (GTF). GTF berfungsi mengaktifkan reseptor insulin sehingga meningkatkan aktivitas metabolisme glukosa menjadi energi (Cooper, 1984).

Asam amino yang dilaporkan terkait dengan GTF adalah glisin, sistein, dan asam glutamat (Ochiai, 2008). Berdasarkan fakta tersebut, pemanfaatan Cr dengan asam amino secara bersamaan dalam bentuk senyawa baru merupakan peluang yang potensial untuk aplikasi ini. Bagi penyandang diabetes, seseorang yang mengalami hambatan metabolisme glukosa, Cr(III) akan sangat bermanfaat sebagai mikronutrien (Krejpcio, 2001; Vincent, 2007). Dengan demikian adanya potensi Cr(III) sebagai penurun kadar gula darah (hypoglycemic agent) dan kebutuhan akan modifikasi makanan dalam pengelolaan diet penderita diabetes mendorong untuk dilakukan suatu penelitian berkelanjutan sehingga produk akhir yang dihasilkan dapat dikembangkan sampai tahap implementasi bagi masyarakat khususnya penyandang DM.

Berdasar latar belakang diatas, dapat dirumuskan permasalahan dan tujuan penelitian sebagai berikut:

1. Bagaimana pengujian pre klinik kompleks Cr(III)-asam amino untuk digunakan sebagai sebagai bahan suplemen hipoglikemik

2. Bagaimana fortifikasi dengan bahan aktif Cr(III) dan uji klinis produk tersebut sebagai suplemen / sumber nutraceutical bagi penyandang diabetes tipe 2?

B. Batasan dan Rumusan Masalah

Untuk pelaksanaan penelitian tahun ke-1, perumusan masalah diutamakan pada rumusan pertama, yaitu bagaimana uji pre klinik bahan aktif Cr-asam amino (dalam hal ini Cr-glu) menjadi kandidat suplemen hipoglikemia?

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Studi Pustaka

Diabetes atau yang lebih dikenal dengan penyakit gula merupakan suatu kelainan metabolik yang ditandai dengan tingginya kadar gula darah (hiperglikemia), yang terjadi karena defek pada sekresi insulin, defek kerja insulin atau keduanya. Pengaturan kadar gula darah dalam tubuh manusia diatur oleh hormon insulin yang disekresikan oleh kelenjar pankreas. Insufisiensi insulin pada DM disebabkan gangguan atau defisiensi produksi insulin oleh sel beta pankreas atau kurang responsifnya sel-sel tubuh terhadap insulin, yang pada akhirnya menyebabkan gangguan metabolisme karbohidrat, lipid dan protein. Hiperglikemia pada DM akan bermanifestasi pada munculnya gejala seperti poliuria atau banyak berkemih, polidipsi atau banyak minum, polifagia atau banyak makan, dan penurunan berat badan.

WHO memprediksi kenaikan jumlah penyandang DM di Indonesia dari 8,4 juta pada tahun 2000 menjadi sekitar 21,3 juta pada tahun 2030 (Pranoto dkk, 2011). Senada dengan WHO, *International Diabetes Federation* (IDF) pada tahun 2009, memprediksi kenaikan jumlah penyandang DM dari 7,0 juta pada tahun 2009 menjadi 12,0 juta pada tahun 2030. Meskipun terdapat perbedaan angka, laporan keduanya menunjukkan adanya peningkatan jumlah penyandang DM sebanyak 2-3 kali lipat pada tahun 2030 (WHO, 2011).

Banyak reaksi biologis yang melibatkan spesies –spesies anorganik. Tidak semua unsur dapat dianggap esensial bagi organisme. Ada beberapa kriteria suatu unsur (spesies) disebut sebagai unsur esensial, yaitu (Ochiai, 2008) :Jika unsur tidak ada dalam makanan/minuman/asupan akan menyebabkan defisiensi fisiologis, defisiensi akan teratasi dengan penambahan unsur tersebut dan ada peran biologis yang dikaitkan dengan unsur tersebut.

Cr (III) merupakan spesies anorganik yang memenuhi kriteria tersebut. Sejumlah penelitian terkini menunjukkan pentingnya spesies kromium (III) dalam dunia kesehatan, khususnya pengelolaan penyakit kasus diabetes mellitus.

Peranan spesies kromium(III) dalam membantu proses metabolisme glukosa adalah meningkatkan sensitifitas reseptor insulin, sehingga dapat membuka aliran insulin bersama glukosa memasuki membran sel. Dengan fungsi ini, distribusi glukosa menjadi lancar dan segera dapat diubah menjadi energi. Bagi diabetesi, seseorang yang mengalami hambatan metabolisme glukosa, sangat membutuhkan Cr(III) sebagai mikronutrien (Krejpcio, 2001; Vincent, 2007).

Pada produk komersial, Cr tersedia sebagai Kromium pikolat (CrPic), sebuah bentuk garam dari asam pikolat (HPic = asam pikolat = asam piridin-2-karboksilat) (Anderson, 2000). Suplemen ini ditambahkan pada susu atau biskuit yang ditujukan untuk makanan fungsional bagi diabetesi. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa CrPic dalam metabolismenya melibatkan kerusakan DNA (Bagchi, et al., 2002; Hepburn et al., 2003). Nedim et al. (2003) telah melakukan penelitian terhadap kompleks kromium(III) -asam amino.

Cr(III) dengan asam amino mengerjakan fungsinya sebagai GTF (Glucose Tolerance Factor). GTF berfungsi mengaktifkan reseptor insulin sehingga meningkatkan aktivitas metabolisme glukosa menjadi energi. Asam amino yang dilaporkan berkait dengan GTF adalah glisin, sistein, dan asam glutamat (Ochiai, 2008). Berdasarkan fakta tersebut, pemanfaatan Cr dengan asam amino secara bersamaan dalam bentuk senyawa baru merupakan peluang yang potensial untuk aplikasi ini.

Sintesis dan karakterisasi senyawa kompleks Cr(III) asam amino telah dipublikasikan oleh Budiasih dkk (2013). Dalam penelitian terdahulu telah disintesis beberapa kompleks dari Cr(III) dengan asam amino : L-asam glutamat, glisin dan L-sistein, dengan metode refluks. Rendemen produk berkisar antara 40.08-87.50%. Struktur molekul dari kompleks yang dihasilkan adalah $[\text{Cr}(\mu\text{-OH})(\text{aa})(\text{OH})_2]_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Pengembangan dan penilaian bahan obat dan suplemen perlu dilengkapi dengan uji tahap selanjutnya. Suatu senyawa yang baru ditemukan (hasil isolasi maupun sintesis) terlebih dahulu diuji dengan serangkaian uji farmakologi yaitu uji pre klinik dan uji klinik:

1. Uji Preklinik, meliputi

- Uji Farmakodinamika :Untuk mengetahui apakah bahan obat menimbulkan efek farmakologik seperti yang diharapkan atau tidak, titik tangkap, dan mekanisme kerjanya. Uji ini dapat dilakukan secara in vivo dan in vitro.
- Uji Farmakokinetika : Uji ini digunakan untuk untuk mengetahui ADME (Absorpsi, Distribusi, Metabolisme dan Eliminasi) bahan uji dan merancang dosis/ aturan pakai.
- Uji Toksikologi : Uji ini dilakukan untuk mengetahui keamanan bahan uji/ calon bahan obat.
- Uji Farmasetika :Uji ini dilakukan untuk memperoleh data farmasetiknya, tentang formulasi,standarisasi, stabilitas, bentuk sediaan yang paling sesuai dan cara penggunaannya.

2. Uji Klinik

Uji Klinik adalah suatu pengujian khasiat obat baru pada manusia, setelah sebelumnya diawali oleh pengujian pada binatang atau pra klinik (Katzung, 1989). Uji klinik memastikan efektivitas, keamanan dan gambaran efek samping yang sering timbul pada manusia akibat pemberian suatu obat. Uji klinik ini terdiri dari uji fase I sampai fase IV (Ganiswara, 1995).

a) Uji Klinik Fase I

Fase ini merupakan pengujian suatu obat baru untuk pertama kalinya pada manusia. Yang diteliti disini ialah keamanan dan tolerabilitas obat, bukan efikasinya, maka dilakukan pada sukarelawan sehat, kecuali untuk obat yang toksik (misalnya sitostatik), dilakukan pada pasien karena alasan etik Tujuan fase ini adalah menentukan besarnya dosis maksimal yang dapat toleransi (maximally tolerated dose = MTD), yakni dosis sebelum timbul efek toksik yang tidak dapat diterima.

b) Uji Klinik Fase II

Pada fase II awal, pengujian efek terapi obat dikerjakan secara terbuka karena masih merupakan penelitian eksploratif (Ganiswara, 1995). Pada fase ini

dicobakan pada pasien sakit. Tujuannya adalah melihat apakah obat ini memiliki efek terapi.

c) Uji Klinik Fase III

Adalah pengujian pada manusia sakit, dengan ada kelompok kontrol dan kelompok pembanding. Cakupan uji lebih luas baik dari segi jumlah pasien maupun keragaman (misal : intra ras. Setelah terbukti efektif dan aman obat siap untuk dipasarkan. Uji klinik fase III dilakukan untuk memastikan bahwa suatu obat-baru benar-benar berkhasiat (sama dengan penelitian pada akhir fase II) dan untuk mengetahui kedudukannya dibandingkan dengan obat standard (Ganiswara, 1995).

d) Uji Klinik Fase IV

Uji ini merupakan uji terhadap obat yang telah dipasarkan (post marketing surveillance). Kegunaannya adalah memantau efek samping yang belum terlihat pada uji-uji sebelumnya. Fase ini termasuk mengenali drug safety, yang meliputi drug mortality atau drug morbidity serta MESO : Monitoring Efek Samping Obat. Fase ini sering disebut *post marketing drug surveillance* karena merupakan pengamatan terhadap obat yang telah dipasarkan.

Fortifikasi pangan adalah penambahan satu atau lebih zat gizi (nutrien) ke pangan. Tujuan utama adalah untuk meningkatkan tingkat konsumsi dari zat gizi yang ditambahkan untuk meningkatkan status gizi populasi. Harus diperhatikan bahwa peran pokok dari fortifikasi pangan adalah pencegahan defisiensi. Dengan demikian menghindari terjadinya gangguan yang membawa kepada penderitaan manusia dan kerugian sosio ekonomis. Namun demikian, fortifikasi pangan juga digunakan untuk menghapus dan mengendalikan defisiensi zat gizi dan gangguan yang diakibatkannya (Albiner Siagian, 2003).

B. ROADMAP PENELITIAN

Penelitian ini merupakan tindak lanjut dari penelitian-penelitian sebelumnya tentang unsur-unsur penting dalam kimia anorganik, terutama perhatian peneliti terhadap mineral runtuhan dan nutraceutical. Peneliti telah melakukan penelitian untuk melakukan sintesis Cr (III)- asam amino (Budiasih,

dkk, 2013). Sintesis dilakukan dengan metode refluks dari bahan- bahan pro- analisis. Produk yang dihasilkan berupa padatan berwarna ungu. Karakterisasi yang dilakukan adalah karakterisasi spektroskopik dengan spektrofotometer inframerah dan spektrofotometer Uv-vis, SSA, *elemental analysis*, serta penentuan struktur secara simulasi.

Hasil pengamatan pada hewan coba menentukan kesimpulan apakah dapat diteruskan dengan uji pada manusia. Teknologi pembuatan formula obat, menghasilkan bentuk-bentuk sediaan obat yang akan diuji pada manusia. Dalam penelitian tahun pertama, telah dilakukan penelitian uji aktivitas hipolikemia, uji pre klinik tahap 1 meliputi toksisitas akut maupun kronik, uji farmakodinamika, farmakokinetika, toksisitas dan histopatologi.

Penelitian tahap kedua (untuk tahun ke II) adalah uji pre klinik tahap 2 yaitu uji toksisitas dan uji aspek farmasetika yang meliputi formulasi bahan sediaan, standarisasi, stabilitas dan bentuk sediaan *nutraceutical product*. Target tahun ke II adalah produk suplemen yang akan diujikan pada responden.

Penelitian tahap ketiga (untuk tahun ke III) adalah uji klinik 3 fase. Target tahun ke III adalah potensi HAKI, produk siap diujicobakan ke masyarakat dan dapat dipresentasikan ke pihak industri *nutraceutical product*. Rencana Kerja Penelitian Tahun ke III antara lain berupa aplikasi pembuatan tablet yang mengandung bahan aktif Cr(III)-asam amino dan dilanjutkan dengan penerapan pada responden.

Bagan Roadmap Riset



BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

A. Tujuan Penelitian

1. Melakukan pengujian aktivitas hipoglikemik terhadap senyawa kompleks Cr(III) – asam amino (Cr-glu, $[\text{Cr}(\mu\text{-OH})(\text{glu})(\text{OH})_2]_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) dengan uji pre klinik dengan parameter biokimiawi kadar gula darah dan parameter histopatologi.
2. Melakukan usaha fortifikasi bahan suplemen berbasis Cr(III) menjadi bahan nutraceutical dalam bentuk tablet dan biscuit (lanjutan penelitian) .

B. Manfaat penelitian

Manfaat penelitian ini adalah dapat memberikan informasi tentang aktivitas senyawa kompleks Cr(III) asam amino khususnya Cr-glu sebagai bahan aktif suplemen hipoglikemia. Hasil ini diharapkan dapat menjadi bahan penelitian lanjutan untuk mengembangkan suplemen hipoglikemia berbasis senyawa Cr(III) dengan cakupan yang lebih luas.

BAB IV METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Penelitian yang dilakukan merupakan uji pre-klinik, bersifat eksperimental murni dengan percobaan *in vivo* untuk mengetahui pengaruh pemberian senyawa Cr(III)-asam amino terhadap kadar glukosa darah dan gambaran histopatologi jantung, pembuluh darah, hepar dan ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) model DM tipe II yang diinduksi dengan *Nicotinamide-Streptozotocin*.

B. Objek Penelitian

Penelitian dilakukan pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar yang didapatkan dari Lab Farmakologi Fak Farmasi UGM, sehat dan aktivitasnya normal. Umur kurang lebih 8-10 minggu, dengan berat rata-rata 200 gram sebanyak 40 ekor yang terbagi dalam 8 kelompok. Penelitian dilakukan di *Animal House* dan Laboratorium Histologi Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam FMIPA UNY. Waktu efektif perlakuan adalah 9 pekan, ditambah dengan waktu persiapan dan waktu untuk analisis data.

C. Alat dan Bahan

Bahan- bahan meliputi senyawa kompleks Cr(III)-asam amino hasil penelitian sebelumnya, yaitu Cr-glu dengan rumus $[\text{Cr}(\mu\text{-OH})(\text{glu})(\text{OH})_2]_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ (Budiasih, et al., 2013), bahan kontrol dari glibenklamide, CrPic dalam susu diabetes, pakan dari pelet BR, Na-CMC, buffer sitrat, NaCl, streptozotocin dan nicotinamide (Sigma Aldrich), kaca obyek, alkohol 70%.

Peralatan meliputi: Alat gelas laboratorium, gelas beker, corong gelas, labu takar, pengaduk. perlengkapan kandang, sonde lambug, *disposable syringe*, masker, *glove*, alat bedah, tissue, tabung eppendorf, pot salep, botol vial, kapas.

Pembuatan preparat memerlukan perangkat alat pengambil tubuh hewan, Rotary microtome, Automatic Tissue Processor, Automatic Tissue Embedding

Center, Fisser Tissue TM Flootation Bath Mode 134, alat-alat gelas lainnya, kamera foto, dan mikroskop. Bahan yang digunakan yaitu akuades, formalin 10%, xylol, paraffin, hematoksin-Eosin, HCl, alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol 100% (absolut).

D. Langkah Penelitian

TAHUN PERTAMA

Tahap Persiapan

1. Mengadaptasikan hewan coba selama kurang lebih 4-6 hari
2. Menyiapkan alat dan bahan untuk perlakuan hewan coba
3. Membuat lembar tabulasi data

Tahap Pelaksanaan

Pengujian Aktivitas hipoglikemia

1. Senyawa kompleks yang dihasilkan 9sintesis ulang erdasarkan penelitian sebelumnya) diuji secara in vivo dengan mempelajari pengaruh suplementasi terhadap kadar gula darah pada tikus percobaan. Tikus dipelihara dan diperlakukan secara standar dengan kandang dan pakan sesuai kondisi laboratorium dengan diet 15-20 gram pakan per hari. Minum diberikan secara *ad libitum*. Tikus putih jantan galur Wistar diambil dari laboratorium Farmakologi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dan dipelihara di *Animal House*, Jurdik Biologi FMIPA UNY. Tikus diperlakukan sesuai kelompoknya. Pemberian produk bahan suplemen dilakukan secara per oral selama 3 bulan. Variasi perlakuan adalah 3 dosis dalam suspensi Na-cmc 0.2%. Tiap kelompok terdiri atas 4 ekor tikus yang dipilih secara acak berdasar pembagian berikut:

Tabel 4.1. Rancangan percobaan uji aktivitas in vivo Cr-glu

| No | Kelompok | Keterangan |
|----|--|---------------------|
| 1 | Sampel tikus dengan asupan Cr(III)-glu dosis I | Perlakuan I |
| 2 | Sampel tikus dengan Cr(III)-glu dosis II | Perlakuan II |
| 3 | Sampel tikus dengan Cr(III)-glu dosis III | Perlakuan III |
| 4 | Sampel tikus dengan pemberian produk pembanding Cr-Pic | Perlakuan CrPic |
| 5 | Sampel tikus dengan pemberian obat glibenclamide | Perlakuan Gliben |
| 6 | Kelompok kontrol DM tanpa perlakuan | Hanya diberi Na-cmc |
| 7 | Kelompok kontrol non DM | Hanya diberi Na-cmc |

Setelah perlakuan, tikus-tikus tersebut diambil darahnya melalui vena mata dan diukur kadar gula darahnya. Kadar gula tikus yang diukur adalah kadar gula darah sebelum perlakuan, dan setiap akhir bulan selama 3 bulan (9 pekan). Perhitungan aktifitas hipoglikemia (antihiperglikemia) atas sampel/produk dibandingkan dengan kontrol untuk waktu yang sama. Sampel non DM juga diambil sebagai pembanding non DM.

2. Uji histopatologi dilakukan dengan membuat preparat setelah terminasi hewan dan diambil organnya (hepar dan ginjal) untuk dianalisis. Organ yang telah diambil kemudian dicuci dengan Larutan Garam Fisiologis (NaCl 0,9%). Organ yang telah dicuci kemudian difiksasi dengan menggunakan larutan Bouin selama ± 24 jam. Setelah 24 jam, organ dicuci dengan ethanol 70% dan didehidrasi menggunakan alcohol bertingkat (ethanol 70% hingga ethanol absolute) dan dimasukkan dalam larutan Clearing (Toluol) selama 1 malam (Overnight). Embedding dan infiltrasi paraffin dilakukan pada hari berikutnya. Blok paraffin kemudian dipotong dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan *coupes* $\pm 4-6 \mu$. *Coupes* yang telah ditempel pada gelas preparat kemudian diwarnai dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin.

Identifikasi Variabel Penelitian

Variabel terbayang : kadar glukosa darah dan gambaran histopatologi hepar dan ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Variabel bebas : Perlakuan pemberian senyawa Cr(III)-glu dan kelompok kontrol

Variabel Luar Terkendali:

Variabel subjek penelitian yaitu jenis tikus, galur tikus, jenis kelamin, umur, berat badan, dan perlakuan subjek meliputi pemberian makanan dan minuman, jenis dan kualitasnya sesuai kelompok masing-masing.

Variabel perawatan yaitu makanan dan minuman. Makanan dan minuman yang diberikan kepada subjek adalah sama jenis dan kualitasnya sesuai kelompok masing-masing.

Tahap Analisis Data

1. Kadar glukosa darah antar kelompok perlakuan dianalisis dengan statistik Anova dan jika terdapat perbedaan yang bermakna dilanjutkan dengan uji *t-test*.
2. Pengamatan dan Analisis Preparat Histopathologi dilakukan secara deskriptif.
 - a. Hepar. : pengamatan dilakukan pada sel hepatosit, lobulus hati dan duktus biliaris. Parameter yang diamati adalah ada-tidaknya jaringan yang mengalami degenerasi, nekrosis, serta proliferasi sel-sel hepatosit baru melalui proses mitosis dengan cara *scoring*. Pengamatan juga dilakukan terhadap morfologi lobulus hati (anastomosis hepatosit terhadap sinusoid). Fungsi sekresi hati diobservasi dengan memeriksa ada tidaknya kerusakan yang terjadi pada sel-sel yang melapisi lapisan dalam duktus biliaris.
 - b. Ginjal : Bagian yang diamati pada ginjal adalah struktur kapsula Bowman dan tubulus proximal yang ada pada bagian korteks ginjal. Pengamatan dilakukan terhadap ada tidaknya penipisan pada membran basalis kapsula bowmani dan sel-sel nekrosis pada glomerulus. Pada tubulus proksimal, parameter yang diamati adalah penambahan jumlah sel yang melapisi tubulus proksimal serta terjadinya edema.

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Sintesis Bahan Aktif Cr-asam amino (Cr-glutamat)

Sintesis bahan aktif senyawa kompleks Cr-asam amino dilakukan dengan prosedur yang telah ditentukan pada penelitian sebelumnya (Budiasih, et al, 2015). Hasil sintesis adalah padatan berwarna ungu. Karakter bahan aktif ini dilakukan dengan spektrofotometri Inframerah (FTIR), spektrofotometri Serapan atom, Elemental analysis dan penentuan sifat magnet.

Senyawa kompleks yang dihasilkan ada memberikan spektra IR yang berbeda signifikan dengan spektra ligan bebasnya (Glu). Terdapat pita pada 1563cm^{-1} yang menunjukkan vibrasi ν C-O dan ν N-H (3535cm^{-1}) dan pita tersebut bergeser masing masing sekitar $30\text{-}40\text{cm}^{-1}$. Pita dengan ketajaman sedang dari ligan bebas ($3000\text{--}3500\text{cm}^{-1}$) bergeser ke sekitar 600cm^{-1} diduga berkaitan dengan reorganisasi intramolekuler dari ikatan hidrogen setelah terbentuknya ikatan koordinasi. Pita absorpsi baru dalam area IR jauh sekitar $385\text{--}410\text{cm}^{-1}$, $324\text{--}337\text{cm}^{-1}$, and $447.49\text{cm}^{-1} - 424,34\text{cm}^{-1}$ dapat diartikan sebagai vibrasi ikatan Cr-O dan Cr-N.

Pita tajam pada 1643.35cm^{-1} pada ligan dari vibrasi ikatan C=O juga bergeser ke arah frekuensi yang lebih rendah ($1620.21\text{--}1604.77$) pada kompleks yang terbentuk. Selain itu, kemunculan pita lemah dari daerah $401\text{--}447$ dan $540.07\text{--}532.35\text{cm}^{-1}$ yang masing –masing berhubungan dengan $\nu_{(\text{Cr-O})}$ dan $\nu_{(\text{Cr-N})}$, mengkonfirmasi terjadinya kompleksasi. Ikatan koordinasi dalam kompleks Cr-glu diprediksi terjadi melalui gugus COOH. Hal ini ditandai dari hilangnya pita pada 1660cm^{-1} dari asam glutamat.

Karakterisasi dengan XRD menunjukkan bahwa senyawa kompleks Cr-glu yang terbentuk bersifat amorf. Hal ini merujuk pada penelitian sebelumnya (Budiasih dkk, 2013). Data difraksi sinar X (XRD) tidak berkait langsung dengan karakter senyawa kompleks Cr-glu sebagai agen hipoglikemik. Analisis dengan VSM (Vibrational Sample magneto meter) emnunjukkan sifat magnet senyawa

ini adalah diamagnetik. Sifat ini memberikan sinyal tidak adanya elektron yang tidak berpasangan atau adanya elektron tidak berpasangan yang berjumlah genap dengan spin berlawanan. Petunjuk ini membantu penentuan struktur pada tahap berikutnya.

Analisis dengan spektrofotometer serapan atom dan *elemental analysis* dilakukan untuk menentukan komposisi logam Cr dan unsur-unsur lain dari ligananya yaitu H, N dan O. Dengan metode simulasi diperoleh rumus molekul Cr-glutamat yang dihasilkan adalah $[\text{Cr}(\mu\text{-OH})(\text{glu})(\text{OH})_2]_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Produk Cr-glu yang dimaksud disajikan pada gambar 5.1.



Gambar 5.1 Produk senyawa kompleks Cr-glu ($[\text{Cr}(\mu\text{-OH})(\text{glu})(\text{OH})_2]_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

B. Uji Pre klinik suplemen Cr(III)-AA pada tikus percobaans

Parameter yang diamati dalam tahap pengujian ini adalah:

1. Parameter biokimiawi darah : Kadar glukosa darah awal (base line), Kadar glukosa diabetes dan kadar glukosa setelah perlakuan.
2. Parameter histopatologi : preparat histologi hepar dan ginjal yang dianalisisi secara diskriptif.

Eksperimen *in vivo* pada tikus percobaan terinduksi diabetes tipe 2 meliputi kegiatan sebagai berikut:

1. Tikus yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan, galur Wistar, sehat dan mempunyai aktivitas normal, umur sekitar 3 bulan, dengan berat badan ± 300 gram. Tikus diadaptasi selama sepekan dan diukur kadar gula darah awal (sebelum induksi). Berat badan tikus ditimbang setiap 10 hari.

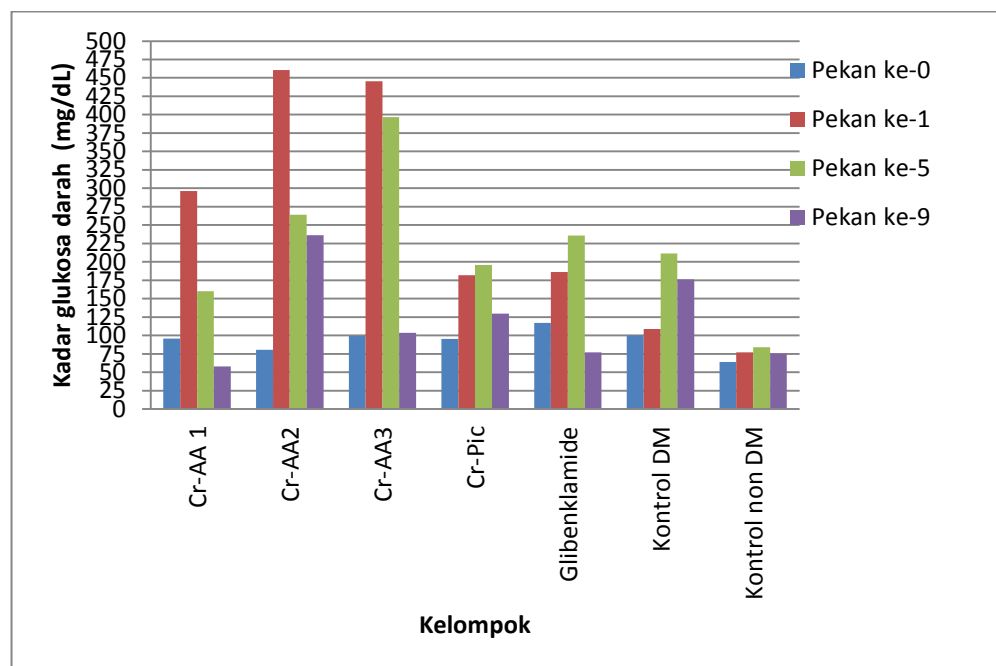
2. Induksi Diabetes : Injeksi secara intraperitoneal (IP) dengan Nicotinamide dengan dosis 120 mg/kg BB dan disusul Streptozotocin (Stz) dengan dosis 60mg/kg BB. Informasi status positif diabetes diperoleh pada hari ke 7.
3. Setelah kadar gula darah terinduksi diketahui, tikus kelompok uji diberi perlakuan harian per oral (p.o) dengan formula Cr-glu dengan dosis 50, 150, dan 300 µg/hari. Untuk kelompok kontrol diberikan larutan cmc-Na, dengan kontrol positif Cr-Pic dan glibenklamid.
4. Pengamatan dilakukan selama 9 pekan (sepekan proses konfirmasi dari induksi dan 8 pekan perlakuan).
5. Kadar gula darah diukur pada saat awal percobaan, hari ke-7 setelah induksi dan setelah perlakuan 8 pekan, dicatat dalam satuan mg/dL.
6. Perhitungan aktifitas hipoglikemik atas sampel dibandingkan dengan kontrol. Hasilnya disajikan dalam hubungan profil kadar glukosa darah vs waktu.
7. Aktivitas hipoglikemik dihitung sebagai % glucose lowering (GL) yaitu :

$$\%GL = \frac{(glukosa)_{sebelum\ perlakuan} - (glukosa)_{sesudah\ perlakuan}}{(glukosa)_{sebelum\ perlakuan}} \times 100\%$$
8. Gambaran histopatologi organ tikus terinduksi diabetes mellitus tipe 2 dan pengaruh perlakuan yang diberikan dilihat pada hati dan ginjal.

Bahan yang digunakan adalah produk sintesis yang merupakan hasil sintesis ulang berdasar prosedur yang ditentukan pada penelitian sebelumnya. Sampel kompleks Cr-asam amino yang digunakan adalah Cr-glutamat ($[\text{Cr}(\mu\text{-OH})(\text{glu})(\text{OH})_2]_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$). Selain parameter aktivitas hipoglikemik dengan parameter kadar glukosa darah, juga dipelajari aspek histopatologi hewan coba yang digunakan. Untuk keperluan ini dilakukan bedah organ pada masa akhir perlakuan (terminasi), pembuatan preparat, pembuatan foto preparat dan analisis gambar histopatologinya.

1. Hasil pengamatan pada parameter biokimiawi darah

Pengaruh pemberian asupan Cr-glu dan beberapa pembanding disajikan pada gambar 5.2.



Gambar 5.2 Profil kadar gula darah tikus percobaan selama pengamatan

Dari gambar 5.2 terlihat bahwa setelah 7 hari induksi diabetes kadar glukosa dari kelompok perlakuan telah mengalami kenaikan secara signifikan. Sebagian besar subyek melewati batas ambang diabetes dengan kadar gula darah puasa sebesar 126 mg/dl. Sebagian sampel tidak mencapai kadar gula 126 mg/dl tetapi telah mengalami kenaikan kadar gula (hiperglikemia). Dengan demikian sampel dengan telah terkondisi untuk diamati dengan parameter perubahan kadar gula darah.

Efek dari perlakuan dapat dilihat dari besarnya persen *glucose lowering* (% GL) yang dinyatakan dalam % GL yang merupakan persentase penurunan kadar gula darah (Sharma *et al.*, 2011). Persen *glucose lowering* (% GL) dinyatakan dari selisih kadar gula (rerata) kelompok tikus coba diabetes sebelum berlakuan dengan kadar gula (rerata) tikus coba sesudah perlakuan dibandingkan dengan kadar gula (rerata) sebelum perlakuan.

$$\%GL = \frac{(glukosa)_{sebelum\ perlakuan} - (glukosa)_{sesudah\ perlakuan}}{(glukosa)_{sebelum\ perlakuan}} \times 100\% \quad (1)$$

Parameter ini menunjukkan bagaimana profil penurunan kadar gula tikus coba dengan diabetes setelah diperlakukan. Hasil perhitungan disajikan pada tabel 5.1

Tabel 5.1 Persen Glucose lowering

| Kelompok | Perlakuan | %GL |
|-----------------|------------------|------------|
| A | CrAA 1 | 80,4652995 |
| B | CrAA2 | 48,7149786 |
| C | CrAA3 | 76,708946 |
| D | Cr-Pic | 28,640 |
| E | Glibenklamide | 58,674 |
| F | kontrol DM | 16,68 |
| G | kontrol Non DM | 1,683 |

Hasil induksi diabetes dengan stz-nicotinamide pada kelompok A, B dan C menunjukkan kenaikan kadar gula yang sangat tinggi, hingga sebagian mencapai angka di atas 400 mg/dL. Di satu sisi hal ini menunjukkan keberhasilan proses induksi, namun di sisi lain tingginya kadar gula hingga nilai yang sangat besar menjadi beban yang berat bagi aktivitas suplemen. Perlu diingat bahwa aktivitas suplemen bersifat perawatan dan berjangka panjang. Kenaikan kadar gula yang sangat tinggi memerlukan penanganan obat hipoglikemik akut, selain suplemen yang mengikutinya. Untuk menjawab permasalahan ini, data akan dibandingkan dengan kelompok perlakuan dengan obat hipoglikemik glibenclamide.

Pada perlakuan pemberian asupan dengan kandidat formula suplemen hipoglikemik dari Cr-glu, sebagian anggota kelompok tidak dapat mencapai kadar gula darah di bawah 126 mg/L pada pekan ke 8, walaupun besarnya penurunan kadar gula darah tertinggi dapat mencapai 78-80 persen. Kadar gula darah diabetes kelompok perlakuan Cr-glu, terutama kelompok B cukup tinggi hingga mencapai angka di atas 400mg/dL.

Hasil yang tidak optimum pada kelompok perlakuan dosis ke-2 terjadi karena base line nilai kadar gula darah pada kelompok ini terlalu tinggi yakni sampai pada nilai di atas 500mg/dL sehingga menjadi beban yang tidak dapat diatasi oleh kinerja suatu suplemen. Kadar gula darah yang sangat tinggi setelah induksi dapat dihubungkan dengan kerusakan yang fatal pada sel beta pankreas,

sehingga aktivasi insulin tidak teratasi oleh suplementasi kromium. Hal ini berhubungan dengan fungsi regenerasi organ yang telah mengalami kerusakan sebagian oleh induksi diabetes. Dengan kerusakan yang masif, fungsi regenerasi menjadi terhambat. Namun demikian, adanya penurunan kadar gula yang signifikan menunjukkan fungsi bahan aktif Cr-glu sebagai agen yang mengaktifkan kinerja insulin. Hal ini dapat dijelaskan dengan perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol DM (F). Harus dipahami bahwa fungsi suplemen bukan menurunkan kadar gula darah secara spontan, melainkan secara sedikit-demi sedikit dalam waktu lama.

Kelompok perlakuan A, B dan C masing-masing adalah kelompok dengan perlakuan asupan Cr-glu dengan dosis 50, 150 dan 300 µg/hari. Pengaruh variasi dosis dalam penelitian ini tidak menunjukkan kecenderungan tertentu karena tercapainya hasil tinggi pada dosis 50 µg/hari, namun lebih rendah pada dosis 150 µg/hari dan lebih tinggi pada 300 µg/hari. Kemampuan penurunan kadar gula darah yang relatif rendah pada pemberian dosis kedua (150 µg/hari) tidak serta merta memberi kesimpulan pengaruh dosis yang berbanding terbalik. Hal ini dapat dilihat bahwa pada pemberian dosis 300 µg/hari persen glucose lowering relatif sama dengan dosis pertama. Untuk me

Perlakuan dengan obat hipoglikemik glibenclamide dapat menurunkan kadar gula darah hingga tercapai rerata di bawah 126 mg/dL (kadar gula darah normal puasa). Sebagai obat hipoglikemik akut, glibenclamide bekerja secara lebih aktif dan cepat. Namun demikian, capaian penurunan kadar gula darah sebagai persen glucose lowering (%GL) dari kelompok glibenclamide lebih kecil daripada perlakuan dengan Cr-glu, yaitu sekitar 58%. Obat hipoglikemik juga tidak lebih baik jika digunakan dalam jangka waktu lama. Oleh karena itu pemberian suplemen Cr-glu untuk menjaga kadar gula darah masih layak diharapkan.

Perlakuan pada kelompok kontrol (+) dengan pemberian Cr-Pic dilakukan untuk membandingkan gejala penurunan kadar gula dari produk yang telah dipasarkan secara umum. Hasilnya menunjukkan nilai persen penurunan kadar

gula darah sekitar 28,6%. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa secara kualitatif perlakuan dengan Cr-glu lebih baik dibandingkan dengan Cr-Pic.

Sebagai pembandingan, Shinde, *et al.*, (2004) mempelajari suplementasi selama 6 minggu dengan CrPic dengan perlakuan 8µg/ml air minum, dalam tikus terinduksi stz dengan kontrol insulin. Perlakuan CrPic dapat meningkatkan sensitivitas insulin untuk diabetes tipe 1 (IDDM) yang tergantung insulin, namun kurang bermakna pada kelompok diabetes tipe 2 (NIDDM) yang tidak tergantung insulin.

Secara umum dapat dinyatakan bahwa suplementasi Cr(III)-asam amino selama 8 minggu dapat menurunkan secara signifikan kadar gula darah tikus percobaan yang terinduksi diabetes dengan streptozotocin-nicotinamid. Hipotesis dari penelitian ini tidak ditolak, bahwa kompleks Cr-asam amino memiliki aktivitas sebagai agen antihiperglikemia, yaitu dapat membantu menurunkan kadar gula darah tikus percobaan yang diinduksi diabetes dengan stz-nicotinamid. Aktivitas antihiperglikemia antara keempat formula Cr-aa tidak berbeda secara signifikan dan lebih tinggi dibanding kontrol Cr-Pic, dan berbeda signifikan dengan kontrol.

2. Hasil Pengamatan pada parameter histopatologi organ

Uji pre-klinik Cr-glu dengan dosis 50, 150, dan 300 µg/hari sebagai suplemen hipoglikemik juga dapat dilihat dari analisis histopatologi organ hati dan ginjal. Pengaruh perlakuan Cr-glu dengan dosis 50, 150, dan 300 µg/hari dapat dilihat dari gambaran histopatologi hepar dan ginjal tikus yang sebelumnya telah diinduksi diabetes mellitus tipe 2 dengan injeksi Nicotinamide Streptozotocin (STZ). Diabetes mellitus tipe 2 (DM 2) diketahui meningkatkan risiko kerusakan hepar terutama dalam bentuk perlemakan hati non alkoholik (*Non Alcoholic Fatty Liver*) dan nefropati diabetik.

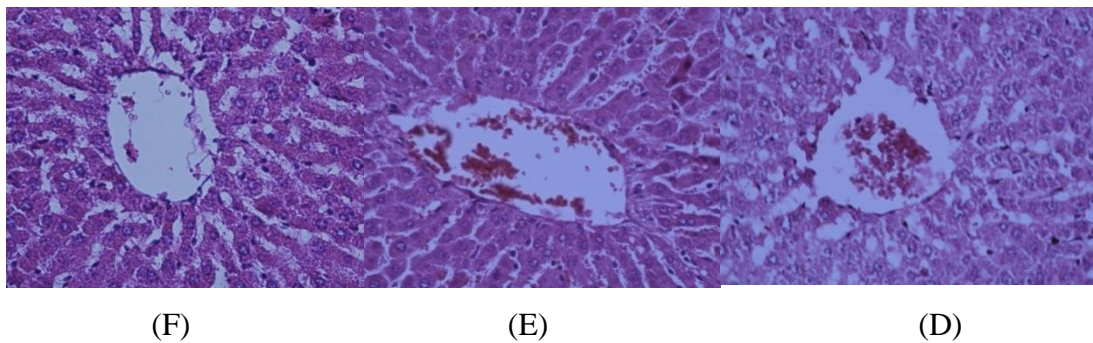
2.1. Histopatologi hepar

Pada hepar pengamatan dilakukan pada sel hepatosit, lobulus hati dan vena centralis. Parameter yang diamati adalah ada-tidaknya jaringan yang mengalami degenerasi, nekrosis, serta anastomose hepatosit terhadap sinusoid. Perbandingan gambaran histopatologi organ hepar dapat dilihat pada tabel 5.2 dan gambar 5.3 – 5.5.

Tabel 5.2. Perubahan Histopatologi Hati (Hepar)

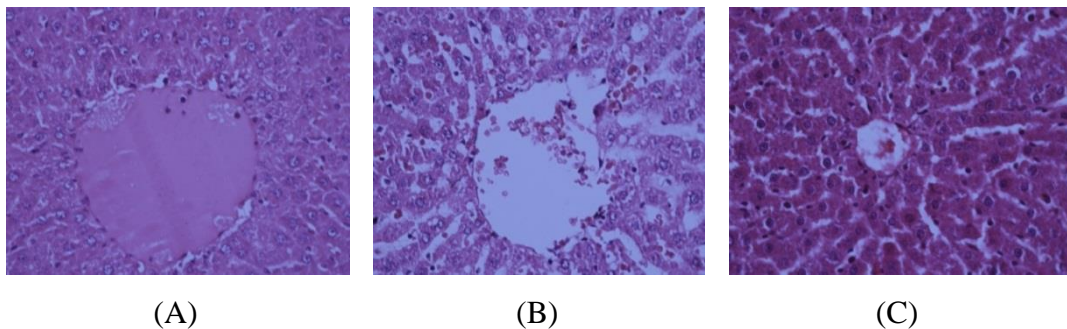
| Kode | Kelompok | SEL HATI | SINUSOID | Vena Sentralis | Keterangan |
|------|------------------------|---|---|---|--|
| A | DM+Cr-Glu (50µg/hari) | Perlemakan sel hati, sebum sel radang, <i>ballooning</i> , degenerasi dan nekrosis minimal | Rapat dengan infiltrasi lemak minimal | Melebar, kerusakan endotel minimal, tidak ada tanda perdarahan | Gambaran steatohepatitis |
| B | DM+Cr-Glu (150µg/hari) | Degenerasi dan nekrosis cukup berat, steatosis berat dengan sedikit <i>ballooning</i> dan minimal perdarahan. | Sangat merenggang dengan infiltrasi lemak | Kerusakan endotel cukup parah, diameter sedikit melebar, tanda perdarahan relatif tidak ada | Gambaran degenerasi dan nekrosis cukup nyata |
| C | DM+Cr-Glu (300µg/hari) | | Sedikit renggang | Diameter vena centralis dalam batas normal, tidak ada kerusakan endotel, sedikit tanda perdarahan | Gambaran peradangan hati ringan |
| D | DM+Cr-Pic | Jaringan | Sangat | Diameter | Gambaran |

| | | | | | |
|---|--|---|--|--|--|
| | (200µg/hari) Sesuai saran penyajian | relatif rusak dengan degenerasi, nekrosis, steatosis | merenggang dengan infiltrasi lemak | vena centralis dalam batas normal dengan kerusakan endotel dan tanda perdarahan | degenerasi dan kerusakan hati |
| E | DM+Glibenklamid (1,89 mg/kgBB) | Tersusun radier, batas masih cukup jelas, steatosis minimal, ballooning ada minimal, sebulan sel radang tidak ada | Sedikit merenggang, infiltrasi lemak sangat sedikit, didapatkan tanda perdarahan minimal | Diameter vena centralis melebar, ada tanda perdarahan, kerusakan endotel relatif tidak ada | Gambaran steatohepatitis minimal |
| F | DM | Vakuola lemak, sel hati membengkak (<i>ballooning</i>), sebulan sel-sel radang | Merenggang, infiltrasi lemak, kongesti minimal, perdarahan minimal | Diameter dalam batas normal, kerusakan endotel, tidak ada tanda perdarahan | Gambaran histopatologi steatohepatitis dan <i>ballooning</i> |
| G | Kontrol non DM | Ukuran normal, tersusun radier, inti normokrom, batas sel tegas | Rapat, tidak bengkak, tidak ada perdarahan | Ukuran normal, tidak melebar, tidak ada gumpalan darah | Gambaran histopatologi dalam batas normal |



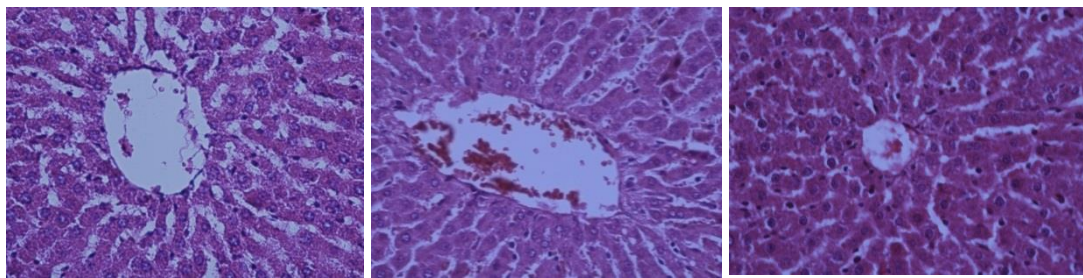
Gambar 5.3. Perbandingan histopatologi hepar terinduksi DM tipe 2, berturut-turut dari sebelah kiri kelompok kontrol DM (F), kelompok DM dengan glibenklamid (E) dan kelompok DM dengan Cr-pic (D). Perbesaran mikroskop 400x.

Gambar F merupakan gambaran histopatologi hati tikus DM dengan induksi nicotinamide-STZ. Tampak gambaran steatohepatitis yaitu perlemakan hepatosit dan inflamasi (peradangan) yang dapat dilihat dari sebaran sel-sel radang seperti netrofil, limfosit dan makrofag. Juga terlihat pembengkakan hepatosit yang dinamakan "*ballooning*". Diameter vena centralis tampak standar namun dijumpai kerusakan endotel walau tidak ada tanda perdarahan. Gambar E merupakan gambaran histopatologi hati tikus DM yang diberi perlakuan glibenklamid (salah satu terapi DM yang bertujuan meningkatkan produksi insulin pankreas). Terlihat sinusoid sudah lebih rapat daripada kelompok DM, perlemakan hepatosit minimal, dan masih dijumpai beberapa *ballooning* atau sel hati yang membengkak. Sebaran sel-sel radang lebih sedikit daripada kelompok DM namun dijumpai tanda perdarahan. Vena centralis tampak sedikit lebih lebar dan tampak adanya perdarahan walau kerusakan endotel vena minimal. Gambar D merupakan gambaran histopatologi kelompok DM dengan perlakuan Cr-Pi (dosis 200 µg/hari). Tampak gambaran kerusakan jaringan hati yang lebih parah dari kelompok kontrol DM dan kelompok DM-Glibenklamid. Terdapat perlemakan hepatosit, degenerasi dan nekrosis, serta sel hati yang membengkak (*ballooning*) namun sebaran sel radang minimal. Diameter vena centralis dalam batas normal dengan kerusakan endotel sedang dan tanda perdarahan.



Gambar 5.4. Perbandingan histopatologi hepar tikus terinduksi DM yang diberi perlakuan Cr-Glu dosis bertingkat, berturut-turut dari sebelah kiri yaitu Cr-Glu 50 $\mu\text{g/hari}$ (A), Cr-Glu 150 $\mu\text{g/hari}$ (B) dan Cr-Glu 300 $\mu\text{g/hari}$ (C). Perbesaran mikroskop 400x.

Gambar 5.4. (A), (B) dan (C) merupakan gambaran histopatologi hepar tikus kelompok DM dengan perlakuan Cr-Glu dosis bertingkat (50, 150 dan 300 $\mu\text{g/hari}$). Dari perbandingan ketiga gambar tersebut tampak susunan sel hati paling rapat adalah gambar A disusul C dan B. Gambaran steatosis yang paling berat adalah gambar B disusul A dan C. Gambaran inflamasi dengan perdarahan minimal dan sedikit sebaran sel-sel radang sedangkan gambar A tampak nyata gambaran *ballooning* dengan degenerasi dan nekrosis. Gambar B menunjukkan degenerasi dan nekrosis yang paling berat disertai perdarahan dibanding gambar A dan C. Sinusoid yang paling renggang dapat dilihat pada gambar B disusul gambar A lalu C. Demikian juga halnya dengan gambaran vena centralis dengan kerusakan endotel yang paling berat dapat dilihat pada gambar B. Gambar A tampak diameter vena centralis melebar namun kerusakan endotel minimal dan tidak ada tanda perdarahan, sedangkan Gambar C menunjukkan ukuran diameter vena centralis normal tanpa kerusakan endotel walau ada sedikit tanda perdarahan.



(F)

(E)

(C)

Gambar 5.5. Perbandingan histopatologi hepar tikus terinduksi DM antara kelompok kontrol DM (F), kelompok DM dengan glibenklamid (E) dan kelompok DM dengan perlakuan Cr-Glu dosis 300 µg/hari. Perbesaran mikroskop 400x.

Pengaruh perlakuan Cr-Glu terhadap gambaran histopatologi hepar tikus DM (C) dapat dilihat melalui perbandingannya dengan kelompok terinduksi DM (F) dan dengan perlakuan terapi glibenklamid (E) seperti yang ditunjukkan oleh Gambar 5.5 Secara umum susunan hepatosit pada kelompok DM+glibenklamid (E) yang paling rapi dengan gambaran pola radier dan batas sel yang jelas. Namun, gambaran steatosis seperti perlemakan hepatosit, *ballooning*, infiltrasi lemak dan sinusoid yang merenggang pada kelompok DM+glibenklamid (E) lebih terlihat nyata daripada kelompok Cr-Glu (C) walaupun sudah lebih baik daripada kelompok DM (F). Diameter vena centralis kelompok Cr-Glu (C) menunjukkan gambaran histopatologi yang lebih mendekati normal daripada kelompok DM (F) dan kelompok DM+glibenklamid (E) yaitu tidak mengalami pelebaran dan kerusakan endotel walau ada tanda perdarahan namun hanya minimal. Gambaran degenerasi dan nekrosis hepatosit pada kelompok Cr-Glu menunjukkan relatif paling ringan dibandingkan kelompok kontrol DM (F) dan kelompok DM+glibenklamid (E). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa perlakuan Cr-Glu dosis 300 µg/hari menunjukkan gambaran histopatologi hepar yang lebih baik daripada kelompok DM dan kelompok kontrol DM dengan glibenklamid.

2.2. Histopatologi Ginjal

Diabetes nefropati adalah komplikasi mikro dan makrovaskuler dari diabetes mellitus. Diabetes nefropati yang selanjutnya disingkat DN adalah salah satu komplikasi mikrovaskuler yang serius. Diabetes nefropati terjadi karena adanya *Acute Kidney Injury* (AKI) merupakan keadaan yang disebabkan oleh gangguan oksigen dan nutrisi dari nefron. Gangguan awal pada jaringan ginjal sebagai dasar terjadinya nefropati adalah terjadinya proses hiperfiltrasi-hiperperfusi membran basal glomeruli.

Gambaran histologi jaringan pada ND memperlihatkan adanya penebalan membran basal glomerulus, ekspansi mesangial glomerulus yang akhirnya menyebabkan glomerulosklerosis, hyalinosis arteri eferen dan eferen serta fibrosis tubulo interstitial. Bagian yang diamati pada ginjal adalah struktur kapsula Bowman dan tubulus proximal yang ada pada bagian korteks ginjal. Pengamatan dilakukan terhadap ada tidaknya penebalan pada membran basalis kapsula bowmani dan sel-sel nekrosis pada glomerulus. Pada tubulus proksimal, parameter yang diamati adalah adanya nekrosis,, fibrosis dan terjadinya edema.

Gambaran hispatologi ginjal tikus percobaan dalam penelitian ini dijabarkan pada tabel 5.3 dan gambar 5.6-5.11.

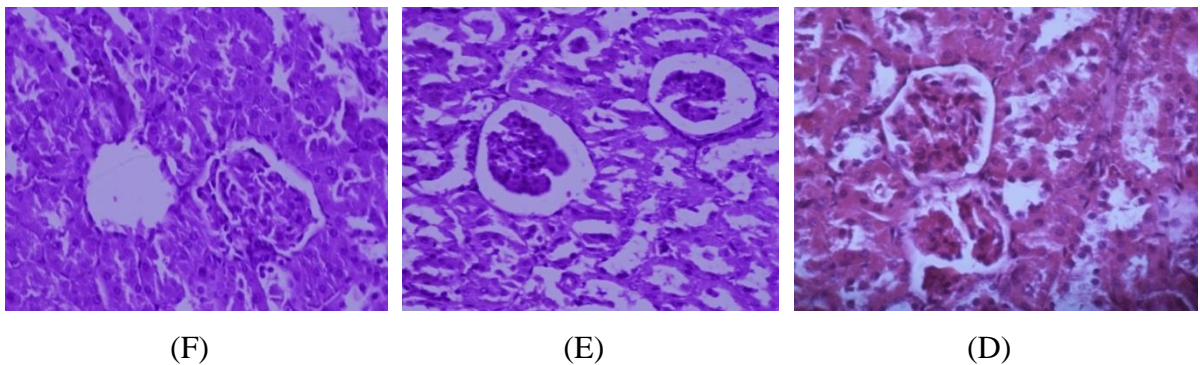
Tabel 5.3. Diskripsi histopatologi ginjal

| Kode | Kelompok | Glomerulus | Tubulus | Keterangan |
|------|--------------------------|---|--|---|
| A | DM+Cr-Glu (50µg/hari) | Glomerulosklerosis jarang ditemukan, penebalan membran basalis minimal, tidak ditemukan hyalinosis, ditemukan kongesti (perdarahan) | Kerusakan sel epitel tubulus proksimal ditandai dengan nekrosis dan batas sel yang tidak jelas, terdapat tubulus <i>cast</i> , | nekrosis tubular akut dan glomerulonefritis |

| | | | | |
|---|---------------------------|--|--|---|
| | | | didapatkan tanda peradangan dengan sebukun sel radang. | |
| B | DM+Cr-Glu (150µg/hari) | Glomerulosklerosi s sedang sampai berat dengan nekrosis dan degenerasi, penebalan membran basalis, tidak tampak hyalinosis, tidak tampak tanda kongesti atau peradangan | Kerusakan tubulus sedang dengan degenerasi dan nekrosis multifokal, didapatkan tanda peradangan dengan sebukun sel radang | Glomerulosklerosi s dan nekrosis tubular subakut |
| C | DM+Cr-Glu (300c) | Glomerulosklerosi s ringan sampai sedang, penebalan membran basalis minimal, terdapat hyalinosis ringan, terdapat peradangan dengan perdarahan dan sebukun sel radang | Kerusakan tubulus ringan sampai sedang, sel epitel tubulus batas masih tampak tegas walau membengkak , terdapat tanda degenerasi ringan, dengan perdarahan namun tidak didapatkan nekrosis, tubular <i>cast</i> minimal. | Glomerulosklerosi s ringan-sedang dan nekrosis tubular akut ringan |

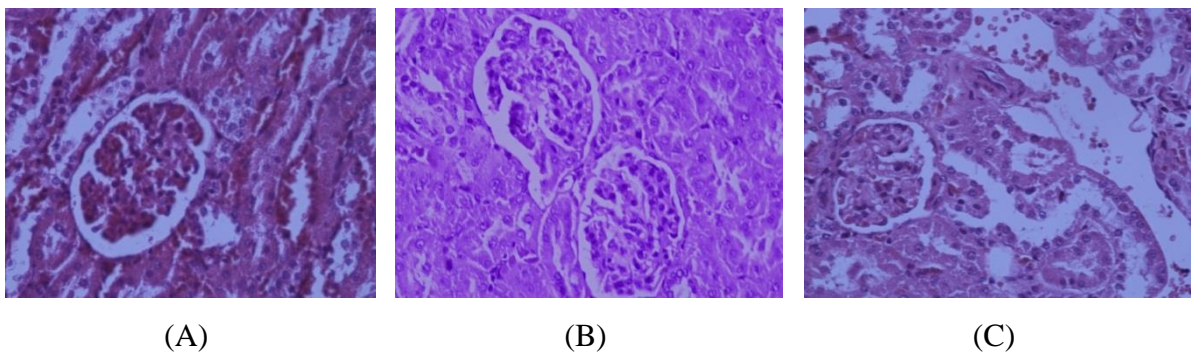
| | | | | |
|---|---|---|--|--|
| D | DM+Cr-Pic 200 µg/hari Sesuai saran penyajian | Glomerulosklerosis ringan, terdapat penebalan membran basalis, peradangan dengan sebulan sel radang, tidak didapatkan hyalinosi. | Kerusakan tubulus minimal, walau terdapat degenerasi dan nekrosis namun sangat ringan, batas sel epitel tubulus masih tampak jelas dan beraturan, sedikit peradangan dan tubular <i>cast</i> | Glomerulosklerosis ringan dan nekrosis tubular akut ringan |
| E | DM+Glibenklamid (1,89 mg/kgBB) | Sebagian besar glomerulus dalam batas normal, terdapat kongesti (peradangan) dengan sedikit sebulan sel radang, nekrosis dan degenerasi minimal | Kerusakan tubulus ditandai dengan degenerasi dan nekrosis serta peradangan, ditemukan sebulan sel radang dan tubular <i>cast</i> | Glomerulonefritis akut ringan |
| F | DM | Glomerulosklerosis derajat sedang dengan penebalan membran basalis, degenerasi multifokal, hyalinosi dan nekrosis minimal | Kerusakan tubulus ditandai dengan degenerasi hidropik, nekrosis dan batas sel epitel yang | Glomerulosklerosis sedang-berat dengan nekrosis tubular akut berat |

| | | | | |
|---|----------------|---|---|---|
| | | | tidak beraturan. | |
| G | Kontrol non DM | Glomerulus ukuran dalam batas normal, tidak didapatkan penebalan membran basalis, glomerulosklerosis sangat sedikit tidak ada hyalinosis, degenerasi dan nekrosis tidak ada | Tubulus proksimal bentuk dan ukuran normal dengan batas antara sel epitel tampak tegas, sedikit peradangan tanpa sebulan sel radang, sedikit perdarahan | Glomerulus dan tubulus dalam batas normal |



Gambar 5.6. Perbandingan histopatologi glomerulus ginjal kelompok kontrol DM (F) dengan kelompok DM+glibenklamid (E) dan kelompok DM+Cr-Pic (D). Perbesaran mikroskop 400x.

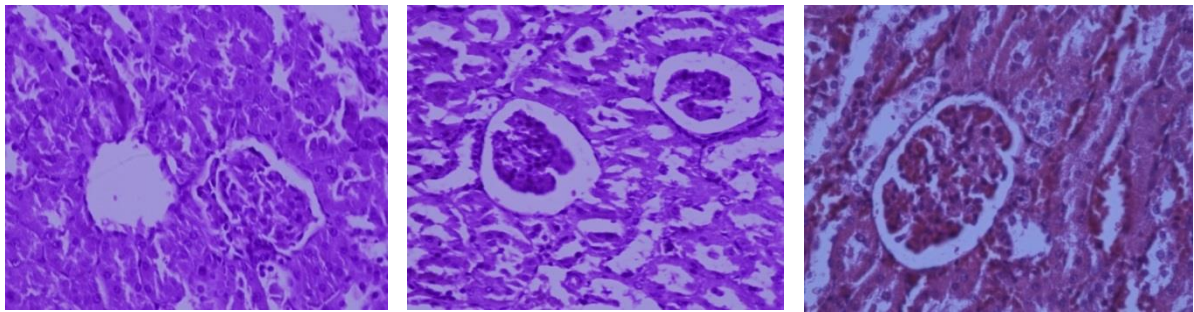
Pada gambar 5.6 tampak kelompok DM+glibenklamid (E) memiliki gambaran histopatologi glomerulus yang paling baik tanpa adanya glomerulosklerosis disusul kelompok DM+Cr-Pic (D) dengan glomerulosklerosis ringan disertai sedikit fibrosis. Glomerulosklerosis sedang sampai berat tampak nyata pada kelompok DM (F). Peradangan tampak nyata pada kelompok DM+Cr-Pic namun degenerasi sampai nekrosis paling parah terlihat pada kelompok DM (F).



Gambar 5.7 Perbandingan histopatologi glomerulus ginjal kelompok DM dengan perlakuan Cr-Glu dosis bertingkat 50 (A), 150 (B) dan 300 (C) µg/ hari. Perbesaran mikroskop 400x.

Gambar 5.7 diatas menunjukkan pengaruh dosis perlakuan Cr-Glu terhadap histopatologi glomerulus DM. Gambaran glomerulosklerosis, salah satu tanda nefropati diabetik awal, tampak nyata pada kelompok DM+Cr-Glu 150 µg/hari (B) sedangkan

glomerulus paling mendekati normal tampak pada kelompok DM+Cr-Glu 50 μ g/hari (A). Namun, tanda peradangan seperti perdarahan, kongesti dan sebaran sel radang lebih terlihat nyata pada kelompok DM+Cr-Glu 50 μ g/hari (A) daripada kelompok lainnya.



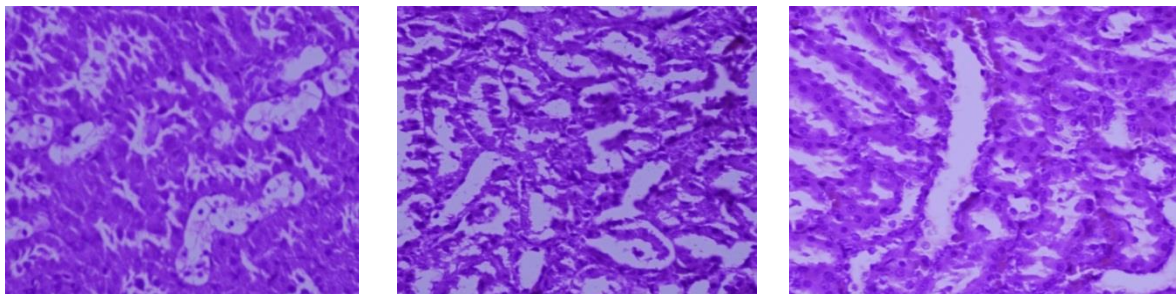
(F)

(E)

(A)

Gambar 5.8. Perbandingan histopatologi glomerulus ginjal kelompok kontrol DM (F) dengan kelompok DM+Glibenklamid (E) dan kelompok DM+Cr-Glu dosis 50 μ g/ hari (A). Perbesaran mikroskop 400x.

Perbedaan pengaruh perlakuan Cr-Glu dibandingkan dengan kontrol DM dan kelompok DM yang diberi terapi standar glibenklamid dapat dilihat pada Gambar 5.8. Gambaran perbaikan glomerulosklerosis terlihat lebih baik pada perlakuan Cr-Glu daripada glibenklamid. Selain itu gambaran nekrosis dan degenerasi pada kelompok Cr-Glu juga terlihat paling minimal daripada kelompok DM maupun kelompok DM+glibenklamid. Namun, tanda peradangan seperti kongesti, perdarahan dan sebaran sel radang tampak terlihat lebih jelas pada kelompok Cr-Glu daripada kelompok DM+glibenklamid.



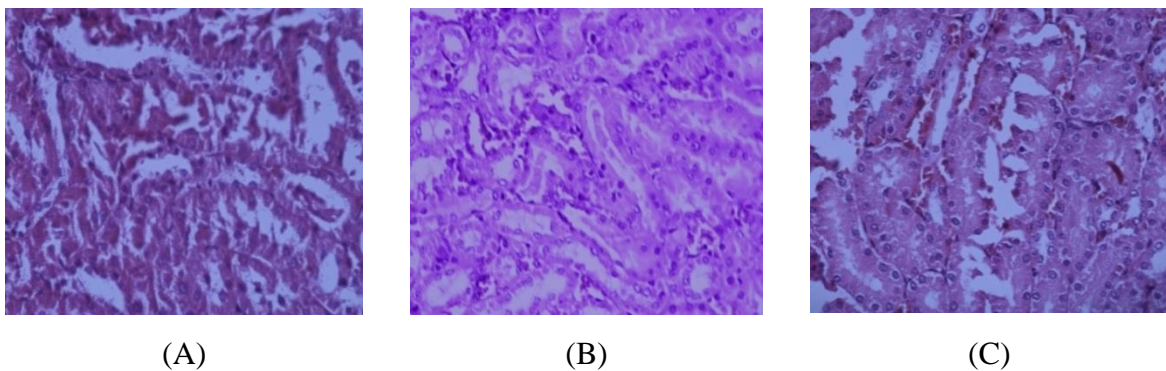
(F)

(E)

(D)

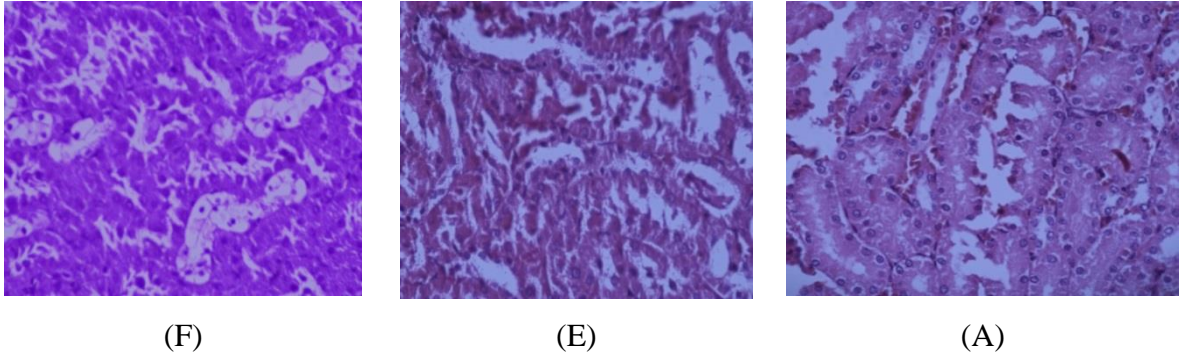
Gambar 5.9. Perbandingan histopatologi tubulus proksimal ginjal kelompok DM (F) dengan kelompok DM+glibenklamid (E) dan kelompok DM+Cr-Pic (D). Perbesaran mikroskop 400x.

Nekrosis tubular akut merupakan salah satu tanda awal terjadinya nefropati diabetik. Gambar 5.9 menunjukkan kerusakan tubulus paling parah dengan degenerasi dan nekrosis pada kelompok DM namun tidak terlihat perbaikan signifikan pada kelompok DM yang diterapi glibenklamid. Gambaran tubulus proksimal yang terlihat paling baik dengan degenerasi dan nekrosis minimal terlihat pada kelompok DM dengan perlakuan Cr-Pic (D).



Gambar 5.10. Perbandingan histopatologi tubulus proksimal ginjal kelompok DM dengan perlakuan Cr-Glu dosis bertingkat 50 (A), 150 (B) dan 300 (C) µg/ hari. Perbesaran mikroskop 400x.

Pengaruh perbedaan dosis perlakuan Cr-Glu pada tubulus proksimal ginjal tikus DM dapat dilihat pada Gambar 5.10. Gambaran nekrosis tubulus dengan tubular cast, perdarahan dan peradangan terlihat nyata pada perlakuan dosis terendah yaitu 50 µg/ hari. Gambaran tubulus proksimal yang terlihat paling baik di antara ketiganya adalah perlakuan dosis tertinggi yaitu 300 µg/ hari walau masih didapati tanda peradangan.



Gambar 5.11. Perbandingan histopatologi tubulus proksimal ginjal kelompok DM (F) dengan kelompok DM+Glibenklamid (E) dan kelompok DM+Cr-Glu dosis 300 μ g/ hari (A). Perbesaran mikroskop 400x.

Pengaruh perlakuan Cr-Glu dibandingkan terapi standar DM, glibenklamid, terhadap perbaikan nekrosis tubular akut pada ginjal tikus DM dapat dilihat pada Gambar 5.11. Terlihat perlakuan Cr-Glu pada ginjal tikus DM memiliki gambaran histopatologi tubulus proksimal yang lebih baik daripada tubulus kelompok DM+glibenklamid dan kelompok DM. Kelompok Cr-Glu memiliki tingkat degenerasi dan nekrosis yang paling ringan walaupun masih terdapat sedikit kongesti dan perdarahan.

Dari penggambaran histopatologi yang telah diuraikan menunjukkan adanya sejumlah kerusakan pada organ hati dan ginjal pada individu penyandang DM. Pada kelompok tikus yang diberi suplemen terjadi regenerasi sel dan kerusakan yang lebih sedikit. Pada penelitian selanjutnya sangat diperlukan pengamatan yang lebih mendalam terhadap pengaruh dosis pemberian sampel suplemen Cr-glu.

BAB VI

RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

A. Rangkuman Tahapan Penelitian

Secara ringkas, penelitian ini terbagi dalam 3 tahapan. Tahap pertama adalah uji aktivitas hipoglikemia dan uji pre klinik tahap I meliputi uji aktivitas hipoglikemia dengan parameter perubahan kadar glukosa darah dan gambaran histologi organ. Target dari penelitian Tahun I adalah mengetahui potensi hipoglikemik dan range dosis yang optimal.

Penelitian tahap kedua (untuk tahun ke II) adalah uji pre klinik tahap 2 yaitu uji toksisitas dan uji aspek farmasetika yang meliputi formulasi bahan sediaan, standarisasi, stabilitas dan bentuk sediaan *nutraceutical product*. Target tahun ke II adalah prototipe produk suplemen yang akan diujikan pada responden. Uraian terperinci cara kerja penelitian Tahun II akan disajikan dalam proposal tahun ke II.

B. Penelitian pada tahap berikutnya

Hasil penelitian tahun I menjadi dasar untuk penelitian tahun kedua, berupa uji toksisitas akut dan kronik produk yang dihasilkan, parameter fungsi ginjal (nilai SGOT/SGPT, ureum dan kreatinin), serta pengembangan suplemen diabetes dalam bentuk biskuit melalui upaya fortifikasi.

Hal ini telah diawali dari hasil penelitian pada tahap ini yang secara biokimiawi telah menunjukkan hasil aktivitas penurunan kadar gula darah yang signifikan. Selain parameter biokimiawi, gambaran histopatologi hepar menunjukkan perlakuan Cr-Glu memiliki gambaran steatohepatitis yang lebih baik dibandingkan kelompok DM maupun kelompok DM+glibenklamid dan kelompok DM+Cr-Pic. Dosis yang lebih baik dalam perbaikan kerusakan hepar karena DM adalah 300 µg/ hari namun perlu dipertimbangkan efek toksisitas akutnya mengingat perlakuan dengan dosis tersebut juga berpotensi menyebabkan inflamasi (peradangan).

Gambaran histopatologi ginjal juga menunjukkan perlakuan Cr-Glu memberikan perbaikan glomerulosklerosis dan nekrosis tubular akut pada ginjal DM daripada terapi glibenklamid maupun perlakuan Cr-Pic. Namun, terdapat perbedaan dalam rekomendasi

dosis untuk perbaikan glomerulus maupun tubulus. Gambaran glomerulus yang lebih baik didapatkan pada perlakuan Cr-Glu dengan dosis terendah yaitu 50 µg/ hari namun kondisi tubulus proksimal yang lebih baik diperoleh pada pemberian dosis tertinggi yaitu 300 µg/ hari. Dikarenakan dosis Cr-Glu 150 tidak memberikan pengaruh yang cukup nyata pada perbaikan kondisi DM maka rentang dosis yang perlu diperhatikan pada penelitian selanjutnya adalah antara 200-300 µg/ hari dengan catatan perlu juga dilakukan penelitian terhadap toksisitas akut dosis tertinggi Cr-Glu yaitu dosis 300 µg/ hari.

Pada tahap berikutnya (tahun ke-III) dapat dilaksanakan uji klinik RCT- (*randomized clinical trial*). Penelitian tahap ketiga (untuk tahun ke III) adalah uji klinik 3 fase. Target tahun ke III adalah potensi HAKI, produk siap diujicobakan ke masyarakat dan dapat dipresentasikan ke pihak industri *nutraceutical product*. Rencana Kerja Penelitian Tahun ke III antara lain berupa aplikasi pembuatan produk yang mengandung bahan aktif Cr(III)-asam amino (dalam hal ini Cr-glu) dan dilanjutkan dengan penerapan pada responden. Uraian terperinci cara kerja penelitian Tahun III akan disajikan dalam proposal tahun ke III.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Aplikasi kompleks Cr-AA ($[\text{Cr}(\mu\text{-OH})(\text{glu})(\text{OH})_2]_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) pada tikus wistar terinduksi Nicotinamide-Sreptozotocin menunjukkan pengaruh yang signifikan pada penurunan kadar gula darah. Persen *glucose lowering* (%GL) tertinggi pada penelitian ini dapat mencapai 80,46%.
2. Pengamatan histopatologi menunjukkan adanya sejumlah kerusakan pada organ hati dan ginjal pada individu penyandang DM. Pada kelompok tikus yang diberi suplemen terjadi regenerasi sel dan kerusakan yang lebih sedikit.
3. Hasil pengujian pre klinik tersebut memberikan peluang yang besar untuk menjadikan senyawa tersebut sebagai bahan nutraceutical bagi penyandang diabetes tipe 2.

B. Saran

Berdasarkan hasil penelitian terhadap parameter kadar glukosa darah dan histopatologi, disarankan untuk memperhatikan dosis asupan (dalam hal ini sekitar 200-300 μg /hari) dan mempelajari sifat toksisitas akut-kronik.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson R.A., 2000, Chromium and the Prevention and Control Of Diabetes *Diabetes & Metabolism*, vol.26, p. 22-27.
- Allenzi FQ., Effect of Nicotinamide on Experimental Induced Diabetes, Iran J. Allergy Asthma Immunol, 2009;8 (1):11-18.
- Astiyandani, PG., Gd. Angga Permana A. W., Putu Diah Vedayanti, Cok. Istri Devi Larayanthi, Made Prani Windasari dan I.A. Ika Wahyuniari, 2010, Uji Klinis In Vivo Pengaruh Konsumsi Dalaman (*Cycllea Barbata*) Terhadap Penurunan Kadar Gula Darah Pada Tikus Wistar Jantan Dengan Diabetes Mellitus Tipe 2, *IPTEKMA*, Volume 2 No.1, 01-04, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana, Indonesia.
- Are, PC., Adidala, RR., Puchchakayala, G., hypoglycemic and Antidiabetic Activity of Glocidion velutinum on streptozotocin-nicotinamide Induced Type2 Diabetic rats, *Eur. J. Biol.Sci*, 2011, 3(4); 126-130.
- Bryan, RF., Greene P.T., Stokely, P.F., Wilson, E.W., 1971, *J. Inorg. Chem*, vol.10, no.7, 1468-1473.
- Boghchi, D., Stohs, SJ., Downs, BW., 2002, Cytotoxicity and Oxidative Mechanism of Different Forms of Chromium, *Toxicology*, No. 180 (1), p. 5-22.
- Budiasih, KS., C.Anwar, S.J.Santosa, H.Ismail, Synthesis and Characterization of Chromium (III) Complexes with L-Glutamic Acid, Glycine and L-Cysteine, *World Academy of Science Engineering & Technology (Waset) Journal*, 2013: 78, pp 1095-1909.
- Budiasih, KS., C.Anwar, S.J.Santosa, H.Ismail,, Development of the Synthesis of Chromium and Molybdenum – Amino acid Complexes: A Green Chemistry Approach, *Advanced Materials Research Vol. 1101 (2015) pp 276-279*
- Calafat, A.M., Fiol, J.J., Terron, A., Moreno, V., Goodgame, D.M.L., Hussain, I., 1990, Ternary Chromium (III) –Nucleotide-Amino Acid Complexes: L-Methionine, L-Serine and Glycine Derivatives, *Inorg. Chim. Acta*, 169, 133-139.
- Dureja, H., Kaushik, D., Kumar, V., Development In Nutraceuticals, *Indian Journal Of Pharmacology*, 2003., 35: 363-372
- Etuk, EU., Animals Models for studying Diabetes mellitus, *Agric. Bio. J. of. N. Am.*, 2010:1 (2), 130-134.
- Guindy NM., Abou Gamra Z.M., Abdel Messih M.F., 2000, Kinetic Studies on the Complexation of Chromium(III) with some Amino Acids in Aqueous Acidic Medium, *Monatshefte fur Chemie*, 131, 857-866.
- Hepburn, D.D., Burney, J.M., Woski, K., Vincent, J.B., 2003, The Nutritional Supplement Chromium Picolinate Generates Oxidative DNA Damage And Peroxidized Lipids In Vivo, [*Polyhedron*, Vol. 22, Issue 3](#), pp.455-463
- Ibrahim, SS., Rizk, SF., Nicotinamide, A Cytoprotectant against streptozotocin induced diabetic damage in wistar rats brains, *Afr.J. Biochem.Res*, 2008, 2 (8), pp.174-180. *Journal of Environmental Studies* Vol. 10, No. 6 (2001), 399-404.
- Krejpcio, Z., 2001, Essentiality of Chromium for Human Nutrition and Health, *Polish J. of Environ. Studies* Vol. 10, No. 6 (2001), 399-404.

- Malone, Rosette M. Roat, 2002, Metals In Medicine, *Bioinorganic Chemistry: A Short Course*. John Wiley & Sons, Inc., ISBN: 0-471-15976-X.
- Nedim, AA., Karan BZ., Öner R., Ünaleroğlu, C., Öner, C., 2003, Effects of Neutral, Cationic, and Anionic Chromium Ascorbate Complexes on Isolated Human Mitochondrial and Genomic DNA, *J. of Biochem. and Mol. Biol.* Vol. 36, No. 4, pp. 403-408.
- Ochiai, 2008, Bioinorganic Chemistry, John Willey & Sons, New York.
- Park, S.J., Choi Y.K., Han S.S., Lee, K.W., 1999, Sharp Line Electronic Spectroscopy And Ligand Analysis Of Cr(III) Complexes With Amino Acid Ligands, *Bull Korean Chem Soc. Bull. Korean Chem. Soc.*, Vol. 20, No. 12, 1475-1478.
- Pranoto, A., Sutjahjo, A., Tjokroprawiro, A., Murtiwi, S., Wibisono, S., 2011, Konsensus Pengelolaan Dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 Di Indonesia 2011, LPPM, Universitas Airlangga, Surabaya
- Rasuljan, M., & Al-Rashid, H., 1989, Preparation And Infrared Studies Of Hydroxyl Bridged Chromium (III) Complexes Of L Glutamic Acid, *Jour. Chem. Soc. Pak*, vol. 11, no. 1.
- Selcuk MY., Aygen B., Dogukan A., Tuzcu Z., Akdemir F., Komorowski J., Atalay M., Sahin K., 2012, Chromium Picolinate and Chromium Histidinate Protects Against Renal Dysfunction By Modulation Of NF- κ B pathway in high-fat diet fed and Streptozotocin-induced diabetic rats, *Nutrition & Metabolism*, Vol 9:30.
- Sharma, M. Siddique, M.W., Shamim, A.M., Gyanesh, ., and K.K. Pillai, 2011., Evaluation of Antidiabetic and Antioxidant Effects of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) in Streptozotocin-Nicotinamide Induced Diabetic Rats, *The Open Conference Proceedings Journal*, 2, 53-58.
- Shirwaikar, A., Rajendran K., Kumar C.D., Bodla R., 2004, Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin-nicotinamide type 2 diabetic rats, *J. Of. Ethnopharmacology* : 91 : 171-175.
- Vincent, J.B., (ed), 2007, A history of Chromium Studies (1955–1995), *The Nutritional Biochemistry of Chromium(III)*, Elsevier, New York.
- WHO, Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications,, *Report of a WHO Consultation* World Health Organization, Department of Non communicable Disease Surveillance, 1999, Geneva.
- Yang, X.P., Kamalakannan P., Allyn C. Ontko, M.N.A. Rao, Cindy, X.F., Rena, J., Sreejayan, N., 2005, A Newly Synthetic Chromium Complex Chromium(Phenylalanine)₃ improves Insulin Responsiveness and Reduces Whole Body Glucose Tolerance, *FEBS Letters* 579, p.1458–1464

LAMPIRAN

Lampiran 1 Instrumen Penelitian

| No | Sarana/prasarana | Kondisi | Keterangan/alternatif |
|----|--------------------------------|-------------------|---|
| 1 | Laboratorium preparasi | Tersedia | Lab Kimia FMIPA UNY |
| 2 | Spektrofotometer Uv Vis | Tersedia | Lab Kimia FMIPA UNY |
| 3 | Spektrofotometer Inframerah | Tidak Tersedia | UGM |
| 4 | Elemental Analysis | Tidak Tersedia | Univ. Kebangsaan Malaysia |
| 5 | Animal House | Tersedia | Jurdik Biologi FMIPA UNY |
| 6 | Pembuatan Preparat | Tersedia | Lab Histologi dan Mikroskopik Anatomi Jurdik Biologi FMIPA UNY |
| 7 | Mikroskop dan software digital | Tersedia | Lab Zoologi Jurdik Biologi FMIPA UNY |

Lampiran 2. Organisasi Tim Peneliti

| No | Nama/NIDN | Instansi | Bidang Ilmu | Alokasi | Uraian Tugas |
|----|---|--------------------------|--------------------------|---------------|--|
| 1 | Dr. Kun Sri Budiasih /0002027213 | Jurdik Kimia FMIPA UN Y | Kimia Anorganik | 10jam/minggu | <ol style="list-style-type: none"> 1. Penyusunan proposal 2. Sintesis kompleks Cr(III) (II) - asam amino. 3. Perlakuan/suplementasi 4. Pengolahan data 5. Penyusunan manuskrip/laporan. |
| 2 | dr. Kartika Ratna Pertiwi, M.Biomed.Sc | Jurdik Biologi FMIPA UNY | Biologi Manusia dan Gizi | 8 jam /minggu | <ol style="list-style-type: none"> 1. Penyusunan proposal 2. Uji histologi 3. Pengolahan data. 4. Penyusunan manuskrip/laporan |

Lampiran 3 PUBLIKASI

**Makalah publikasi (terlampir) juga dapat diakses pada proceeding online
2nd International Conference ICB Pharma Universitas Muhammadiyah
Surakarta, 31 Oktober 2015**

Di alamat :

<https://publikasiilmiah.ums.ac.id/handle/11617/6190>