

**EFEK PEMBERIAN MINYAK ZAITUN (*Olea europaea*) TERHADAP KADAR
HIDROGEN PEROKSIDA PADA TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*)
YANG DIINDUKSI ALOKSAN**



Skripsi

**Diajukan ke Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Sebagai Pemenuhan
Salah Satu Syarat Untuk Mendapatkan Gelar Sarjana Kedokteran**

Oleh:

Yorencia Akmal

NIM. 1910313040

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG**

2024

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar dan bukan merupakan plagiat

NAMA : Yorencia Akmal

NIM : 1910313040

Tanda Tangan



Tanggal : 7 Mei 2024

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

Skripsi ini telah disetujui oleh :

Pembimbing I



dr. Husnil Kadri, M.Kes
NIP.197011262000121002

Pembimbing II



Dr. Almurdi, DMM, M.Kes.
NIP.196208231988111001

Disahkan Oleh :

Ketua Program Studi Kedokteran
Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

dr. Firdawati, M.Kes, Ph.D
NIP. 197207031999032002

Diketahui Oleh :

Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kemahasiswaan
Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

Dr. dr. Efrida, Sp.PK(K), M.Kes,
NIP. 197010021999032002

HALAMAN PENGESAHAN PENGUJI

Skripsi ini telah di uji dan di nilai oleh Tim Penguji
Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

Padang, 7 Mei 2024

Tim Penguji

Nama	Jabatan	Tanda Tangan
Prof. Dr. Ety Yerizel, M.S	Ketua	
Dr. dr. Roza Mulyana, Sp. PD, KGer, FINASIM	Sekretaris	
Dra. Erlina Rustam, M.S, Apt	Anggota 1	
dr. Husnil Kadri, M.Kes	Anggota 2	
Dr. Almurdi, DMM, M.Kes	Anggota 3	

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil`alamiin, puji syukur atas kehadiran Allah S.W.T dan Shalawat beserta salam untuk Nabi Muhammad S.A.W, berkat rahmat dan karuniaNya, penulis dapat menyelesaikan Skripsi dengan judul, **“Efek Pemberian Minyak Zaitun (*Olea Europaea*) Terhadap Kadar Hidrogen Peroksida Pada Tikus Wistar (*Rattus novergicus*) Yang Diinduksi Aloksan”**, yang merupakan salah syarat untuk mendapatkan gelar sarjana kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

Adapun dalam penyusunan Skripsi ini penulis mengalami berbagai kendala dan hambatan, namun berkat arahan, bantuan, bimbingan, serta doa dari berbagai pihak, akhirnya penulis dapat menyelesaikannya. Oleh karena itu, dengan setulus hati penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. dr. Afriwardi, S.H., M.A., Sp.KO, Sub Sp.APK selaku Dekan beserta Wakil Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.
2. dr. Husnil Kadri, M. Kes., sebagai pembimbing pertama yang telah memberikan arahan, bantuan dan membimbing untuk bisa menulis dengan baik, dan senantiasa memberi semangat, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan proposal penelitian tugas akhir ini.
3. Dr. Almurdi, MM, M.Kes., sebagai pembimbing kedua yang telah membimbing penulisan dan senantiasa memberi semangat, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan proposal penelitian tugas akhir ini.
4. Tim Penguji tugas akhir Prof. Dr. Ety Yerizel, M.S, Dr. dr. Roza Mulyana, Sp. PD, KGer, FINASIM, Dra. Erlina Rustam, M.S, Apt, yang telah memberikan masukan untuk menyempurnakan naskah proposal penelitian tugas akhir.
5. Prof. Dr. dr. Delmi Sulastri, MS, SpGK, sebagai dosen Pembimbing Akademik dan seluruh dosen pengajar di Fakultas Kedokteran yang selalu memberikan dukungan dan motivasi kepada penulis.
6. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, yang telah membantu melancarkan urusan administrasi.

7. Papa Drs. H. Syahrul Akmal, M.T dan Mama Prof. Dr. Dra. Hj. Yetria Rilda, M.S serta Abang Yomi Akmal, S.E, M.M, kerabat dan teman-teman yang memberikan dukungan doa, moral dan material untuk kesuksesan penulis.

Penulis berharap semoga Allah SWT senantiasa mencurahkan rahmat dan hidayahNya kepada semua pihak yang telah banyak membantu. Penulis menyadari bahwa Skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mohon saran dan kritik yang membangun untuk kesempurnaan proposal ini. Semoga proposal penelitian Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi penulis, dunia pendidikan, masyarakat luas, bangsa dan negara.



Padang, 7 Mei 2024

Penulis

ABSTRACT

By

**Yorencia Akmal, Husnil Kadri, Almurdi, Ety Yerizel, Roza Mulyana,
Erlina Rustam**

Objective: the Examine the effect of olive oil on ROS hydrogen peroxide levels that cause diabetes mellitus/hyperglycaemia in Wistar rats after being induced with the diabetogenic substance alloxan over a period of 14 days.. Hydrogen peroxide (H_2O_2) is one indicator of ROS (Reactive Oxygen Species) to determine the state of cell oxidative stress. The increase in ROS in the body is caused by an imbalance between ROS and anti-oxidant enzymes, so that triggers biological cell damage, including oxidation of carbohydrates, proteins, fats, DNA. Oxidation of β -pancreas cells causes a decrease in the sensitivity of cell tissue to insulin, so that blood glucose concentrations increase. Blood sugar levels ≥ 200 mg/dL indicate chronic diabetes mellitus or hyperglycaemia. Olive oil contains secondary metabolite compounds such as phenolic and can neutralise H_2O_2 in blood serum. **Methods:** This study used 24 male Wistar rats, and grouped into three groups, namely negative control (K-), positive control (K+) and treatment (P) with observation for 14 days. **Results:** from the results of statistical analysis based on the Mann Whitney test and Kruskal Wallis test, the average difference was obtained at $p \leq 0.05$. From the data analysis showed the effect of olive oil antioxidants in reducing H_2O_2 levels gave significantly different effects on each group, respectively, K (-) 4.838 mmol/L, K (+) 20.888 mmol/L and P 18.193 mmol/L. **Conclusion:** Olive oil administration has an effect on reducing hydrogen peroxide (H_2O_2) levels in hyperglycaemic Wistar rats.

Keywords: alloxan, hydrogen peroxide, hyperglycaemia, olive oil, wistar rats,



ABSTRAK

Oleh

Yorencia Akmal, Husnil Kadri, Almurdi, Ety Yerizel, Roza Mulyana, Erlina Rustam

Tujuan : menguji efek pemberian minyak zaitun terhadap kadar ROS Hidrogen peroksida yang menyebabkan penyakit diabetes melitus/hiperglikemia pada tikus wistar setelah diinduksi dengan zat diabetogenik aloksan selama rentang waktu 14 hari. Hidrogen peroksida (H_2O_2) merupakan salah satu indikator ROS (Reactive Oxygen Spesies) untuk menentukan keadaan stress oksidatif sel. Peningkatan ROS didalam tubuh disebabkan karena ketidak seimbangan antara ROS dan anti oksidan enzim, sehingga pemicu terjadi kerusakan sel biologis, antara lain oksidasi karbohidrat, protein, lemak, DNA. Oksidasi sel β -pancreas menyebabkan penurunan sensitivitas jaringan sel terhadap insulin, sehingga konsentrasi glukosa darah menjadi meningkat. Kadar gula darah ≥ 200 mg/dL diindikasikan mengalami diabetes melitus kronis atau hiperglikemia. Minyak zaitun memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder antara lain, fenolik dan dapat menetralkan H_2O_2 didalam serum darah. Metoda : penelitian ini menggunakan hewan coba tikus wistar jantan berjumlah 24 ekor, dan dikelompokkan dalam tiga kelompok yaitu kontrol negative (K-), kontrol positif (K+) dan perlakuan (P) dengan pengamatan selama 14 hari. Hasil : dari hasil analisis statistik berdasarkan uji *Mann Whitney* dan uji *Kruskal Wallis*, diperoleh perbedaan rata-rata sebesar $p \leq 0,05$. Dari analisis data menunjukkan efek pemberian antioksidan minyak zaitun dalam penurunan kadar H_2O_2 memberi efek berbeda secara signifikan pada setiap kelompok, masing-masingnya, K(-) 4,838 mmol/L, K(+) 20,888 mmol/L dan P 18,193 mmol/L. Kesimpulan : pemberian minyak zaitun berpengaruh terhadap penurunan kadar hydrogen peroksida (H_2O_2) pada tikus wistar hiperglikemia.

Kata Kunci: aloksan, hidrogen peroksida, hiperglikemia, minyak zaitun, tikus wistar



DAFTAR ISI

PERSETUJUAN SKRIPSI OLEH PEMBIMBING	ii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRACT	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Reaktif Oxygen Species (ROS).....	5
2.1.1 Sumber Radikal Bebas	6
2.2 Marker Stress Oksidatif.....	6
2.2.1 ROS dan Penyakit Diabetes Melitus	6
2.2.1.1 Diabetes Melitus	7
2.2.2 Aloksan.....	9
2.2.3 Obat Antidiabetes Komersial	10
2.2.4 Obat Antidiabetes Herbal	11
2.3 Antioksidan	11
2.3.1 Jenis - jenis Antioksidan.....	12
2.4 Tanaman Zaitun (<i>Olea europaea</i> L.).....	15
2.4.1 Taksonomi Tanaman Zaitun (<i>Olea europaea</i> L.).....	16
2.4.2 Komposisi Minyak Zaitun.....	17
2.4.3 Manfaat Minyak Zaitun.....	17
2.5 Kerangka teori	19
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	20

3.1 Kerangka Konseptual	20
3.2 Hipotesis Penelitian	20
BAB 4 METODA PENELITIAN	21
4.1 Desain Penelitian.....	21
4.2 Waktu dan Lokasi Penelitian.....	21
4.3 Alat dan Bahan	21
4.4 Pengelompokkan Besar Sampel	21
4.4.1 Populasi dan Sampel Penelitian	22
4.4.2 Kriteria Subjek Penelitian	22
4.5 Definisi Operasional.....	23
4.6 Pelaksanaan Penelitian	24
4.6.1 Pemeliharaan Hewan Coba	24
4.6.2 Perencanaan dosis Aloksan	24
4.6.3 Pemberian Minyak Zaitun	25
4.7 Prosedur Pemeriksaan Variabel Dependen Penelitian	25
4.7.1 Pengumpulan Serum Darah.....	25
4.8 Alur Penelitian.....	29
4.9 Analisis Data	30
4.9.1 Uji Normalitas dan Uji Homogenitas.....	30
4.9.2 Etika penelitian.....	30
BAB 5 HASIL PENELITIAN	31
5.1 Penentuan Kadar Hidrogen Peroksida (H ₂ O ₂).....	33
5.2 Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	34
BAB 6 PEMBAHASAN	37
6.1 Efek Antioksidan Minyak Zaitun Terhadap Hidrogen Peroksida	38
BAB 7 PENUTUP	41
7.1 KESIMPULAN	41
7.2 SARAN	41
DAFTAR PUSTAKA	41
DAFTAR LAMPIRAN.....	41
Lampiran 1. Time Schedule	48
Lampiran 2. Rincian Biaya Penelitian	49
Lampiran 3. Tabel Konversi Perhitungan Dosis Pemberian aloksan	50

Lampiran 4. Kode Etik Penelitian Payung Ariani	51
Lampiran 5. Surat Izin Penelitian.....	52
Lampiran 6. Surat Keterangan Bebas Laboratorium Biokimia	53
Lampiran 7. Dokumentasi	54



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Penentuan Kadar Hidrogen Peroksida	6
Tabel 5.1 Uji Laboratorium Hidrogen Peroksida Pada Serum Darah Tikus Wista.	34
Tabel 5.2 Uji Normalitas Shapiro-Wilk dari Kadar H_2O_2 Pada Serum Darah.....	35
Tabel 5.3 Uji Kruskal Wallis dari Kadar H_2O_2 Pada Serum Darah.....	35
Tabel 5.4 Uji <i>Mann Whitney</i> dari Kadar H_2O_2 Pada Serum Darah	36



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Peranan antioksidan endogen dalam penetralan ROS.....	13
Gambar 2.2. Mekanisme Redoks dari senyawa Fenolik dalam menetralkan ROS	14
Gambar 2.3. Daun, Buah Zaitun Dan Minyak Zaitun Merk Bertoli	16
Gambar 3.1. Alur Kerangka Konseptual Teoritis	20
Gambar 4.1. Skema kerja pemberian minyak zaitun untuk penurunan kadar Hidrogen Peroksida pada tikus Diabetes Melintus (DM) Hiperglikemia	29
Gambar 5.1. Pemeriksaan Kadar Glukosa (mg/dl) pada Kelompok K(-), K(+) dan P pada Kondisi (awal), Kondisi I (3 hari), Kondisi II (10 hari), Kondisi III (14 hari)	32
Gambar 5.2. Perbedaan rerata kadar hidrogen peroksida (H ₂ O ₂) pada tiap kelompok tikus K(-), K(+) dan P	36



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Time Schedule	48
Lampiran 2. Rincian Biaya Penelitian.....	49
Lampiran 3. Tabel Konversi Perhitungan Dosis Pemberian aloksan	50
Lampiran 4. Kode Etik Penelitian Payung Ariani	51
Lampiran 5. Surat Izin Penelitian	52
Lampiran 6. Surat Bebas Laboratorium Biokimia.....	53
Lampiran 7. Dokumentasi	54



DAFTAR SINGKATAN

BHA	: Butil Hidroksi Anisol
BHT	: Butil Hidroksi Toluen
CAT	: katalase
DNA	: Deoxyribonucleic acid
DM	: Diabetes Mellitus
DMT-1	: Diabetes melintus tipe-1
DMT-2	: Diabetes melintus tipe-2
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
EVOO	: Extra Virgin Olive Oil
G2PP	: Gula Darah Post Prandrial
GDP	: Gula Darah Puasa
GLP-1	: Glucagon-like peptide-1
GPX	: glutation peroksidase
GSH-px/GPx	: glutation peroksidase
GSH/GR	: glutation reduktase
MDA	: malondialdehid
MUFAs	: monounsaturated fatty acids
O ₂ ⁻	: superdioksida
[•] OH	: hidroksil
PRXS	: Peroksiredoksin
PUFA	: Poly UnsaturatedFatty Acid
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
ROS	: Reactive Oxygen Species
ROO	: Refined olive oil
SFA	: Saturated Fatty Acid
SGLT2	: Sodium glucose cotransporter 2
SOD	: superoksida dismutase
TBHQ	: Ter-Butil Hidroksi Quinon
TQ	: thymoquinone
TZD	: Thiazolidinediones
UV/Vis	: Ultraviolet/visible
4-HNE	: 4-hydroxy-2-nonenal
8-OH-G	: 8-hydroxyguanine



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Reactive Oxygen Species (ROS) merupakan radikal bebas yang terbentuk dari proses oksidasi biologis sel. ROS merupakan molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan, bersifat tidak stabil dan mudah bereaksi dengan komponen sel lainnya. ROS terdiri dari superdioksida (O_2^-), hidroksil (OH^\cdot), hidrogen peroksida (H_2O_2), Peroxyl radical (OOH^\cdot). Sementara RNS (*Reactive Nitrogen Species*) sering dianggap sebagai subklas dari ROS, di antaranya Nitric oxide (NO), Nitrous oxide (N_2O), Peroxynitrite (NO_3^-), Nitroxyl anion (HNO) dan Peroxynitrous Acid (HNO_3^-). Hidrogen peroksida merupakan radikal bebas yang bersifat lebih stabil dari pada (O_2^-) dan (OH^\cdot). ROS endogen berasal dari pelepasan oksidatif fagosit, metabolisme xenobiotik, yaitu detoksifikasi zat beracun. Sedangkan ROS eksogen berasal dari paparan obat-obatan atau racun seperti asap rokok, polusi, pestisida, dan insektisida¹.

Radikal bebas endogen sebagian besar terbentuk saat metabolisme dan produksi energi di mitokondria sel. Pembentukan ROS terkait dengan peranan antioksidan enzim, ketika paparan cahaya dalam jangka waktu lama dapat merangsang proses oksidasi terhadap suatu organisme. Pada proses oksidatif akan menghasilkan elektron (e^-), elektron dalam keadaan normal digunakan untuk mereduksi oksigen menjadi air saat proses transpor elektron di mitokondria. Akan tetapi sekitar 1 - 3 persen dari keseluruhan elektron tersebut mengalami kebocoran. ROS sangat reaktif dan cenderung menarik electron dan elektron tersebut akan mengikat oksigen sehingga terbentuklah superdioksida (O_2^-). Superoksida dengan bantuan enzim superdioksida dismutase (SOD) dirubah menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Selanjutnya enzim katalase (CAT) dan glutathion peroksidase (GPX) akan menetralkan H_2O_2 dengan mendegradasinya menjadi molekul air (H_2O) dan oksigen (O_2). Proses ini dapat terjadi ketika jumlah ROS seimbang dengan anti oksidan enzim tersebut^{2,3}.

Pembentukan radikal bebas di dalam tubuh merupakan suatu proses yang berkelanjutan dan tidak dapat dihindari. ROS bersifat sangat reaktif, dapat

bereaksi dengan molekul sel seperti protein, lipid dan *Deoxyribonucleic acid* (DNA), akibatnya struktur dan fungsi sel vital terganggu dan akhirnya mengakibatkan berbagai kondisi patologis yang memiliki implikasi pada berbagai jenis penyakit seperti, diabetes melitus (DM), hipertensi, aterosklerosis, stroke, dan penyakit kronis lainnya⁴⁻⁶.

Diabetes melitus merupakan penyakit metabolik yang ditandai dengan peningkatan kadar gula darah ≥ 200 mg/dl. Keadaan ini disebabkan oleh berkurangnya sekresi insulin oleh sel β -pancreas karena terjadi abnormalitas metabolisme pada lipid, protein dan DNA. Produksi insulin yang kurang aktif dalam mengatur keseimbangan kadar gula darah dapat menyebabkan hiperglikemia. Keadaan hiperglikemia akan mempercepat terjadinya kerusakan sel β -pancreas dalam sekresi insulin⁷. Diabetes melitus merupakan penyakit yang tidak dapat disembuhkan, tetapi dapat di kontrol dengan perencanaan diet, olah raga yang cukup⁸. Diabetes melitus dapat diklasifikasikan menjadi dua tipe yaitu, DM tipe-1 dan DM tipe-2. Pada umumnya terdapat DM tipe-2 sebesar 85-90%. Menurut International Diabetes Federation (IDF), Indonesia (2019) menduduki urutan ke-7 dengan prevalensi kasus diabetes terbanyak di dunia, yaitu 10,7 juta jiwa, setelah Cina, India, Amerika, Brazil, Mexico, dan Pakistan. Hingga akhir tahun 2008 penyakit degeneratif telah menyebabkan kematian hampir 36 juta orang di seluruh dunia dan diperkirakan akan terus meningkat. Pada tahun 2030 diprediksi 52 juta jiwa kematian per tahun akibat penyakit degeneratif seperti diabetes melitus, kanker, jantung, stroke dan hiperkolesterol⁹.

Pengobatan diabetes melitus dapat dilakukan dengan pemberian obat antidiabetes antara lain metformin, tetapi penggunaan obat dalam waktu yang relatif lama cenderung memberi komplikasi pada organ tubuh lainnya¹⁰. Beberapa peneliti telah melaporkan dari hasil penelitiannya dalam penggunaan obat herbal sebagai antioksidan alami yang berasal dari tumbuh-tumbuhan. Pada tumbuh-tumbuhan terdapat kandungan fitokimia berupa senyawa metabolit sekunder yaitu senyawa fenolik, flavanoid yang dapat berfungsi sebagai antioksidan eksogen untuk menangkal radikal bebas (ROS) dan kerusakan sel¹¹. Coria-Tellez et al., (2018), melaporkan telah menggunakan tanaman zaitun (*Olea europaea L.*)

sebagai sumber antioksidan untuk diabetes, antihipertensi, aterosklerosis, karena diduga terdapat kandungan metabolit sekunder yaitu polifenol, flavonoid^{12,13}, ekstrak kayu manis sebagai antioksidan untuk meningkat aktifitas enzyme SOD¹⁴, ekstrak daun gaharu¹⁵, ekstrak kulit buah naga merah¹⁶, ekstrak minyak zaitun (*Olea europaea*)¹⁷, ekstrak asam kandis.¹⁸ Armairi *et al.*,(2021) telah menggunakan mikroalga *Scenedesmus* sebagai antioksidan untuk mencegah obesitas dan penyakit liver^{19,20}. Pengobatan herbal dari tumbuh-tumbuhan merupakan salah satu pengobatan alternatif karena memiliki khasiat dan efek farmakologisnya¹¹. Minyak zaitun (*Olea europaea*) telah dikenal berkhasiat untuk kesehatan, karena minyak zaitun diketahui memiliki kandungan senyawa fenolik yang tinggi dan senyawa asam Oleat²¹.

Hidrogen peroksida merupakan salah satu ROS yang dapat terbentuk ketika dilakukan pemberian Aloksan. Peningkatan hidrogen peroksida dapat menyebabkan stress oksidatif sel, sehingga menimbulkan hiperglikemia yaitu penyakit diabetes melitus kronis. Pada penelitian ini dilakukan pemberian minyak zaitun (*Olea europaea*) sebagai antioksidan eksogen yang diharapkan dapat menurunkan kadar ROS hidrogen peroksida (H₂O₂). Serangkaian penelitian ini dilakukan secara *in vivo* pada tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) karena diketahui tikus memiliki komposisi genetik mirip dengan manusia, mudah dipelihara, biaya perawatan murah²². yang paling stabil, dan biomarker ROS yang dapat digunakan untuk mengukur terjadi hiperglikemia.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah, bagaimanakah efek pemberian minyak zaitun sebagai sumber antioksidan eksogen untuk penurunan kadar ROS hidrogen peroksida sebagai biomarker diabetes melitus / hiperglikemia pada tikus wistar setelah diinduksi dengan aloksan.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Menguji efek pemberian minyak zaitun terhadap kadar ROS Hidrogen peroksida yang menyebabkan penyakit diabetes melitus / hiperglikemia pada

tikus wistar setelah diinduksi dengan zat diabetogenik aloksan selama rentang waktu 14 hari.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menentukan kadar Hidrogen peroksida (H_2O_2) pada kelompok kontrol negatif (K-), kelompok kontrol positif (K+), pada kelompok perlakuan (P) dengan metoda spektrofotometri.
2. Menentukan efek dari pemberian minyak zaitun terhadap penurunan kadar hidrogen peroksida (H_2O_2).

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Bagi Peneliti

Sebagai seorang mahasiswa, penelitian ini sangat bermanfaat untuk melatih kemampuan dalam berpikir kritis, menulis karya ilmiah dengan pembendaharaan kata dan kalimat yang tersusun secara sistimatis. Harapan penulis dengan penelitian ini dapat menambah wawasan sebagai suatu wadah untuk mengaplikasikan ilmu pengetahuan di bidang pendidikan kedokteran yang sudah penulis pelajari selama ini, terutama ilmu penyakit metabolik, ilmu metodologi penelitian, dan dapat memahami korelasi antara teori dan eksperimen dalam bidang ilmu penyakit diabetes mellitus/ hiperglikemia.

1.4.2 Manfaat Bagi Ilmu Pengetahuan

Hasil Penelitian ini dapat memberi gambaran bahwa salah satu strategi pengobatan alternatif untuk mencegah dan mengatasi diabetes melitus (DM) dan komplikasinya dengan mengkonsumsi obat herbal salah satu diantaranya minyak zaitun.

1.4.3 Manfaat Bagi Institusi Pendidikan

Hasil penelitian ini dapat dijadikan arsip serta referensi tambahan bagi institusi pendidikan, institusi pemerintah dan non pemerintah mengenai cara mencegah penyakit diabetes melitus.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Reaktif Oxygen Species (ROS)

Reaktif Oxygen Species merupakan radikal bebas derivat dari molekul oksigen yang terbentuk dari proses oksidasi biologis didalam tubuh (endogen) dan dari lingkungan luar tubuh (eksogen). Radikal bebas adalah molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan, bersifat reaktif, tidak stabil, sehingga mudah bereaksi dengan senyawa lain membentuk senyawa radikal baru dan berkelanjutan yang disebut dengan *chain reaction*. ROS dapat bereaksi dengan molekul sel seperti protein, lipid dan *Deoxyribonucleic acid* (DNA), akibatnya struktur dan fungsi sel yang vital terganggu dan akhirnya mengakibatkan berbagai kondisi patologis. Dalam keadaan normal anti oksidan endogen dapat menetralkan spesies ROS dan bermanfaat pada proses fisiologis sel seperti sistem pertahanan, biosintesis hormon dan fertilisasi. Antioksidan endogen mampu menstabilkan atau menonaktifkan radikal bebas sebelum menyerang komponen sel. Antioksidan enzimatis seperti : enzim katalase (CAT), enzim superoksida dismutase (SOD), glutathione peroksidase (GPX), yang merupakan biomarker untuk stress oksidatif radikal bebas. Peningkatan ROS diindikasikan penurunan enzim-enzim tersebut. Sedangkan antioksidan eksogen berasal dari nutrient seperti vitamin C, vitamin E, glutathion⁴.

Ketidakseimbangan produksi ROS secara signifikan disebut dengan stress oksidatif²³. Reaktivitas radikal bebas menimbulkan reaksi yang bersifat terus berlanjut dan dapat berhenti apabila reaktivitasnya dihambat oleh senyawa yang bersifat antioksidan. Keadaan stress oksidatif membawa pada kerusakan oksidatif mulai dari tingkat sel, jaringan sampai ke organ tubuh. Kondisi sel-sel yang rusak inilah yang akhirnya penyebab dari penyakit metabolik dan proses penuaan sel²⁴. Sumber produksi ROS dari dalam tubuh merupakan suatu proses yang berkelanjutan dan tidak dapat dihindari, sebagian besar terbentuk pada saat metabolisme dan produksi energi, sekitar 5 persen atau lebih O₂ yang dihirup diubah menjadi ROS.

2.1.1 Sumber Radikal Bebas

Sumber ROS dari dalam tubuh berasal dari pelepasan oksidatif fagosit (sel darah putih), metabolisme xenobiotik, yaitu detoksifikasi zat beracun. Sedangkan dari luar tubuh dapat berasal dari paparan obat-obatan atau racun seperti asap rokok, polusi, pestisida, dan insektisida¹. ROS terdiri dari superdioksida ($\cdot\text{O}_2$), hidroksil ($\cdot\text{OH}$), hidrogen peroksida (H_2O_2), peroxy radical ($\cdot\text{OOH}$). Sementara RNS sering dianggap sebagai subklas dari ROS, di antaranya Nitric oxide (NO), Nitrous oxide (N_2O), Peroxynitrite (NO_3^-), Nitroxyl anion (HNO) dan Peroxynitrous Acid (HNO_3^-). Diantara senyawa-senyawa ROS, radikal hidroksil merupakan senyawa yang paling berbahaya karena reaktivitasnya sangat tinggi dan merusak struktur sel protein, lipid, dan DNA.

2.2 Marker Stress Oksidatif

Dari beberapa penelitian dilaporkan bahwa ada beberapa jenis senyawa yang dapat digunakan sebagai biomarker stress oksidatif didalam tubuh²⁵. Biomarker digunakan sebagai indikasi terjadinya kerusakan sel lipid, protein dan DNA, seperti tertera pada table 1.⁴

Tabel 2.1. Biomarker kerusakan oksidatif sel

Makromolekul	Kerusakan Oksidatif	Produk Hasil
Lipid	Lipid Oxidation / Peroxidation (Asam lemak tidak jenuh / MUFAs)	- Malondialdehid (MDA) - 8-Isoprostan - 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)
Protein	Protein Oksidasi, Protein <i>Cross linkage</i> , Asam amino Oksidatif	- Protein karbonil - 3-Nitrotyrosin - 2-oxohistidin - Hydroxyprolin
DNA	RNA/DNA fragmentasi (<i>single</i> dan <i>double-strand breaks</i>)	- 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin (8-OH-dG) - 8-hydroxyguanin (8-OH-G)

2.2.1 ROS dan Penyakit Diabetes Melitus

Beberapa penelitian membuktikan bahwa stress oksidatif merupakan salah satu faktor yang berperan penting dalam perkembangan diabetes melitus karena terjadi gangguan kerja insulin. Kondisi stress oksidatif yang diinduksi aloksan biasa dikaitkan dengan peningkatan ROS atau radikal bebas dan penurunan kapasitas anti oksidan endogen seperti, enzim katalase, enzim

superoksida dismutase, glutathione peroksidase. Telah ditemukan hubungan substansial antara radikal bebas ROS dengan gangguan kesehatan antara lain, diabetes melitus, proses penuaan, kanker, penyakit Alzheimer, stroke, peradangan, serangan jantung dan aterosklerosis²⁶.

2.2.1.1 Diabetes Melitus

Diabetes melitus merupakan suatu keadaan dimana terjadi peningkatan kadar glukosa darah sebesar ≥ 200 mg/dl, karena penurunan sensitivitas jaringan sel terhadap insulin. Pada keadaan normal, didalam tubuh terjadi mekanisme regulasi dan interaksi yang dinamis antara sensitivitas jaringan terhadap insulin dan sekresi insulin oleh pankreas untuk menjaga keseimbangan konsentrasi glukosa plasma darah. Pada kondisi DM sistim ini tidak berjalan dengan baik dan terjadi kegagalan sekresi insulin melalui disfungsi sel β -pankreas. Defisiensi insulin menyebabkan terjadi kerusakan pada sel β -pankreas dan pemicu terjadinya kondisi hiperglikemia²⁷. Penyakit DM merupakan penyakit kelainan pada sel tubuh karena efek dari peningkatan ROS atau stress oksidatif.

Metabolisme glukosa melalui reaksi gluko protein yang merupakan tahapan proses terbentuknya diabetes melitus yaitu, glukosa yang masuk ke dalam tubuh akan dimetabolisme dalam bentuk Adenosin Trifosfat (ATP) agar menjadi energi^{6,27}. Ketika kadar glukosa berlebih, akan teroksidasi dan membentuk radikal superdioksida ($\cdot O_2$). Sebelum berikatan dengan protein, glukosa akan mengalami proses oksidasi, sedangkan glukosa yang telah berikatan dengan protein (glycated protein) juga teroksidasi. Kombinasi dari proses oksidasi dari glycated protein tersebut akan membentuk advanced glycogen end-products (AGEs) dan akan melepaskan superdioksida ($\cdot O_2$), sehingga mengakibatkan stres oksidatif. Radikal bebas dengan rangsangan tinggi mengakibatkan kadar kalsium sitosol meningkat sehingga menginduksi pengeluaran ion kalsium dan mengakibatkan proses oksidasi sel terganggu. Proses oksidasi sel mengakibatkan sel- β pankreas mengalami kerusakan secara cepat sehingga sel- β pankreas mengalami perubahan struktural dan terjadi penurunan sekresi insulin yang berakhir dengan kondisi hiperglikemia²⁸.

Hiperglikemia merupakan kondisi DM komplikasi, pada kondisi hiperglikemia terjadi proses resistensi insulin. Faktor-faktor yang meningkat

kondisi hiperglikemia berhubungan dengan gaya hidup yang berlebihan seperti, obesitas, kurangnya aktivitas fisik, peningkatan diet tinggi lemak dan kurang serat, psikososial (kurang tidur dan depresi), usia dan faktor genetik²⁸. Kondisi hiperglikemia identik dengan kecendrungan peningkatan pembentukan radikal bebas. Diabetes melitus disebutkan sebagai penyakit metabolik yaitu suatu keadaan terjadi peningkatan kadar glukosa darah yang melebihi batas normal. Penderita DM cenderung memberi komplikasi pada penyakit lain seperti penyakit katarak, gagal ginjal, penyakit jantung koroner, penyakit kanker, penyakit menular, dan gangguan degenerate serta dapat menyebabkan kematian dini.

Diabetes melitus merupakan penyakit yang tidak dapat disembuhkan, tetapi dapat di kontrol dengan perencanaan diet, olah raga yang cukup^{7,29}. Prevalensi diabetes melitus di Amerika Serikat sebesar 26,9 juta jiwa atau 8,2 persen dari populasi. Menurut International Diabetes Federation (2019), Indonesia menduduki urutan ke-7 dengan prevalensi kasus diabetes terbanyak di dunia sebanyak 10,7 juta jiwa setelah Cina, India, Amerika, Brazil, Mexico, dan Pakistan. Hingga akhir tahun 2008 penyakit degeneratif telah menyebabkan kematian hampir 36 juta jiwa di seluruh dunia dan diperkirakan akan terus meningkat. Pada tahun 2030 diprediksi 52 juta jiwa kematian per tahun akibat penyakit degeneratif seperti, kanker, jantung, stroke, hiperkolesterol, dan diabetes melitus^{27,30,31}.

Penyakit diabetes melitus dapat diklasifikasi menjadi dua tipe yaitu:

- (a). Diabetes melitus tipe-1 (DM-1) : merupakan kondisi yang sering disebut dengan DM yang tergantung insulin. DM tipe-1 disebabkan oleh karena adanya proses autoimun / idiopatik yang menyebabkan defisiensi insulin absolut. Ditandai dengan ketidakmampuan sel- β pankreas untuk mensekresikan insulin dikarenakan kerusakan sel β -pankreas yang disebabkan oleh proses autoimun.
- (b). Diabetes melitus tipe-2 (DM-2), merupakan keadaan yang bervariasi, mulai dominan resistensi insulin disertai defisiensi insulin relatif sampai yang dominan efek sekresi insulin disertai resistensi insulin atau sel sasaran insulin gagal atau tidak mampu merespon insulin secara normal.

Resistensi insulin banyak terjadi akibat dari efek obesitas dan kurangnya aktivitas fisik serta penuaan. Resistensi insulin pada jaringan perifer dapat

mengakibatkan terjadinya gangguan penyerapan glukosa pada sel otot dan lemak. Penekanan produksi glukosa di hati yang tidak sempurna serta kegagalan pengambilan trigliserida oleh lemak. Untuk mengatasi resistensi insulin tersebut, sel- β pankreas akan meningkatkan jumlah sekresi insulin. Tahap selanjutnya mempercepat produksi glukosa endogen atau glukosa puasa terganggu. Kenaikan ini terjadi akibat adanya hiper-insulinemia. Resistensi insulin hati mendorong terjadinya hiperglikemia pada DM-2, serta kegagalan sel β -pankreas telah dikenal sebagai patofisiologi dari DM-2¹⁰.

Penderita DM semakin meningkat dengan cepat. Peningkatan jumlah penderita DM yang sebagian besar adalah DM tipe 2 yaitu sekitar 80 - 90 persen. DM tipe-2 ini disebabkan oleh beberapa faktor yaitu obesitas (kegemukan), hipertensi, riwayat keluarga DM, dislipidemia (kenaikan kadar lemak/Trigliserida), umur, faktor genetik, alkohol dan rokok. Gejala-gejala khas DM tipe-2 dinyatakan positif adalah gula darah puasa (GDP) \geq 126 mg/dl atau gula darah post prandial (G2PP) \geq 200 mg/dl. Gejala lain seperti kesemutan, gatal-gatal, penglihatan kabur, disfungsi ereksi pada pria, pruritus vulvae (keputihan) pada wanita¹⁰. Kriteria glukosa darah terganggu pada kategori DM disebabkan karena resistensi insulin dan peningkatan resiko terjadinya penyakit kardiovaskular. Untuk meminimalisir komplikasi pada diabetes melitus tipe-2 dapat dilakukan pencegahan melalui pengobatan farmakologis maupun non farmakologis¹⁹.

2.2. Aloksan

Aloksan memiliki rumus kimia ($C_4H_2N_2O_4$), dengan nama lain, 5,6-tetraoxypyrimidin: 2,4,5,6-pirimidinetetrone, 1,3-diazinan-2,4,5,6-tetron dan Asam mesoxalylurea 5-oxobarbiturat. Struktur aloksan mirip dengan glukosa, sehingga aloksan banyak digunakan untuk menginduksi terjadinya penyakit diabetes melitus pada hewan percobaan secara eksperimental agar mengalami kondisi hiperglikemia secara cepat. Aloksan dapat menyebabkan DM tipe 1 pada manusia³².

Mekanisme aksi aloksan dalam kerusakan sel β - pankreas telah diselidiki secara intensif dan belum dapat dipahami dengan jelas. Aksi sitotoksik dari zat

diabetogenik ini dimediasi oleh spesies oksigen reaktif. Aloksan memiliki kandungan asam dialurik dan bersifat toksik terhadap sel- β pankreas karena terakumulasi melalui Glucose Transporter - 2 (GLUT - 2), sehingga apabila kadar aloksan tinggi, tidak akan mempengaruhi jaringan sel lainnya. Aloksan bereaksi dan merusak substansi esensial pada sel- β pancreas, sehingga jumlah sekresi insulin menjadi berkurang^{28,31,32}.

Pemberian aloksan untuk menginduksi diabetes memiliki cara kerja yang sama dengan glukosa pada sel- β pancreas. Dosis aloksan untuk menginduksi diabetes tergantung pada spesies hewan, rute pemberian dan status gizi. Dosis intravena yang sering digunakan dari aloksan untuk menginduksi diabetes pada tikus adalah 65 mg/kg BB. Ketika aloksan diberikan secara intraperitoneal atau subkutan, dosis efektifnya harus 2-3 kali lebih tinggi. Dosis intraperitoneal di bawah 150 mg/kg BB³³.

2.2.1 Obat Antidiabetes Komersial

Beberapa jenis obat antidiabetes komersial yang beredar di pasaran dan fungsinya yang dapat digunakan pasien DM antara lain²⁸.

- (a) Terapi insulin dengan mekanisme merangsang fosforilasi reseptor insulin.
- (b) Metformin dengan mekanisme mengurangi produksi glukosa
- (c) Sulfonylureas (Gliclazide, Glimepiride, Glyburide) dengan mekanisme merangsang untuk memproduksi insulin.
- (d) Meglitinides (Nateglinide, Repaglinide) dengan mekanisme merangsang pankreas untuk memproduksi insulin.
- (e) Amylin (Pramlintide) dengan mekanisme meningkatkan kontrol glikemik melalui modulasi laju pengosongan lambung, pencegahan kenaikan kadar glukagon postprandial, dan menimbulkan sensasi kenyang.
- (f) Thiazolidinediones (TZD) (Pioglitazone, Rosiglitazone) dengan mekanisme meningkatkan sensitivitas insulin dan mengurangi produksi glukosa oleh hati.
- (g) Alpha-glucosidases inhibitor (Acarbose) dengan mekanisme memperlambat penyerapan karbohidrat (gula) yang dicerna. Dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4) inhibitors dengan mekanisme mengintensifkan efek hormon usus (incretin)

yang terlibat dalam pengendalian gula darah.

- (h) Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) agonist dengan mekanisme meniru efek hormon usus tertentu (incretin) yang terlibat dalam pengendalian gula darah.
- (i) Sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitors dengan mekanisme membantu menghilangkan glukosa di dalam urine.

2.2.2 Obat Antidiabetes Herbal

Beberapa peneliti telah melaporkan hasil penelitiannya, untuk mencegah diabetes melitus dengan pemberian obat diabetes herbal.³⁴ Penelitian ekstrak kayu manis¹⁴, ekstrak Daun Gaharu¹⁵, ekstrak kulit buah naga merah³⁵. Untuk meningkat aktifitas enzim katalase dan SOD dan menurunkan kadar MDA¹⁴, ekstrak minyak Zaitun (*Virgin Olive Oil/VOO*)¹⁷ dan ekstrak asam kandis (*Garcinia xanthochymus*)¹⁸ dapat menghambat aktivitas α -glukosidase dan merangsang enzim metabolisme glukosa di jaringan hati³³, daun sirsak yang berperan dalam menurunkan kadar glukosa darah³⁶, jintan hitam dan senyawa bioaktifnya thymoquinon (TQ) dapat melindungi dan menjaga integritas sel β -pankreas dengan mengurangi stress oksidatif atau memiliki aktivitas antidiabetes.³⁷ Salah satu tumbuh-tumbuhan diantaranya adalah buah Zaitun mengandung senyawa polifenolik, yang dapat berfungsi sebagai anti oksidan eksogen dalam memelihara fisiologi sel β -pankreas. Penggunaan obat tradisional telah digunakan di seluruh dunia untuk terapi diabetes dan komplikasinya.¹¹ Diantara banyak obat antidiabetes dan obat alternatif lainnya, obat herbal telah dikenal dapat menyembuhkan dan mencegah diabetes melitus.¹²

2.3 Antioksidan

Antioksidan merupakan zat yang dapat menetralkan radikal bebas yang bersifat toksik dan mencegah radikal bebas merusak sel. Sistem antioksidan endogen yang terdapat didalam tubuh seperti, enzim superoksida dismutase, katalase, glutathion peroksidase, glutathion reduktase, peroksiredoksin.^{23,24} Antioksidan endogen dapat memperbaiki kerusakan protein, DNA dan mencegah lipid teroksidasi. ROS dalam jumlah besar secara langsung atau tidak langsung dapat menghancurkan sistem antioksidan endogen. Untuk mengimbangi ROS yang berlebih dapat dilakukan melalui peningkatan jumlah asupan antioksidan berasal dari nutrisi makanan (antioksidan eksogen) antara lain vitamin E, vitamin

C, karotenoid, dan polifenol (flavonoid, fenolik), glutathione dan asam lipoat, protein pengikat logam (ferritin, laktoferin, albumin, dan ceruloplasmin) dan banyak fitonutrien antioksidan lainnya terdapat dalam berbagai macam makanan nabati. Antioksidan eksogen (non enzim) dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan endogen (enzim) atau saling bersinergi untuk meningkatkan aktifitas antioksidan endogen dalam menangkal radikal bebas dan melindungi sel dari kerusakan.^{1,38}

Antioksidan dalam keadaan tertentu juga dapat menjadi pro-oksidan sehingga mempunyai efek negatif dengan menyebabkan oksidasi didalam tubuh. Beberapa antioksidan yang dapat menjadi pro-oksidan adalah vitamin C, vitamin E, Zinc, ceruloplasmin, ferritin, transferrin dan albumin. Protein ini menghambat pembentukan spesies reaktif baru dengan mengikat transisi ion logam (misalnya besi dan tembaga). Antioksidan enzim dan non enzim dapat bertindak secara sinergis untuk mempertahankan atau membangun kembali homeostasis redoks.¹⁹

Antioksidan bekerja untuk melindungi sel dari kerusakan oksidatif akibat radikal bebas melalui perannya sebagai penangkap atau *scavenger* dari reaktifitas radikal bebas dan menetralkan menjadi tidak reaktif. Jika terjadi reaksi oksidasi dimana reaksi tersebut menghasilkan hasil samping berupa radikal bebas superdioksida ($\bullet\text{O}_2^-$) maka tanpa adanya antioksidan, radikal bebas ini akan menyerang molekul-molekul lain disekitarnya. Hasil reaksi ini akan dapat menghasilkan radikal bebas yang lain yang siap menyerang molekul yang lainnya. Akhirnya akan membentuk reaksi berantai yang membahayakan. Berbeda halnya bila terdapat antioksidan, radikal bebas akan segera bereaksi dengan antioksidan membentuk molekul yang stabil dan tidak berbahaya.¹³

2.3.1 Jenis - jenis Antioksidan

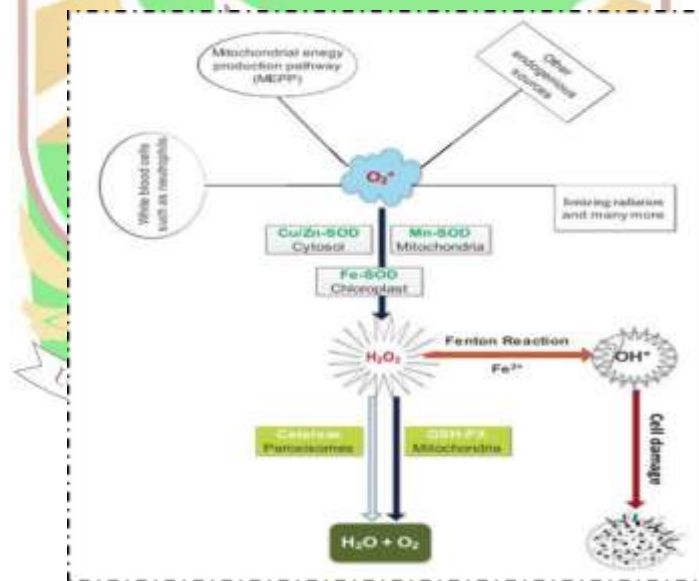
Berdasarkan mekanisme pencegahan dampak negatif ROS, maka antioksidan dapat dibagi menjadi dua golongan.²⁴

a) Antioksidan Enzimatis

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui efek yang menguntungkan dari antioksidan enzim untuk mencegah terbentuknya radikal anion superoksida ($\bullet\text{O}_2^-$), radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan radikal peroksil

(•ROO) yang berbahaya bagi tubuh. Antioksidan dapat menjadi scavenger, protein melalui logam penyangga, pengkhelat logam redoks (Fe, Mn, Cu, Zn). Pada Gambar 1 merupakan skematis peranan antioksidan enzim dalam penetralan ROS.⁴

Anti oksidan endogen seperti, enzim superoksida dismutase (SOD) adalah enzim mengandung logam antara lain, (MnSOD) terdapat pada mitokondria dan (Cu-SOD) terdapat pada sitoplasma, nukleus. Enzim-enzim ini berfungsi untuk menetralkan superdioksida ($\bullet\text{O}_2^-$) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Anti oksidan enzim katalase (CAT) terdapat pada sitoplasma dapat menetralkan H_2O_2 menjadi air (H_2O) dan oksigen (O_2), dan reaksi ini dapat berlansung jika ada metanol, etanol sebagai pemberi ion hidrogen. Glutation peroksidase (GSH-Px) merupakan antioksidan endogen yang mengandung ion selenium (Se) pada sisi aktifnya, antioksidan ini dapat menetralkan H_2O_2 dengan cara mereduksinya. Reaksi reduksi ini berpasangan dengan reaksi oksidasi glutation tereduksi (GSH) menjadi glutation teroksidasi (GSSG).



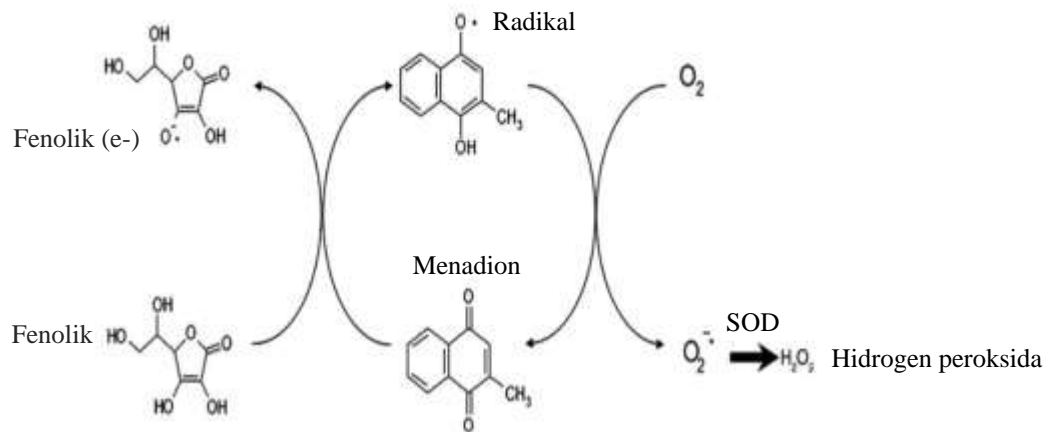
Gambar 2.1. Peranan antioksidan endogen dalam penetralan ROS⁴

Berdasarkan hasil penelitian dari beberapa peneliti mengaplikasi enzim katalase dalam industri makanan untuk menghilangkan hidrogen peroksida dari susu sebelum diproduksi menjadi keju. Kegunaan lain adalah dalam pembungkus makanan di mana ia mencegah makanan mengoksidasi katalase, dalam industri tekstil, menghilangkan hidrogen peroksida dari bahan untuk memastikannya

bahan bebas peroksida. Penggunaan kecil dalam kebersihan lensa kontak beberapa pembersihan lensa produk disinfeksi lensa menggunakan larutan hidrogen peroksida; larutan yang mengandung katalase adalah kemudian digunakan untuk menguraikan hidrogen peroksida sebelum lensa digunakan kembali¹³.

b) Antioksidan Non-Enzimatis

Antioksidan non-enzimatis disebut juga sebagai antioksidan eksogen, yang berasal dari komponen nutrisi seperti, sayur-sayuran, buah-buahan dan rempah-rempah²⁴. Komponen yang bersifat antioksidan didalam sayur-sayuran, buah-buahan dan rempah-rempah meliputi, vitamin C, vitamin E, β -karoten, polifenolik, flavonoid, isoflavon, seruloplasmin, feritin, transferin, dan albumin. Senyawa-senyawa ini dapat menghambat pembentukan spesies reaktif baru. Senyawa-senyawa fitokimia ini membantu melindungi sel dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas.^{24,39} Pada Gambar 2, merupakan mekanisme redoks aktifitas biologis anti oksidan eksogen dari senyawa fenolik dalam menetralkan ROS.



Gambar 1.2. Mekanisme Redoks dari senyawa Fenolik dalam menetralkan ROS³⁹

Senyawa menadione teroksidasi membentuk radikal menadion dan selanjutnya direduksi kembali dan dihasilkan anion superoksida ($\bullet O_2^-$), kemudian enzim superoksida dismutase (SOD) merubah superoksida ($\bullet O_2^-$) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2).

Berdasarkan sumbernya, antioksidan dibagi menjadi 2 kelompok yaitu:

i) Antioksidan sintetik

merupakan senyawa antioksidan yang diperoleh dari hasil sintetis dari industri, antara lain Butil hidroksi anisole (BHA), Butil hidroksi toluene (BHT), Asam galat, TBHQ (Ter-butyl hidroksi quinone) dan Tokoferol. Senyawa ini telah banyak digunakan sebagai aditif pada produk makanan untuk mencegah kerusakan yang disebabkan oleh proses oksidasi. Namun, penggunaannya dibatasi karena berpotensi terhadap masalah kesehatan.⁴⁰

ii) Antioksidan alami

berasal dari bahan alam seperti tumbuh-tumbuhan, yang pada umumnya mengandung senyawa polifenolik berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, Quinon, tokoferol, asam-asam organik polifungsional, vitamin C, vitamin E, karotenoid dan berbagai trace element (seperti Se, Zn, Cu dan Mn).^{12,34,39}

2.4 Tanaman Zaitun (*Olea europaea* L.)

Tanaman zaitun adalah jenis tanaman yang berbuah, buah Zaitun memiliki nama latin (*Olea europaea* L.). Pohon zaitun tumbuh sebagai tumbuhan perdu tahunan. Pada usia 15 - 20 tahun pohon zaitun mampu memproduksi buah yang banyak.¹⁸ Dan mampu bertahan hidup dengan umur yang panjang yaitu sampai ratusan dan ribuan tahun dan tumbuh menjadi pohon yang besar. Tanaman zaitun tersebar di Asia Timur dan Selatan sampai ke Mediterania, Makaronesia serta Afrika Timur dan Selatan.^{41,42} Pohon zaitun banyak ditemukan dikawasan Mediterania seperti, Timur Tengah, Italia, Spanyol, Yunani dan negara lain di sekitarnya. Morfologi dari tanaman Zaitun berupa pohon dengan ketinggian 5 - 10 m. Daun dari tanaman zaitun berbentuk lonjong berukuran 20 - 90 mm x 7 - 15 mm dan berwarna hijau keabu-abuan pada permukaan atas sedangkan pada permukaan bawah daun berwarna kuning keemasan. Tanaman zaitun memiliki bunga berukuran 6 - 10 mm dengan warna putih. Ketika pohon berusia sekitar 15 - 20 tahun, tanaman ini dapat memproduksi dengan baik dan menghasilkan buah berbentuk seperti telur berwarna hijau muda dengan bercak putih ketika masih muda dan berwarna ungu gelap ketika sudah matang, pada gambar 3.

2.4.1 Taksonomi Tanaman Zaitun (*Olea europaea* L.)

Buah zaitun muda berwarna hijau kekuningan dan sering digunakan masyarakat Mediterania sebagai bumbu penyedap dalam masakan. Sedangkan buah zaitun yang telah matang berwarna ungu kehitaman dan kerap diekstrak untuk diambil minyaknya yang dikenal sebagai minyak zaitun. Tanaman zaitun dapat diklasifikasi atau taksonomi adalah sebagai berikut .²¹

Kingdom : *Plantae*
Division : *Magnoliophyta*
Kelas : *Magnoliopsida*
Famili : *Oleaceae*
Genus : *Olea*
Species : *Europa*



Gambar 2.2. Daun, Buah Zaitun Dan Minyak Zaitun Merk Bertoli

Minyak zaitun (*Virgin Olive Oil* / VOO) adalah minyak yang didapat dari buah zaitun. Minyak zaitun merupakan salah satu pangan fungsional yang mempunyai kandungan MUFAs, yang sebagian besar terdapat dalam bentuk asam oleat. Selain itu, minyak zaitun juga mengandung senyawa antioksidan fenolik, sehingga banyak dimanfaatkan untuk kesehatan.^{40,43}

Minyak zaitun ada dua jenis yaitu, minyak zaitun extra virgin (*Extra Virgin Olive Oil* - EVOO) dan minyak zaitun murni (*Refined Olive Oil* - ROO). Kedua jenis minyak zaitun tersebut memiliki komposisi yang sama yaitu asam

lemak tak jenuh tunggal (*mono-unsaturated fatty acids* / MUFAs) terutama asam oleat, namun berbeda pada kandungan komponen minornya. Sekitar 98 - 99 persen dari total berat EVOO terdapat MUFAs dan sebanyak 1 – 2 persen berupa komponen minor dan terdiri dari senyawa polifenolik, squalene, quinolin, sitosterol, triterpen, pigmen, tokoferol. EVOO diperoleh melalui proses fisik, yaitu dengan menghancurkan dan pemerasan buah Zaitun. Sebaliknya, ROO melewati proses ekstraksi kimia seperti, refinement dan menghilangkan sebagian besar komponen minor.⁴⁴

2.4.2 Komposisi Minyak Zaitun

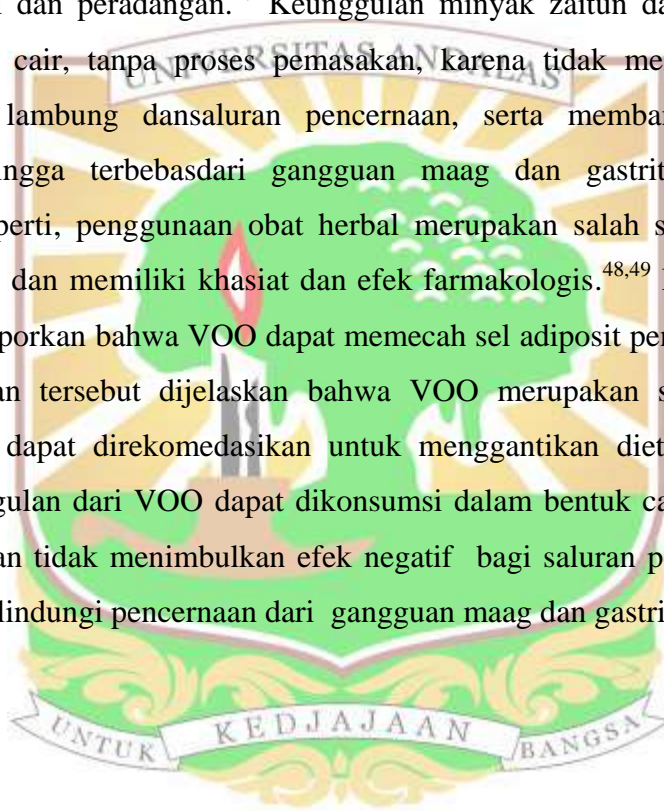
Minyak zaitun mengandung senyawa antioksidan yang pada umumnya dapat mengurangi stress oksidatif penyebab terjadi peningkatan gula darah. Minyak zaitun merupakan ekstrak dari buah zaitun, terdiri dari fraksi gliserol (90 - 99) persen dan fraksi non-gliserol (0,4 - 5) persen.^{39,42} Fraksi gliserol terdiri dari *Mono Unsaturated Fatty Acid*, *Poly Unsaturated Fatty Acid* dan *Saturated Fatty Acid* (SFA). Sedangkan fraksi non gliserol diantaranya senyawa fenolik, tokoferol, squalene, klorofil (pigmen warna) dan β -karoten yang berfungsi sebagai antioksidan. Setiap 100 gr minyak zaitun mengandung komposisi yang terdiri dari : komposisi zat gizi dan vitamin (air 80 persen : minyak 15 persen : protein 1 persen : karbohidrat 1 persen, serat 1 persen : vitamin E 14 mg (93 persen) : vitamin K 62 mg (59 persen) : vitamin A 38,8 mg). Komposisi fitokimia mengandung polifenol 400.2 ppm. Kandungan Asam lemak (Oleat 55 - 83 persen : Linoleat 3.5 - 21 persen : Palmitat 7.5 - 20 persen : Stearat 0.5 – 5 persen : α -Linolenat 0 – 5 persen dan omega-3 dan omega-6.⁴⁵

2.4.3 Manfaat Minyak Zaitun

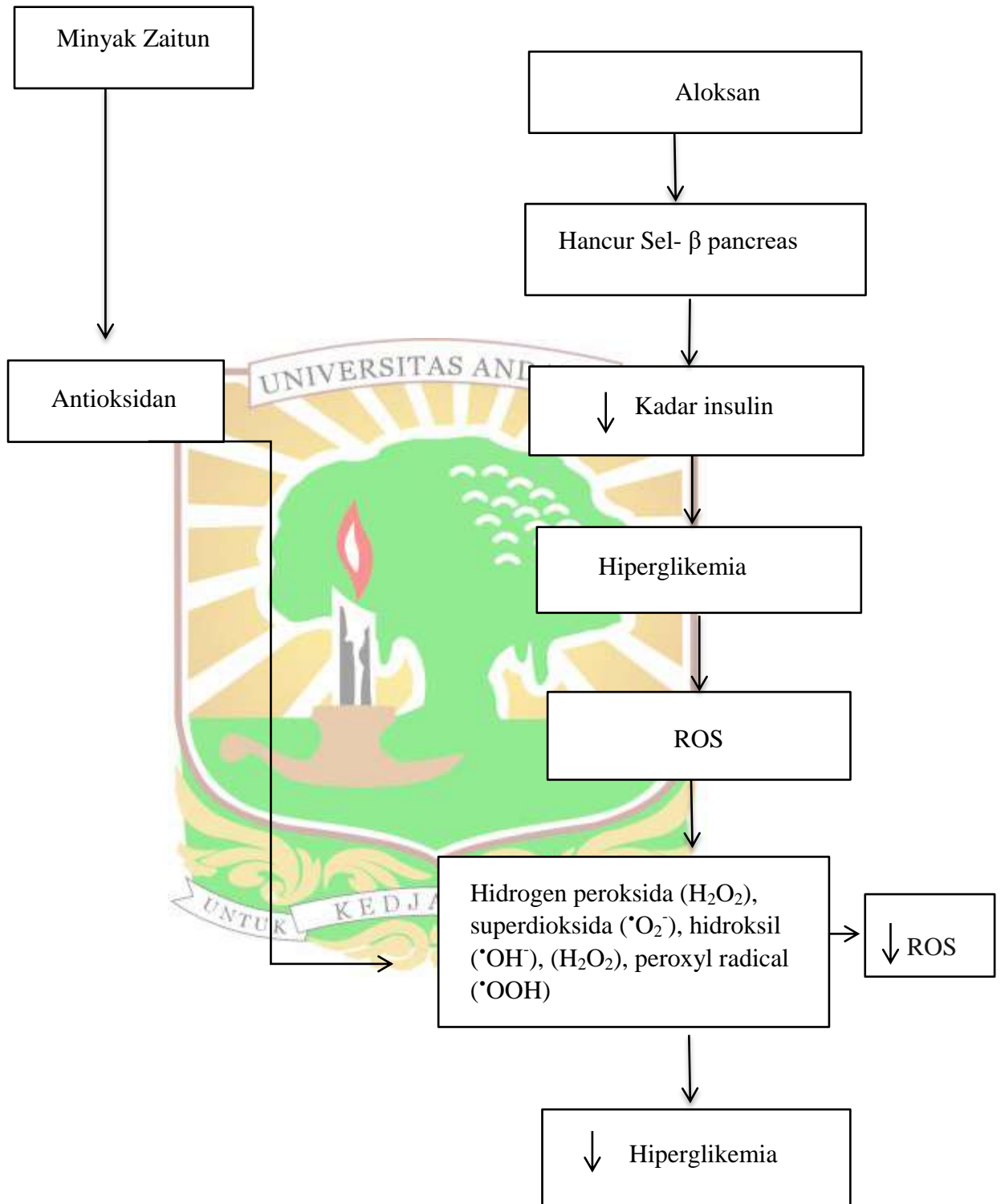
Minyak zaitun sangat bermanfaat bagi kesehatan karena kandungan asam oleat didalamnya dan senyawa lain. Beberapa komponen mencakup senyawa polifenol (flavonol, quercetin-3-rutinoside, qQuercetin-3-rutinoside, luteolin-7-glucoside, luteolin-5-glucoside.tokoferol, fitosterol, karotenoid, luteolin, dan asam triterpenat, asam oleat yang banyak terdapat dalam minyak zaitun dan diindikasikan dapat mencegah penyakit kardiovaskular. Bukti lain juga menunjukkan bahwa konsumsi rutin makanan yang kaya akan senyawa

fenolik dapat menurunkan risiko perkembangan penyakit kronis.⁴¹ Mekanisme dimana senyawa ini dapat memberikan efek antiinflamasi, khususnya pada penyakit kardiovaskular, melibatkan antara lain aktivitas antioksidan.⁴⁶

Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa manfaat antioksidan dari komponen minor (terutama senyawa fenolik) dari EVOO, dapat mengurangi risiko trombotik, peradangan, aterosklerosis, stres oksidatif dan kanker.⁴⁷ Telah dilaporkan bahwa minyak zaitun, terutama EVOO memiliki efek menguntungkan pada faktor risiko kardiovaskular seperti, koagulasi, agregasi platelet, lipid, fungsi endotel dan peradangan.¹⁷ Keunggulan minyak zaitun dapat dikonsumsi dalam bentuk cair, tanpa proses pemasakan, karena tidak menimbulkan efek negatif bagi lambung dan saluran pencernaan, serta membantu melindungi lambung sehingga terbebas dari gangguan maag dan gastritis. Pengobatan tradisional seperti, penggunaan obat herbal merupakan salah satu pengobatan alternatif baru dan memiliki khasiat dan efek farmakologis.^{48,49} Dalam beberapa penelitian dilaporkan bahwa VOO dapat memecah sel adiposit penyebab obesitas. Pada penelitian tersebut dijelaskan bahwa VOO merupakan salah satu jenis minyak yang dapat direkomendasikan untuk menggantikan diet minyak lemak jenuh. Keunggulan dari VOO dapat dikonsumsi dalam bentuk cair, tanpa proses pemasakan, dan tidak menimbulkan efek negatif bagi saluran pencernaan, serta membantu melindungi pencernaan dari gangguan maag dan gastritis.^{17,50}



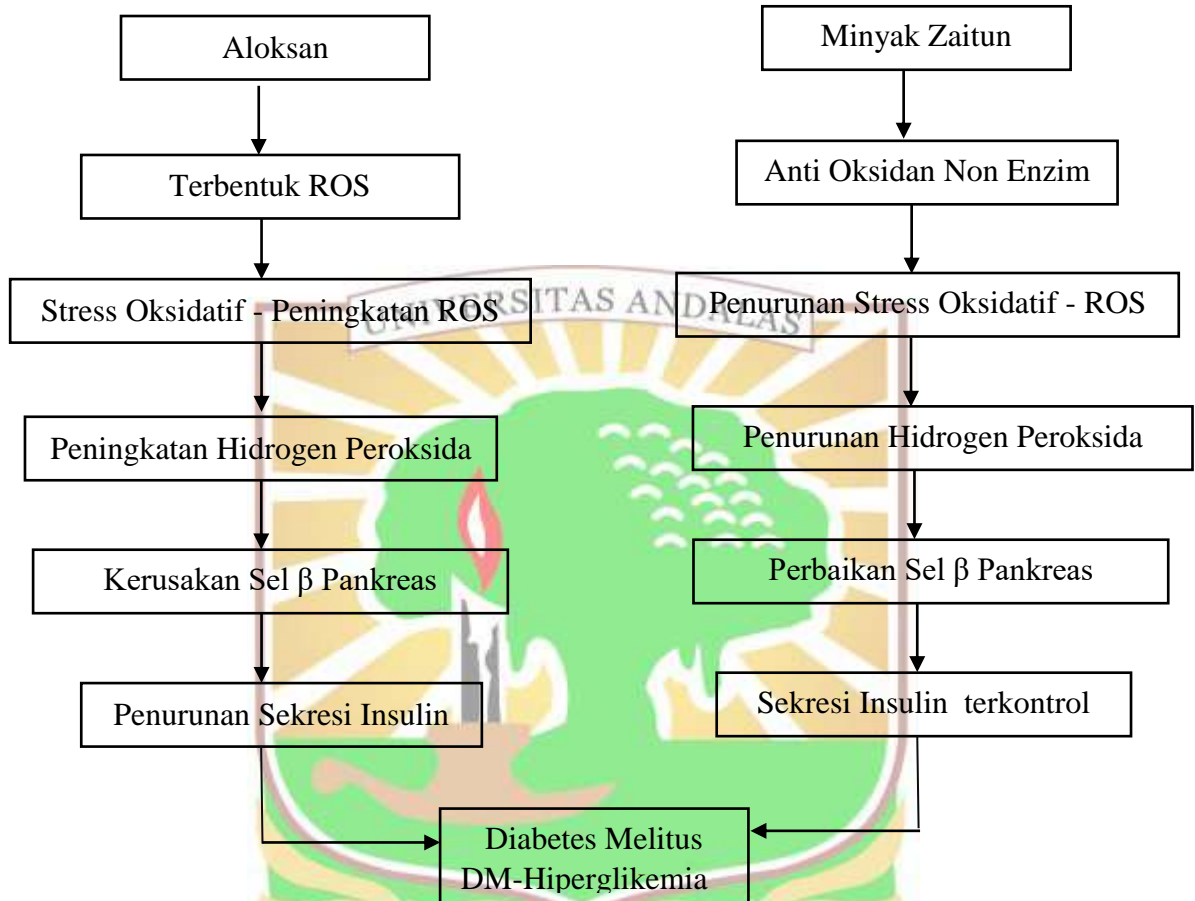
2.5 Kerangka Teori



BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1. Alur Kerangka Konseptual Teoritis

3.2 Hipotesis Penelitian

Ho = Aloxan dapat menyebabkan peningkatan kadar ROS yang menyebabkan peningkatan gula darah pada tikus wistar.

Ho = Pemberian anti oksidan pada minyak zaitun dapat menurunkan kadar ROS (hidrogen peroksida) pada tikus wistar hiperglikemia.

BAB 4

METODA PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dari payung penelitian Prof. Dr. Eti Yerizel, M.S, dengan menggunakan *post test only group design* mengikuti Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian menggunakan hewan coba tikus wistar jantan dewasa yang terdiri dari 3 kelompok perlakuan yang masing-masing kelompok ada 8 ekor tikus wistar.

4.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian telah dilakukan di laboratorium *animal house*, Fakultas Farmasi, Universitas Andalas dan pengujian sampel antara lain Uji kadar hidrogen peroksida dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas Padang. Penelitian dilakukan dari bulan Agustus 2023 sampai Mei 2024.

4.3 Alat dan Bahan

4.3.1 Alat

Peralatan yang digunakan adalah kandang hewan, timbangan hewan, neraca analitis digital (Ohaus), Spektrofotometer UV-Vis (Spectronic Genesys 20), Sentrifus (Nasco), Mikropipet (Socorex Swiss), Oven, rak dan tabung reaksi, cuvet, alat-alat gelas, vorteks, sonde, tabung vial, microtube, *microhaematocrit*, pisau bedah, jarum suntik, *rapid blood glucose monitoring* merk Accu-check.

4.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan : Tikus Wistar jantan dewasa berumur 2-3 bulan dengan berat badan rata-rata 200-250g dengan kondisi fisik sehat, anastesi Ketamine hidroklorida ($C_{13}H_{16}ClNO$) 40-50 mg/KgBB, alkohol, mMinyak Zaitun (*Olea europaea*) merk Bertolli, Aloksan monohidrat ($C_4H_2N_2O_4$), H_2O_2 , aquabidest, NaCl 0.9 persen, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (pH=10), Kits standar H_2O_2 , Buffer PBS (0.01 M) pH = 7.4.

4.4 Pengelompokkan Besar Sampel

Pengelompokkan sampel hewan coba tikus wistar yang digunakan dalam penelitian secara *in vivo* ini, terdiri dari tiga kelompok yaitu :

8 ekor untuk kelompok K (-), 8 ekor untuk kelompok K (+) dan 8 ekor untuk kelompok (P) dan total dibutuhkan 24 ekor tikus.

4.4.1 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi tikus wistar jantan dewasa umur 2 - 3 bulan dengan bobot 200 - 250 gram dari Animal house, Fakultas Farmasi, Universitas Andalas. Tikus wistar dikelompokkan menjadi 3 kelompok perlakuan, yaitu:

a. Kelompok I (K-)

adalah tikus wistar jantan dewasa yang tidak diberi perlakuan (kelompok kontrol negatif) yaitu tidak diinduksi aloksan dan tidak diberikan minyak zaitun, hanya diberi makan dan minum ad libitum.⁵¹

b. Kelompok II (K+)

adalah tikus wistar jantan dewasa yang diberi induksi aloksan dengan dosis 100mg/kgBB diberikan satu kali pemberian secara intraperitoneal disebut sebagai tikus hiperglikemia dan tidak diberi minyak zaitun.⁵²

c. Kelompok III (P)

adalah tikus wistar jantan dewasa hiperglikemia yang diberi induksi aloksan secara intraperitoneal dengan satu kali pemberian dengan dosis 100 mg/kgBB dan diberi minyak zaitun secara oral dengan dosis 25 mL/hari selama 14 hari.

Kelompok II dan III setelah diinduksi aloksan (3 sampai 7 hari) segera dilakukan pemeriksaan kadar glukosa darah, karena pemberian minyak zaitun dilakukan jika ada indikasi kadar glukosa darah tikus di atas 135 mg/dl (diabetogenik). Pada 14 hari penelitian dilakukan pengukuran kadar hidrogen peroksida pada 24 ekor sampel tikus wistar jantan dewasa.

4.4.2 Kriteria Subjek Penelitian

Subjek penelitian terdiri dari kriteria inklusi adalah sebagai berikut :

1. Tikus wistar jantan dewasa umur 2 - 3 bulan dengan bobot 200 - 250 gram
2. Tikus yang sehat, aktif bergerak, berasal dari jenis yang sama.

Sedangkan Subjek penelitian kriteria eksklusi adalah sebagai berikut :

1. Tikus yang sudah dilakukan intervensi pengobatan dalam penelitian sebelumnya.
2. Tikus yang sakit (karakter rambut rontok, kusam. Tidak/kurang aktif

3. Tikus dalam keadaan cacat secara anatomi.

Adapun kriteria *drop out* dari subjek penelitian ini adalah sebagai berikut: Tikus yang mati selama periode penelitian.

4.5 Definisi Operasional

Variabel Independen

1. Minyak zaitun

a. Definisi : minyak yang berasal dari bahan alami buah zaitun yang memiliki kandungan anti oksidan, yang di prediksi sebagai kandungan fenolik. Minyak zaitun (*Olea europaea*) diperoleh dari supermarket yang ada di kota Padang, Indonesia dengan Merk Bertolli (Italia; Sertifikat: IFS-BRC).

b. Alat Ukur : timbangan analitis

c. Hasil Ukur : pemberian dosis untuk hewan coba dikonversikan berdasarkan berat badan manusia dengan berat 70 kg (lampiran 3), yakni 0,45 ml/hari untuk BB 200 gr. Dan selanjutnya disesuaikan dengan berat badan tikus dengan menggunakan konversi tersebut.

d. Skala Ukur : Rasio

Variabel Dependen

1. Kadar Glukosa Darah

a. Definisi : kadar glukosa darah yang didapatkan dari pengukuran sebelum dan setelah diberi aloksan dan minyak zaitun

b. Cara Ukur : Glukometer (Accu check)

c. Satuan Ukur : kadar glukosa dalam mg/dl

d. Skala Ukur : Rasio

e. Nilai rujukan : kadar glukosa darah pada tikus hiperglikemia : > 135 mg/dl

2. Kadar Hidrogen peroksida

a. Definisi : kadar hydrogen peroksida yang didapatkan dari pengukuran sebelum dan setelah diberi aloksan dan minyak zaitun

b. Cara Ukur : Spektrofotometer

c. Satuan Ukur : kadar hydrogen peroksida dalam mmol/L

d. Skala Ukur : Rasio

4.6 Pelaksanaan Penelitian

4.6.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Tikus wistar berumur 2 - 3 bulan dengan berat badan 200 - 250 gram, sehat dilakukan aklimatisasi selama 7 hari di dalam kandang yang terbuat dari bahan plastik dengan luas (ukuran 30 x 20 x 10 cm) yang ditutup dengan kawat kasa. Dasar kandang dilapisi dengan sekam padi setebal 0,5 - 1 cm dan diganti setiap tiga hari. Cahaya ruangan dikontrol (12 jam terang dan 12 jam gelap), yaitu pukul 06.00 sampai dengan pukul 18.00) dan 12 jam gelap (pukul 18.00 sampai dengan pukul 06.00). Dikondisikan dengan ruangan dibiarkan pada kondisi alamiah kira-kira 20⁰C - 24,5⁰C, dan kelembapan relatif (50 ± 10%). Diberikan pakan standard (B-551) 10 persen dari bobot badan dan minum (air PDAM) diberikan setiap hari (adlibitum). Kemudian diukur kadar glukosa darah puasa. Tikus yang dipilih yang mempunyai kadar glukosa darah normal 50 - 135 mg/dl. Pengukuran glukosa darah dilakukan dengan menggunakan glucometer (Accu check).

4.6.2 Perencanaan dosis Aloksan

Aloksan didapat dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas. Aloksan komersial dengan dosis 400 mg dilautkan dalam NaCL 0,9 % sampai volume 32 - 40 ml.

Larutan aloksan diinjeksi kan pada hewan coba secara intraperitoneal.

Perhitungan dosis aloksan:

- Berat badan tikus 200 - 250 gr. Dosis aloksan yang digunakan adalah 100 mg/kgBB.
- Volume pemberian sediaan untuk satu ekor tikus adalah 0,01 mL/g berat badan tikus.
- Jumlah tikus yang akan diinduksi sebanyak 2 kelompok, K+ dan P sebanyak 16 ekor
- Aloksan untuk satu ekor tikus (BB 200 gr) = $100 \text{ mg}/1000 \text{ g} \times 200 \text{ g} = 20 \text{ mg}$
- Volume pemberian aloksan untuk satu ekor tikus (200 gr) = $0,01 \text{ mL} \times 200 \text{ gr} = 2 \text{ mL}$

- f. Aloksan untuk satu ekor tikus (BB 250 g) = $100 \text{ mg} / 1000 \text{ g} \times 250 \text{ g} = 25 \text{ mg}$
- g. Volume pemberian aloksan untuk satu ekor tikus (250 g) = $0,01 \text{ mL} \times 250 \text{ g} = 2,5 \text{ mL}$
- h. Volume yang dibutuhkan = Σ tikus x volume pemberian tiap ekor tikus pada kelompok (K+) dan (P) = $16 \text{ ekor} \times (2 \text{ mL} - 2,5 \text{ mL}) = 32 \text{ mL} - 40 \text{ mL}$
- i. Aloksan yang ditimbang = $20 \text{ mg} : 2 \text{ mL} \times 32 \text{ mL} = 320 \text{ mg}$
 $= 25 \text{ mg} : 2,5 \text{ mL} \times 40 \text{ mL} = 400 \text{ mg}$
- j. Jadi aloksan yang ditimbang sebanyak 320 mg – 400 mg di larutkan dalam NaCl 0,9 % hingga 32 mL – 40 mL.

4.6.3 Pemberian Minyak Zaitun

Minyak zaitun (*Olea europaea*) diperoleh dari supermarket yang ada di kota Padang, Indonesia dengan Merk Bertolli (Italia; Sertifikat: IFS–BRC). Pemberian minyak zaitun menggunakan alat bantu sonde per oral. Dalam melakukan intervensi, tikus dipegang dan posisinya diatur sedemikian rupa, kemudian minyak zaitun dimasukkan melalui tepi palatum secara perlahan ke arah belakang hingga esofagus.

Adapun pengukuran dosis dari pemberian minyak zaitun dihitung berdasarkan persamaan berikut : menentukan jumlah pemberian minyak zaitun untuk 1 ekor tikus dengan berat badan (BB) 200 - 250 gr. Pemberian dosis untuk hewan coba dikonversikan berdasarkan berat badan manusia (70 kg), seperti pada lampiran 2.

- a. Konversi dosis x dosis minyak zaitun ; $0,018 \times 25 \text{ ml} = 0,45 \text{ ml/hari}$ untuk BB 200 g.
- b. Konversi dosis x Berat badan (BB) = $0,45 \text{ mL} \times (250/200 \text{ g}) = 0,56 \text{ ml/hari}$ (BB 250 g)
- c. Dosis minyak zaitun yang digunakan untuk berat badan tikus 200-250 gr adalah 0,45 mL/hari – 0,56 mL/hari.

4.7 Prosedur Pemeriksaan Variabel Dependen Penelitian

4.7.1 Pengumpulan Serum Darah

Tikus wistar di puasakan selama 12 - 16 jam sebelum diberikan aloksan dan diukur glukosa darah. Setelah diberikan aloksan darah tikus diambil secara

intrakardial pada hari ke-14. Pengambilan darah pada tikus dilakukan anastesi. Darah diambil sebanyak 1,5 ml menggunakan pipet kapiler hematocrit, ditampung menggunakan tabung yang telah mengandung *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA). Untuk mendapatkan plasma, terpisah dari serum dan eritrosit, sampel darah disentrifuge dengan kecepatan 3.500 rpm selama 10 menit. Plasma yang sudah terpisah diambil dengan mikropipet dan plasma ditampung menggunakan microtube. Plasma dikemas menggunakan dry ice dan dinalisis di laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran untuk analisis gula darah (Glucotest) dan kadar hydrogen peroksida (H₂O₂).¹⁹

4.7.1.1 Pengukuran Kadar Gula Darah

Tikus dipuasakan selama delapan (12 - 18) jam sebelum pengukuran kadar sampel darah diambil dengan microtube, kemudian didiamkan selama 30 menit, kemudian sentrifugase dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit. Plasma darah diambil 5 µL kemudian dicampurkan dengan reagen glukosa sebanyak 500 µL dan diinkubasi selama 30 menit. Pengukuran kadar glukosa menggunakan glukometer test (*Accu Check*).⁵¹ Bandingkan glukosa darah pada hari 0 dan 15 setelah dilakukan perlakuan. Bila kadar gula darah >135 mg/dl maka tikus tersebut diindikasi hiperglikemia.³⁸

$$\% \text{ Penurunan kadar glukosa darah} = \frac{G_0 - G_{15}}{G_0} \times 100 \%$$

Keterangan :

G₀ : kadar glukosa darah hari ke - 0

G₁₅ : kadar glukosa darah hari ke -14

4.7.1.2 Pengukuran Kadar Hidrogen Peroksida (H₂O₂)

Kadar Hidrogen peroksida dapat ditentukan dengan metoda spektrofotometer berdasarkan reaksi dengan amonium molibdat membentuk kompleks warna kuning dengan serapan maksimum pada λ maks = 405 nm.⁵³

a. Persiapan Reagen

Reagent 1 : Larutan buffer PBS (*Phosphate Buffer Saline*) (0.01 M, pH 7.4, 60 mL × 2 vials, 2 - 8°C, 6 months. Panaskan PBS 0,01 M, pH 7,4 atau 0,9 % NaCl pada suhu 37 °C selama 10 menit

Reagent 2 : Ammonium Molybdate 60 mL × 2 vials 2 - 8°C, 6 bulan.

Ammonium Molybdate, inkubasi dalam waterbath pada 60°C jika mengkristal.

Reagent 3 : Standar H₂O₂ (1 mol/L) 12 mL × 1 vial 2 - 8°C, 6 bulan

b. Pembuatan larutan standar H₂O₂ 60 mmol/L

Siapkan larutan baru dengan mengencerkan 1 mol/L H₂O₂ larutan stok standar dengan air aquabidest dengan perbandingan 3 : 47 sebelum digunakan. Buatlah seri larutan standar H₂O₂ (1,5 - 150 mmol/L) atau (10 µL, 200 µL, 1000 µL). Tabung EP (EAZYPACK) sebanyak (1,5 mL, 2 mL, 5 mL).

c. Persiapan Serum

Sebelum digunakan jika konsentrasi sampel terlalu tinggi, dilakukan pengenceran sampel dengan tepat. Jika konsentrasi terlalu rendah, volume sampel harus ditingkatkan.

Volume sampel standar dan aquabidest (Blanko) harus ditingkatkan secara merata pada waktu yang sama. Dianjurkan untuk mengambil 2 ~ 3 sampel yang berbeda untuk dilakukan pra-percobaan sebelum percobaan dan encerkan sampel menurut hasil pra-eksperimen dan rentang deteksi (1,5-150 mmol/L).

Faktor pengenceran yang direkomendasikan untuk sampel serum dengan factor pengenceran 1. Jika sampel Serum pekat dapat diencerkan dengan (0,9% NaCl) atau PBS (0,01 M, pH 7,4). Serum diamkan pada suhu 25°C selama 30 menit untuk membekukan darah. Kemudian centrifuge pada 2.000 rpm selama 15 menit pada 4°C.

d. Penentuan Kadar hidrogen peroksida (H₂O₂)

1. Tambahkan kedalam Tabung EP sebanyak 1 - 5 mL reagen 1 dan inkubasi pada temperatur 37°C selama 10 menit Tabung - 1).
2. Blanko : 0.1 mL aquabidest dimasukkan kedalam tabung (Tabung - 2).
3. Standar : 0,1 mL larutan standar H₂O₂ 60 mmol/L dimasukkan kedalam tabung (Tabung-3)
4. Sampel : 0,1 mL sampel serum kedalam tabung (Tabung - 4)

Kedalam masing-masing tabung (1, 2, 3 dan 4) ditambahkan 1 mL reagen 2 dan homogenkan. Kemudian masukkan ke kuvet dan ukur OD dengan menggunakan instrument Spektrofotometer pada $\lambda = 405$ nm dan alat di nolkan dengan menggunakan aquabidest. Pada Tabel 2 ditampilkan perbandingan

komposisi reagent yang digunakan untuk penentuan kadar hidrogen peroksida (H₂O₂).

Tabel 4.1. Penentuan Kadar Hidrogen Peroksida

	Tabung Blanko	Tabung Standar	Tabung Sampel
Reagen 1 (mL)	1	1	1
Panaskan pada temperature 37°C selama 10 menit			
Air Aquabidest	0.1 mL		
Larutan Standar H ₂ O ₂ 60 mmol/L (mL)		0.1 mL	
Sampel serum (mL)			0.1 mL
Reagen 2 (mL)	1	1	1

e. Perhitungan Kadar H₂O₂ untuk Serum (plasma) sampel cair lainnya:

$$\text{Kadar H}_2\text{O}_2 \text{ (mmol/L)} = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \times f$$

Atau

$$\text{Kadar H}_2\text{O}_2 \text{ (mmol/L)} = \frac{\text{OD Sampel} - \text{OD Blanko}}{\text{OD Standar} - \text{OD Blanko}} \times [\text{Standar H}_2\text{O}_2 \left(\frac{60 \text{ mmol}}{\text{L}}\right)] \times 1$$

Keterangan:

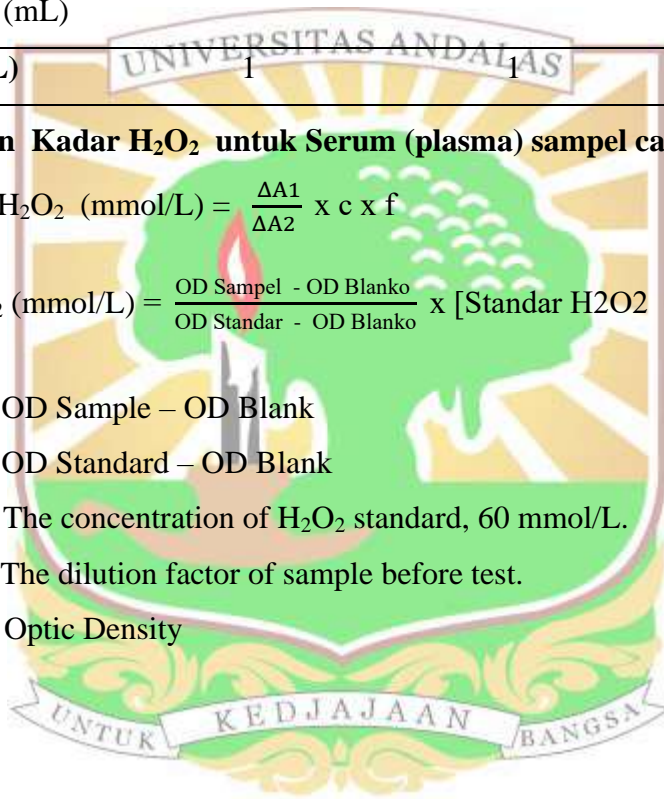
ΔA1 : OD Sample – OD Blank

ΔA2 : OD Standard – OD Blank

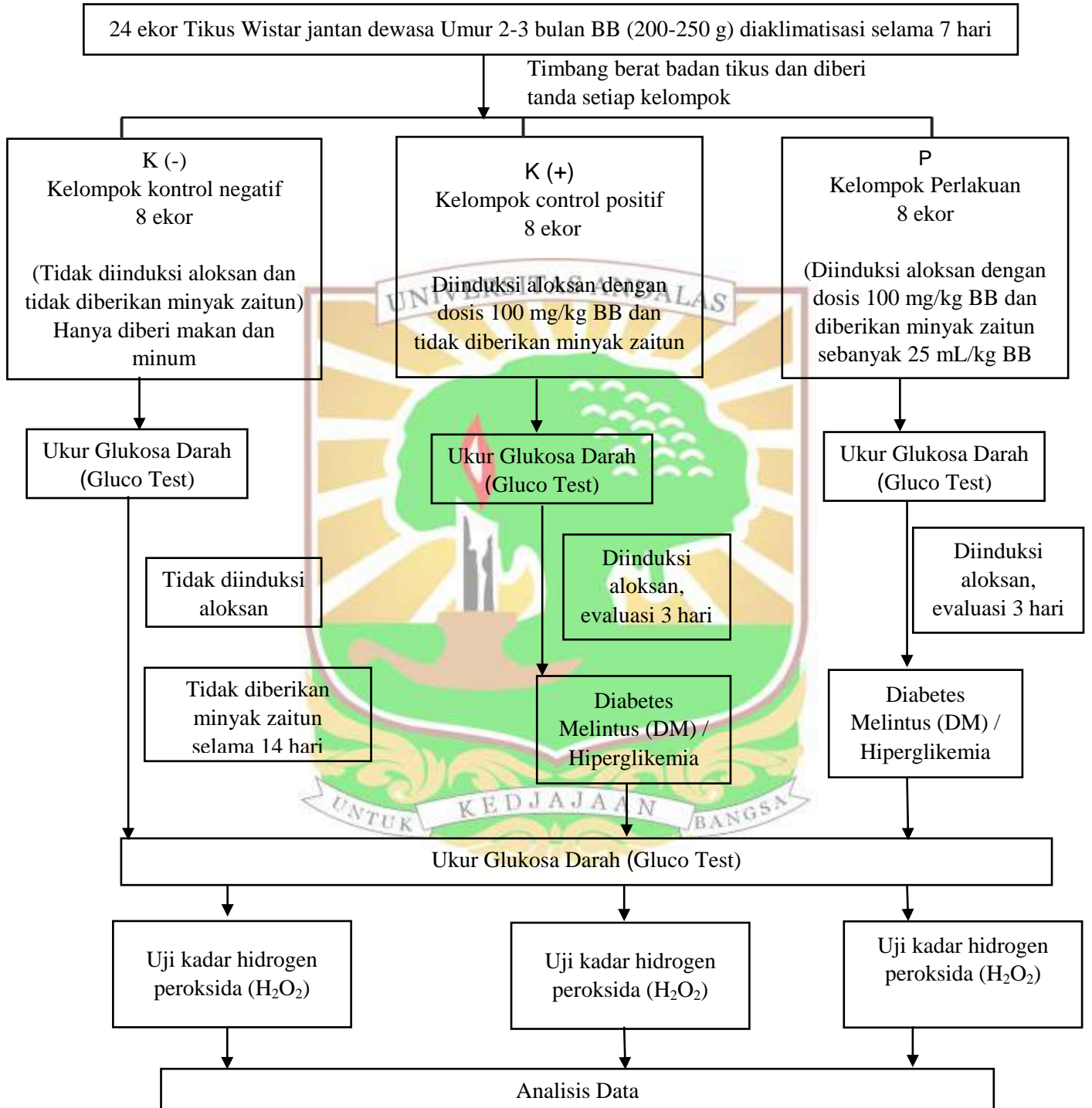
C : The concentration of H₂O₂ standard, 60 mmol/L.

f : The dilution factor of sample before test.

OD : Optic Density



4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1. Skema kerja pemberian minyak zaitun untuk penurunan kadar Hidrogen Peroksida pada tikus Diabetes Melintus (DM) Hiperglikemia

Keterangan : Pada kelompok perlakuan, ambil serum darah dan kemudian diberikan minyak zaitun, dilakukan setelah kadar glukosa darah puasa sudah > 135 mg/dl. Pemberian minyak zaitun dilakukan dengan secara oral setiap hari selama 14 hari. Pada hari ke 15 penelitian, darah diambil dan di pleksus retroorbitalitas masing-masing tikus wistar, selanjutnya dilakukan uji kadar H₂O₂.

4.9 Analisis Data

Data penelitian diolah berdasarkan analisis statistik dengan menggunakan analisis varians (ANOVA) dengan sistem komputerisasi.

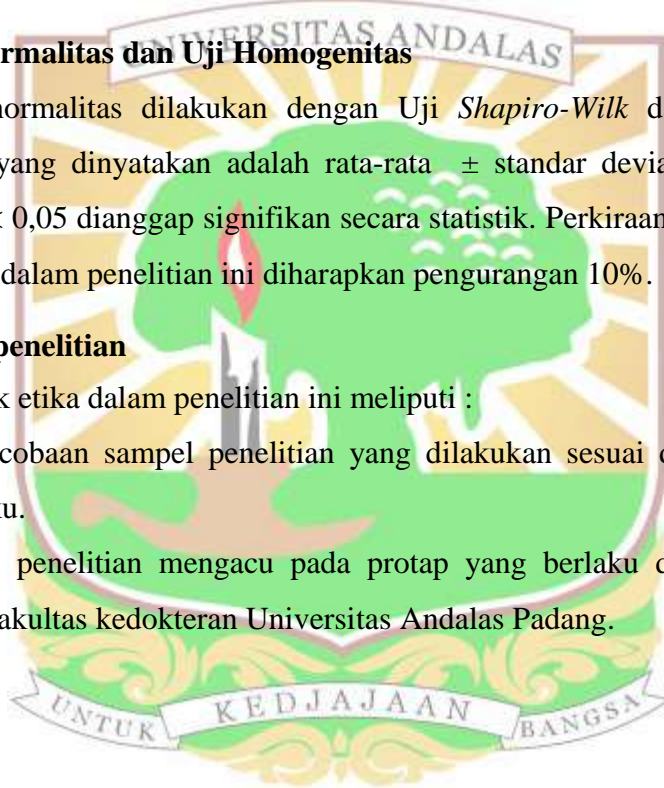
4.9.1 Uji Normalitas dan Uji Homogenitas

Uji normalitas dilakukan dengan Uji *Shapiro-Wilk* dan Uji *Kruskal Wallis*. Data yang dinyatakan adalah rata-rata ± standar deviasi pada sampel (n=8), jika $p < 0,05$ dianggap signifikan secara statistik. Perkiraan gesekan hewan atau kematian dalam penelitian ini diharapkan pengurangan 10%.

4.9.2 Etika penelitian

Aspek etika dalam penelitian ini meliputi :

1. Hewan percobaan sampel penelitian yang dilakukan sesuai dengan protocol yang berlaku.
2. Sisa bahan penelitian mengacu pada protap yang berlaku di Laboratorium Biokimia Fakultas kedokteran Universitas Andalas Padang.



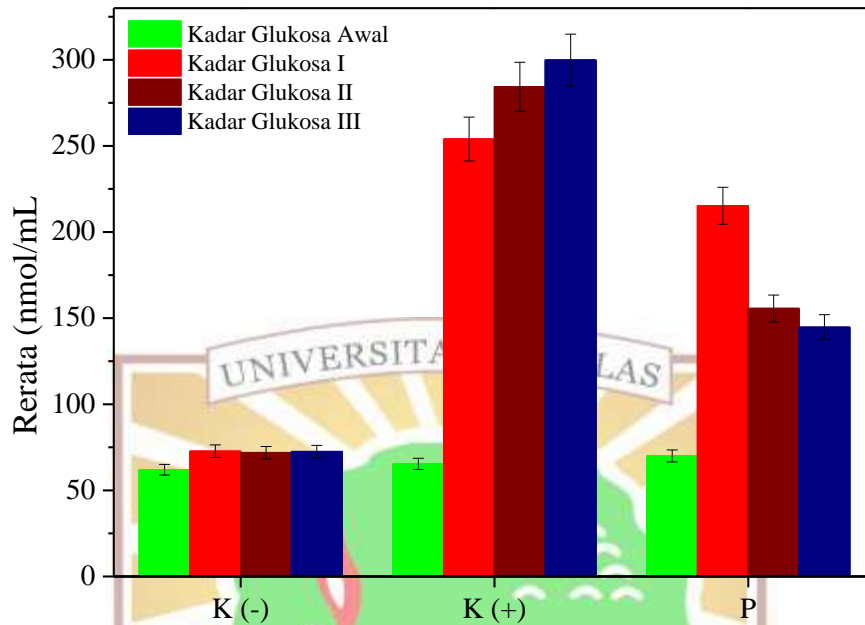
BAB V

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dibawah payung dari penelitian Prof. Dr. Ety Jerizel, M.S, dengan menggunakan *post test only group design* mengikuti Rancangan Acak Lengkap (RAL). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah dengan pemberian minyak zaitun (*Olea europaea*) dapat menurunkan kadar hidrogen peroksida pada hewan percobaan tikus wistar (*rattus novergicus*) yang telah diinduksi aloksan. Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan yang sebelumnya telah dilakukan oleh Ariani (2023) dengan menggunakan objek penelitian tikus wistar jantan berumur 2 - 3 bulan dengan berat badan 200 - 250 gram.⁵⁵ Sampel dibagikan dalam tiga kelompok, masing-masing kelompok berjumlah 8 ekor tikus. Jumlah tikus keseluruhan yang digunakan dalam penelitian sebanyak 24 ekor dengan kondisi sehat, aktif bergerak, berasal dari jenis galu wistar yang sama.

Berdasarkan topik yang diusulkan pada penelitian ini adalah untuk mengamati efek pemberian minyak zaitun (*Olea europaea*) dalam menurunkan kadar hidrogen peroksida pada hewan percobaan tikus wistar (*Rattus novergicus*) yang diinduksi aloksan. Sebelum pengukuran kadar hydrogen peroksida tikus diindikasikan mengalami diabetes melitus / DM atau hiperglikemia, maka perlu dilakukan pengecekan kadar gula darah setiap tahapan proses perlakuan. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan Ariani (2023) diperoleh data-data pengukuran kadar gula darah tikus pada masing-masing kelompok kontrol negative K(-), kontrol positif K(+) dan kelompok perlakuan (P), memiliki perbedaan kadar gula darah pada masing-masing kelompok tersebut, karena mendapat perlakuan yang berbeda-beda, seperti ditampilkan pada gambar 5⁵⁵. Setelah dilakukan analisis berdasarkan gambar 5 dapat digunakan sebagai rujukan untuk memprediksi penelitian lebih lanjut terhadap penentuan kadar hydrogen peroksida pada kelompok K(+) yang diinduksi aloksan dan kelompok P yang

diberi minyak Zaitun sebagai sumber anti oksidan untuk menurunkan kadar hydrogen peroksida. Penurunan kadar hidrogen peroksida diindikasikan dapat menyembuhkan kondisi diabetes melitus atau kondisi hiperglikemia.²⁴



Gambar 5.1. Pemeriksaan Kadar Glukosa Rerata pada Kelompok K(-), K(+) dan P pada Kondisi (awal) (sebelum perlakuan), Kondisi I (3 hari), Kondisi II (10 hari), Kondisi III (14 hari).⁵⁵

Pada Kelompok kontrol negatif (K-) merupakan kelompok normal dari tikus wistar jantan dewasa yang tidak diberi perlakuan aloksan dan tidak diberikan minyak zaitun, hanya diberi makan dan minum. Kelompok ini digunakan sebagai kontrol pembandingan dari pengaruh aloksan dan pengaruh minyak zaitun pada tikus.⁵¹ Pengukuran kadar glukosa darah awal pada kelompok K(-) sampai hari ke -14 menunjukkan rerata (62,00–72,37) mg/dL. Kenaikan kadar gula darah diindikasikan bertambahnya berat badan tikus setelah 14 hari. Namun kadar gula darah kelompok K(-) masih berada dibawah 135 mg/dL, sehingga dapat dikategorikan tikus masih dalam keadaan normal.

Pada kelompok kontrol positif (K+), merupakan kelompok yang dilakukan induksi aloksan dengan dosis 100 mg/kgBB yang diberikan satu kali secara intraperitoneal untuk memberikan efek DM / hiperglikemia pada tikus kelompok K(+) tidak diberi minyak zaitun.⁵² Pemeriksaan kadar gula darah awal pada tikus kelompok K(+) sebesar 65,38 mg/dL. Setelah kelompok tikus wistar ini

mendapat induksi aloksan selama 3 hari dilakukan pengukuran kadar gula darah dan terjadi peningkatan sebesar 254,38 mg/dL. Senyawa aloksan memberi efek positif penyebab kondisi hiperglikemia pada tikus, ditandai dengan kadar gula darah lebih besar dari 200 mg/dL. Pada hari ke-10 perlakuan aloksan terjadi kenaikan kadar gula darah sebesar 284,38 mg/dL. Dan pada hari ke-14 peningkatan kadar gula darah pada kelompok tikus ini terjadi peningkatan sangat tinggi yaitu sebesar 299,88 mg/dL, yang dapat diindikasikan terjadi kondisi stress oksidatif yaitu peningkatan ROS yang menyebabkan keadaan hiperglikemia pada tikus.

Pada kelompok perlakuan (P) merupakan kelompok tikus wistar jantan dewasa hiperglikemia setelah induksi aloksan dosis 100 mg/kgBB dan kemudian diberi perlakuan minyak zaitun secara oral dengan dosis 25 mL setiap hari selama 14 hari.⁵² Pemeriksaan kadar gula darah awal pada kelompok tikus ini menunjukkan kadar gula darah dalam keadaan normal 70,00 mg/dL. Pada hari ke-3 dalam kondisi hiperglikemia dengan kadar gula darah 254,38 mg/dL dan kemudian diberi perlakuan minyak zaitun selama 14 hari, ternyata memberi efek positif dalam penurunan kadar gula darah sebesar 215,25 mg/dL. Pemberian minyak zaitun yang mengandung anti oksidan senyawa polifenol menunjukkan efek positif, dimana pada hari ke-3 telah dapat menurunkan kadar gula darah sebesar 18,18 persen. Pada hari ke-10 dapat menurunkan kadar gula darah sebesar 155,63 mg/dL, sebesar 82,73 persen, jika dibandingkan dengan keadaan diabetes mellitus (DM) pada hari ke-10 sebesar 284,38 mg/dL. Pada hari ke -14 kadar gula darah mengalami penurunan secara berlanjut sebesar 144,75 mg/dL, jika dibandingkan dengan kondisi hiperglikemia terjadi penurunan yang sangat signifikan lebih kurang 100 persen. Namun kondisi hiperglikemia pada tikus belum mencapai kondisi dengan kadar gula darah normal dibawah 200 mg/dL.

5.1 Penentuan Kadar Hidrogen Peroksida (H₂O₂)

Minyak zaitun mengandung senyawa polifenol yang berfungsi sebagai anti oksidan eksogen yang dapat menurunkan kadar ROS hydrogen peroksida (H₂O₂), penyebab terjadi stress oksidatif yang memicu kondisi hiperglikemia.²⁴ Berdasarkan analisis kadar gula darah yang dilakukan pada kelompok K(+) tikus yang diberi induksi aloksan ternyata memiliki kadar glukosa darah puasa ≥ 135

mg/dl, dan diindikasikan dalam kondisi hiperglikemia. Setelah diberi perlakuan anti oksidan minyak zaitun secara oral setiap hari selama 14 hari

ternyata dapat memberikan efek positif pada penurunan kadar gula darah tikus dan diindikasikan terjadi penurunan stress oksidatif ROS hidrogen peroksida (H_2O_2) dalam serum darah. Pengukuran kadar hidrogen peroksida dilakukan pada hari ke-14 setelah perlakuan terhadap 24 ekor tikus wistar jantan dewasa. Pemberian minyak zaitun dilakukan dengan secara oral setiap hari selama 14 hari. Pada hari ke 15 penelitian, serum darah diambil dan di pleksus retroorbitalitas masing-masing tikus wistar, selanjutnya dilakukan uji kadar H_2O_2 dengan metoda spektrofotometer dengan menggunakan pereaksi amonium molibdat pada serapan λ maks = 405 nm. Data-data kadar hidrogen peroksida ditampilkan pada tabel 5.1. Analisis data-data penelitian diolah berdasarkan analisis statistik dengan menggunakan sistem komputerisasi dan semua data dipresentasikan dalam bentuk rata-rata \pm simpangan baku (rata-rata \pm SD).

Tabel 5.1. Uji Laboratorium Hidrogen Peroksida Pada Serum Darah Tikus Wistar

Perlakuan	Kelompok		
	Kontrol Negatif (K-)	Kontrol Positif (K+)	Perlakuan (P)
1	12.4	35.9	16.7
2	16.1	23.6	17.5
3	11.3	21.8	18.7
4	16.5	34.2	18.8
5	13.3	42.1	15.6
6	16.6	25.5	20.3
7	17.5	35.8	15.3
8	15.0	20.2	28.4

5.2 Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Uji normalitas dilakukan dengan Uji *Shapiro-Wilk*, untuk mengamati apakah kadar hidrogen peroksida yang tertera pada tabel 5.1 dari 3 kelompok perlakuan, masing-masing digunakan 8 ekor tikus, terdistribusi secara normal. Pada tabel 5.2 ditampilkan data hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk*.

Tabel 5.2. Uji Normalitas *Shapiro-Wilk* dari Kadar H₂O₂ Pada Serum Darah

Kelompok	n	Kadar H ₂ O ₂ Rerata ± SD	P value
Kontrol negative K (-)	8	0.418	
Kontrol Positif K (+)	8	0.323	p < 0,05
Perlakuan (P)	8	0.022	

Dari uji *Shapiro Wilk* memberikan hasil uji dengan nilai $p < 0,05$, menunjukkan data-data tidak terdistribusi normal. Analisa uji ANOVA tidak memenuhi syarat. Maka uji selanjutnya dapat dilakukan uji *Kruskal Wallis* untuk menentukan perbedaan signifikan kadar hidrogen peroksida setiap kelompok.

Uji *Kruskal Wallis*

Uji *Kruskal Wallis* bertujuan untuk mengetahui perbedaan yang signifikan dari kadar hidrogen peroksida pada setiap kelompok. Uji *Kruskal Wallis* memiliki tingkat kepercayaan 95%.

Tabel 5.3. Uji *Kruskal Wallis* dari Kadar H₂O₂ Pada Serum Darah

Kelompok	n	Kadar H ₂ O ₂ Rerata ± SD mmol/L	P value
Kontrol negative K (-)	8	4.838 ± 2,248	
Kontrol Positif K (+)	8	29,888 ± 8,079	0,001
Perlakuan (P)	8	18,193 ± 4,190	

Berdasarkan uji *Kruskal Wallis* diperoleh nilai $p \text{ value} = 0,001$ atau $p < 0,05$, nilai ini menunjukkan terdapat perbedaan signifikan rerata kadar hidrogen peroksida (H₂O₂) pada setiap kelompok.

Uji *Mann Whitney*

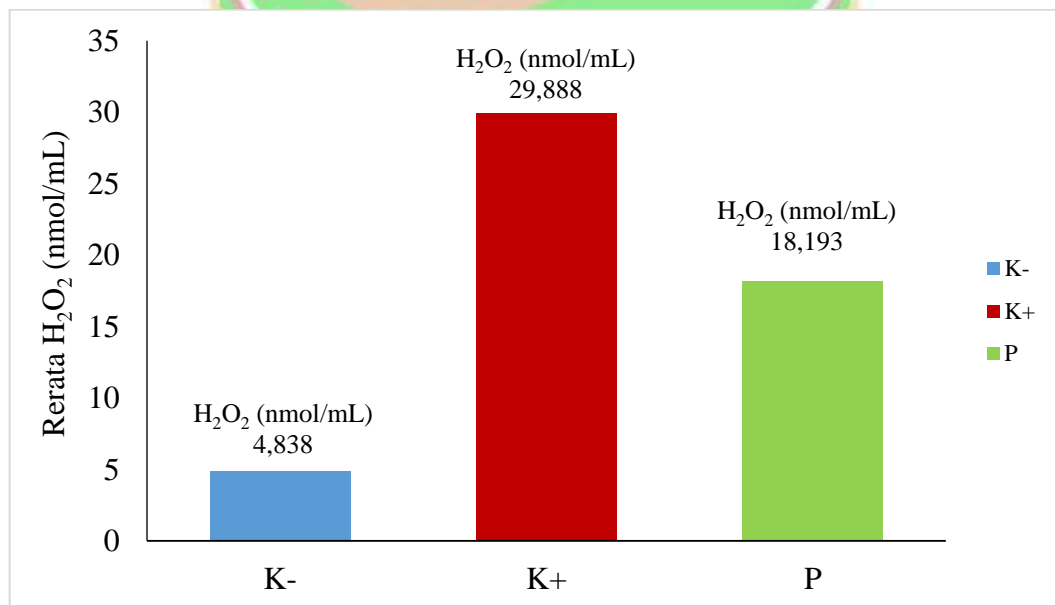
Uji *Mann Whitney* bertujuan untuk mengetahui perbedaan rerata hidrogen peroksida antar kelompok perlakuan.

Tabel 5.4. Uji *Mann Whitney* dari Kadar H_2O_2 Pada Serum Darah

Kelompok	K-	K+	P
K-	-	0,01	0,018
K+	0,01	-	0,05
P	0,018	0,05	-

Berdasarkan uji *Mann Whitney* pada tabel 5.4 menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan kadar hidrogen peroksida antara kelompok kontrol positif (K+) dengan kelompok kontrol negatif (K-) dengan nilai $p = 0,01$. Pada kelompok kontrol positif (K+) dengan kelompok perlakuan (P) juga terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai $p = 0,05$. Analisis data dari kadar hidrogen peroksida dari penelitian ini terdapat perbedaan rata-rata pada $p \leq 0,05$ maka hasil penelitian dianggap bermakna (signifikan).

Pada gambar 5.2 menunjukkan uji *Kruskal Wallis*, dimana terdapat perbedaan rerata kadar hidrogen peroksida (H_2O_2) pada tiap kelompok tikus K(-), K(+) dan P. Hal ini dapat dibuktikan dengan p value = 0,001 atau $p < 0,05$.



Gambar 5.2 . Perbedaan rerata kadar hidrogen peroksida (H_2O_2) pada tiap kelompok tikus K(-), K(+) dan P

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan penelitian dibawah payung penelitian dari Prof. Dr. Ety Jerizel, M.S, dan melanjutkan penelitian yang telah dilakukan oleh Ariani (2023), dengan menggunakan tikus wistar jantan berjumlah sebanyak 24 ekor sebagai sampel dalam penelitian ini dengan kondisi sehat, aktif bergerak. Tikus wistar jantan dibagi kedalam 3 kelompok yaitu K(-), K(+) dan P.⁵⁴ Kelompok kontrol negatif (K-) merupakan kelompok normal sebagai pembanding, hanya diberi makan dan minum.⁵¹ Kelompok kontrol positif (K+), merupakan kelompok yang dilakukan induksi aloksan dengan dosis 100 mg/kgBB untuk memberikan efek hiperglikemia pada tikus wistar. Dan kelompok perlakuan (P) merupakan kelompok hiperglikemia dan kemudian diberi perlakuan minyak zaitun secara oral sebanyak 0,45 mL/hari – 0,56 mL/hari.⁵¹ Perlakuan dilakukan selama 14 hari, dan pada hari ke 15 pada ke-24 ekor tikus wistar dianalisis sampel darah untuk mengamati sejauh mana efek dari pemberian minyak zaitun (*Olea europaea*) dalam penurunan kadar hydrogen peroksida (H₂O₂) yang merupakan tujuan dari penelitian ini.

Hidrogen peroksida merupakan salah satu ROS yang dapat terbentuk ketika dilakukan induksi aloksan. Peningkatan hidrogen peroksida dapat menyebabkan stress oksidatif sel, menimbulkan kerusakan sel β pancreas, sehingga sekresi insulin tidak normal dan kecendrungan untuk menimbulkan hiperglikemia. Aloksan merupakan zat diabetogenik yang dapat mempercepat terjadi hiperglikemia pada hewan percobaan secara eksperimental, karena aloksan memiliki struktur kimia sama dengan glukosa.³² Peningkatan ROS disebabkan karena ketidakseimbangan produksi ROS dengan anti oksidan endogen seperti, enzim katalase (CAT), enzim superoksida dismutase (SOD), glutathione peroksidase (GSH-Px) dan disebut dengan stress oksidatif.²³ Ore A et al., (2019), membuktikan bahwa stress oksidatif merupakan salah satu faktor yang berperan penting dalam perkembangan beberapa penyakit antara lain diabetes mellitus

(DM).²⁶ Diabetes melitus merupakan penyakit metabolik yang ditandai dengan peningkatan kadar gula darah ≥ 200 mg/dl. Keadaan ini disebabkan oleh berkurangnya sekresi insulin oleh sel pancreas karena terjadi abnormalitas metabolisme pada lipid, protein dan DNA.⁷ Dari hasil penelitian yang dilakukan Ariani (2023), melaporkan bahwa induksi aloksan pada tikus wistar jantan kelompok K(+), setelah 3 hari terjadi peningkatan kadar gula darah dari kadar gula darah awal 65,38 mg/dL menjadi 254,38 mg/dL. Pada hari ke-10 kenaikan kadar gula darah meningkat sebesar 284,38 mg/dL dan pada hari ke-14 peningkatan kadar gula darah terjadi peningkatan sangat signifikan yaitu sebesar 299,88 mg/dL. Berdasarkan peningkatan gula darah ≥ 200 mg/dl menunjukkan indikasi terjadi kondisi stress oksidatif yaitu peningkatan ROS yang menyebabkan keadaan hiperglikemia pada tikus. Peningkatan kadar gula darah terkait dengan penurunan sensitivitas jaringan sel terhadap insulin. Pada keadaan normal, didalam tubuh terjadi mekanisme regulasi dan interaksi yang dinamis antara sensitivitas jaringan terhadap insulin dan sekresi insulin oleh pankreas untuk menjaga keseimbangan konsentrasi glukosa plasma darah. Pada kondisi DM sistim ini tidak berjalan dengan baik dan terjadi kegagalan sekresi insulin melalui disfungsi sel β -pankreas. Defisiensi insulin menyebabkan terjadi kerusakan pada sel β -pankreas dan pemicu terjadinya kondisi hiperglikemia.²⁷

6.1 Efek Antioksidan Minyak Zaitun Terhadap Hidrogen Peroksida

Berdasarkan analisis kadar gula darah yang dilakukan pada kelompok tikus kontrol positif K(+) yang diinduksi dengan aloksan dosis 100 mg/kg BB, menyebabkan terjadi peningkatan kadar gula darah ≥ 200 mg/dl, kondisi ini diindikasikan sebagai keadaan tikus hiperglikemia. Pada penelitian ini dilakukan pengujian apakah dengan pemberian minyak zaitun (*Olea europaea*) dapat menurunkan kadar hydrogen peroksida (H_2O_2) selama masa perlakuan 14 hari. Uji kadar H_2O_2 dilakukan dengan metoda spektrofotometer dengan menggunakan pereaksi amonium molibdat dengan serapan pada λ maks = 405 nm. Data-data pengukuran kadar hidrogen peroksida (H_2O_2) ditampilkan pada tabel 5.1 .

Pada kelompok perlakuan (P) merupakan kelompok tikus wistar jantan dewasa hiperglikemia diberi perlakuan minyak zaitun secara oral dengan dosis 25 mL/kg BB selama 14 hari.⁵² Data-data hasil penelitian berdasarkan uji *Kruskal*

Wallis, menunjukkan perbedaan signifikan rerata kadar hidrogen peroksida (H_2O_2) pada setiap kelompok tikus wistar, dibuktikan dengan p value = 0,001 atau $p \leq 0,05$. Berdasarkan tabel 5.3, kelompok tikus K (-) memiliki rerata kadar hidrogen peroksida (H_2O_2) paling rendah $4.838 \pm 2,248$ nmol/L, kelompok perlakuan (P) memiliki rerata kadar hidrogen peroksida (H_2O_2) $18,193 \pm 4,190$ nmol/L terjadi penurunan kadar hidrogen peroksida (H_2O_2) setelah diberikan anti oksidan minyak zaitun, jika dibandingkan dengan kelompok hiperglikemia kontrol K(+) sebesar $29,888 \pm 8,079$ nmol/L. Analisis data rerata kadar hydrogen peroksida (H_2O_2) bersinergi dengan penurunan kadar gula darah pada kelompok perlakuan (P) setelah diberikan minyak zaitun selama 14 hari, menurun dari 284,38 mg/dL menjadi 144,75 mg/dl, seperti ditampilkan pada gambar 5.3. Setelah dilanjutkan uji Mann Whitney menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan kadar hidrogen peroksida (H_2O_2) antara kelompok kontrol positif (K+) dengan kelompok kontrol negatif (K-) dengan nilai $p = 0,01$. Pada kelompok kontrol positif (K+) dengan kelompok perlakuan (P) juga terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai $p = 0,05$. Analisis data dari kadar hydrogen peroksida (H_2O_2) dalam penelitian ini menunjukkan perbedaan rata-rata pada $p \leq 0,05$, maka hasil penelitian dari perlakuan pemberian minyak zaitun bermakna dan signifikan pengaruhnya.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa anti oksidan dari minyak zaitun dapat memberikan efek positif pada penurunan kadar gula darah tikus dan diindikasikan dengan terjadi penurunan stress oksidatif ROS hidrogen peroksida (H_2O_2) dalam serum darah tikus wistar. Reaktivitas radikal bebas menimbulkan reaksi yang bersifat terus berlanjut dan dapat berhenti apabila reaktivitasnya dihambat oleh senyawa yang bersifat antioksidan. Keadaan stress oksidatif membawa pada kerusakan oksidatif mulai dari tingkat sel, jaringan sampai ke organ tubuh. Kondisi sel-sel yang rusak inilah yang akhirnya penyebab dari penyakit metabolik.²⁴

Beberapa peneliti telah merekomendasikan menggunakan obat herbal sebagai antioksidan alami yang berasal dari tumbuh-tumbuhan. Pada tumbuh-tumbuhan terdapat kandungan fitokimia berupa senyawa metabolit sekunder yaitu senyawa polifenol antara lain fenolik, alkaloid dan flavanoid yang dapat berfungsi

sebagai antioksidan eksogen untuk menangkal radikal bebas (ROS) dan kerusakan sel.¹¹ Coria-Tellez et al., (2018), melaporkan telah menggunakan tanaman Zaitun (*Olea europaea L.*) sebagai sumber antioksidan untuk diabetes, antihipertensi, aterosklerosis, karena diduga terdapat kandungan metabolit sekunder flavonoid^{12,13} Minyak Zaitun (*Olea europaea*) telah dikenal berkhasiat untuk kesehatan, karena minyak Zaitun diketahui memiliki kandungan senyawa Fenolik yang tinggi dan senyawa asam Oleat.²¹



BAB VII

PENUTUP

7.1 KESIMPULAN

Dari hasil penelitian untuk menguji efek pemberian minyak Zaitun terhadap penurunan kadar ROS Hidrogen peroksida sebagai biomarker hiperglikemia pada tikus wistar dapat diambil kesimpulan

1. Pemberian minyak zaitun sebagai sumber anti oksidan alami efektif untuk menurunkan kadar hidrogen peroksida pada tikus hiperglikemia dengan indikasi penurunan kadar gula darah dua kali lebih rendah selama 14 hari perlakuan.
2. Terdapat perbedaan penurunan kadar hidrogen peroksida dari setiap kelompok secara signifikan dengan rerata $p \leq 0,05$.

7.2 SARAN

Penelitian untuk mengetahui efek minyak zaitun terhadap penurunan kadar gula darah sebagai prediksi untuk mengetahui penurunan kadar hidrogen peroksida sebagai indikator stress oksidatif yang menyebabkan hiperglikemia pada tikus wistar. Perlakuan dapat dilakukan pada interval waktu lebih dari 14 hari, untuk mendapatkan kadar gula darah normal dibawah 135 mg/dL.

DAFTAR PUSTAKA

1. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):R453–62.
2. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9–19.
3. Noori S. An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. *J Clin Cell Immunol*. 2012;01(08):1–9.
4. Krishnamurthy P, Wadhvani A. Antioxidant Enzymes and Human Health. *Antioxid Enzym*. 2012;3–18.
5. Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of catalase in oxidative stress-and age-associated degenerative diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:1–19.
6. Khangholi S, Majid FAA, Berwary NJA, Ahmad F, Aziz RBA. The Mechanisms of Inhibition of Advanced Glycation End Products Formation through Polyphenols in Hyperglycemic Condition. *Planta Med*. 2015;82(1–2):32–45.
7. Alshammari TM. Patient's medicinal knowledge in Saudi Arabia: Are we doing well? *Saudi Pharm J*. 2016;24(5):560–2.
8. Hosseinpour-Niazi S, Mirmiran P, Abd-Mishani M, Azizi F. Effect of dairy products on oxidative stress in type 2 diabetic patients: A randomized controlled clinical trial. *Nutr Clin Metab*. 2019;33(3):212–6.
9. Cheng HC, Chang TK, Su WC, Tsai HL, Wang JY. Narrative review of the influence of diabetes mellitus and hyperglycemia on colorectal cancer risk and oncological outcomes. *Transl Oncol*. 2021;14(7):101089.
10. Harris CS, Beaulieu LP, Fraser MH, McIntyre KL, Owen PL, Martineau LC, et al. Inhibition of advanced glycation end product formation by medicinal plant extracts correlates with phenolic metabolites and

- antioxidant activity. *Planta Med.* 2011;77(2):196–204.
11. Zhao H, Li J, Zhang J, Wang X, Hao L, Jia L. Purification, in vitro antioxidant and in vivo anti-aging activities of exopolysaccharides by *Agroclybe cylindracea*. *Int J Biol Macromol.* 2017;102:351–7.
 12. Coria-Télez A V., Montalvo-González E, Yahia EM, Obledo-Vázquez EN. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arab J Chem.* 2018;11(5):662–91.
 13. Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem.* 2017;398(10):1095–108.
 14. Muqsita V, Sakinah EN, Santosa A. Efek Ekstrak Etanol Kayu Manis (*Cinnamomum burmannii*) terhadap Kadar MDA Ginjal pada Tikus Wistar Hiperglikemi. *e-Jurnal Pustaka Kesehatan.* 2015;3(2):235–8.
 15. Parwata IMO, Manuaba IBP, Yasa IWPS, Wita IW. Gaharu Leaf Extract Water Reduce MDA and 8-OHdG Levels and Increase Activities SOD and Catalase in Wistar Rats Provided Maximum Physical Activity. *Bali Med J.* 2016;5(3):79.
 16. Wahdaningsih S, Untari EK. Pengaruh Pemberian Fraksi Metanol Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyhizus*) Terhadap Kadar Malondialdehid Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar Yang Mengalami Stres Oksidatif. *Res Artic Nomor.* 2016;3(1):45–55.
 17. Rus A, Molina F, Martínez-Ramírez MJ, Aguilar-Ferrándiz ME, Carmona R, Moral ML Del. Effects of olive oil consumption on cardiovascular risk factors in patients with fibromyalgia. *Nutrients.* 2020;12(4):1–13.
 18. Cahyani WU, Darmawan A, Suci D margi. Suplementasi Ekstrak Asam Kandis (*Garcinia xanthochymus*) dalam Air Minum terhadap Kadar Malondialdehid Kuning Telur dan Komposisi Kimia Daging dan Telur Puyuh. *J Ilmu Nutr dan Teknol Pakan.* 2021;19(1):24–9.
 19. Armaini A, Dharma A, Salim M. The nutraceutical effect of *Scenedesmus dimorphus* for obesity and nonalcoholic fatty liver disease-linked metabolic syndrome. *J Appl Pharm Sci.* 2020;10(5):70–6.

20. Armaini A, Imelda I. The protective effect of *Scenedesmus dimorphus* polysaccharide as an antioxidant and antiaging agent on aging rat model induced by D-galactose. *J Appl Pharm Sci*. 2021;11(5):54–63.
21. Giannakopoulos E, Salachas G, Zisimopoulos D, Barla SA, Kalaitzopoulou E, Papadea P, et al. Long-Term Preservation of Total Phenolic Content and Antioxidant Activity in Extra Virgin Olive Oil: A Physico-biochemical Approach. *Free Radicals Antioxidants*. 2020;10(1):04–9.
22. Husna F, Suyatna FD, Arozal W, Purwaningsih EH. Model Hewan Coba pada Penelitian Diabetes Animal Model in Diabetes Research. *Mini Rev Artic Pharm Sci Res*. 2019;6(3):131–41.
23. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med [Internet]*. 2018;54(4):287–93.
24. Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci*. 2018;63(1):68–78.
25. Ore A, Akinloye OA. Oxidative stress and antioxidant biomarkers in clinical and experimental models of non-alcoholic fatty liver disease. *Med*. 2019;55(2).
26. Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017.
27. Prawitasari DS. Schleiss, M.R., 2007. *Infectious Disease: Antibiotic Therapy*. Nelson Textbook Of Pediatrics. 18th ed. Elsevier. 2019;1(1):47–51.
28. Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules*. 2015;5(1):194–222.
29. Ghosh A, Misra A. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on

- Elsevier Connect , the company ' s public news and information .
2020;(January):2020–2.
30. Atlas IDFD. International Diabetes Federation. Vol. 266, The Lancet. 1955. 134–137.
 31. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2015;38(January):S8–16.
 32. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):216–26.
 33. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001;50(6):537–46.
 34. Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods et]*. 2015;18:757–81.
 35. Rizkiyah M, Oktiani BW, Wardani IK. Prevalensi Dan Analisis Faktor Risiko Kejadian Gingivitis Dan Periodontitis Pada Pasien Diabetes Melitus (Literature Review). *Dentin*. 2021;5(1):32–6.
 36. Stephenie S, Chang YP, Gnanasekaran A, Esa NM, Gnanaraj C. An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. *J Funct Foods* . 2020;68(March):103917.
 37. Pérez-Torres I, Soto ME, Castrejón-Tellez V, Rubio-Ruiz ME, Manzano Pech L, Guarner-Lans V. Oxidative, reductive, and nitrosative stress effects on epigenetics and on posttranslational modification of enzymes in cardiometabolic diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020.
 38. Munjiati NE. Pengaruh Pemberian Streptozotocin Dosis Tunggal terhadap Kadar Glukosa Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*). *Meditory J Med Lab*. 2021;9(1):62–7.
 39. Sharapov MG, Goncharov RG, Gordeeva AE, Novoselov VI, Antonova OA, Tikhaze AK, et al. Enzymatic antioxidant system of endotheliocytes. *Dokl Biochem Biophys*. 2016;471(1):410–2.
 40. Loffredo L, Perri L, Nocella C, Violi F. Antioxidant and antiplatelet activity by polyphenol-rich nutrients: focus on extra virgin olive oil and cocoa. *Br J Clin Pharmacol*. 2017;83(1):96–102.
 41. Donat-Vargas C, Sandoval-Insausti H, Peñalvo JL, Moreno Iribas MC,

- Amiano P, Bes-Rastrollo M, et al. Olive oil consumption is associated with a lower risk of cardiovascular disease and stroke. *Clin Nutr.* 2022;41(1):122–30.
42. Zulaikhah ST. The Role of Antioxidant to Prevent Free Radicals in The Body. *Sains Med.* 2017;8(1):39.
 43. Basdeki E, Salis C, Hagidimitriou M. The effects of Mediterranean diet and EVOO consumption in relation to human health. *Not Sci Biol.* 2020;12(3):466–85.
 44. Yubero-Serrano EM, Lopez-Moreno J, Gomez-Delgado F, Lopez-Miranda J. Extra virgin olive oil: More than a healthy fat. *Eur J Clin Nutr.* 2019;72:8–17.
 45. Eneh FU, Nwenyi V. Inflammatory and Lipid Peroxidation effects of Canola Oil , Extra Virgin Olive Oil , and Sunflower Oil on Albino Rats Fed With the Oils Inflammatory and Lipid Peroxidation effects of Canola Oil , Extra Virgin Olive Oil , and Sunflower Oil on Albino Rats Fed W. 2020;(July).
 46. de Souza PAL, Marcadenti A, Portal VL. Effects of olive oil phenolic compounds on inflammation in the prevention and treatment of coronary artery disease. *Nutrients.* 2017;9(10).
 47. Summerhill V, Karagodin V, Grechko A, Myasoedova V, Orekhov A. Vasculoprotective Role of Olive Oil Compounds via Modulation of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med.* 2018;5(December):1–10.
 48. Estruch R, Lamuela-Raventós RM, Ros E. The Bitter Taste of Extra Virgin Olive Oil for a Sweet Long Life. *J Am Coll Cardiol.* 2020;75(15):1740–2.
 49. Cicerale S, Lucas L, Keast R. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int J Mol Sci.* 2010;11(2):458–79.
 50. Fatima K, Rashid AM, Memon UAA, Fatima SS, Javaid SS, Shahid O, et al. Mediterranean Diet and its Effect on Endothelial Function: A Meta-analysis and Systematic Review. *Ir J Med Sci [Internet].* 2023;192(1):105–13.
 51. Pratama RR, Yerizel E, Rahmatini R. Pengaruh Pemberian Aspartam terhadap Kadar Low-Density Lipoprotein dan High-Density Lipoprotein

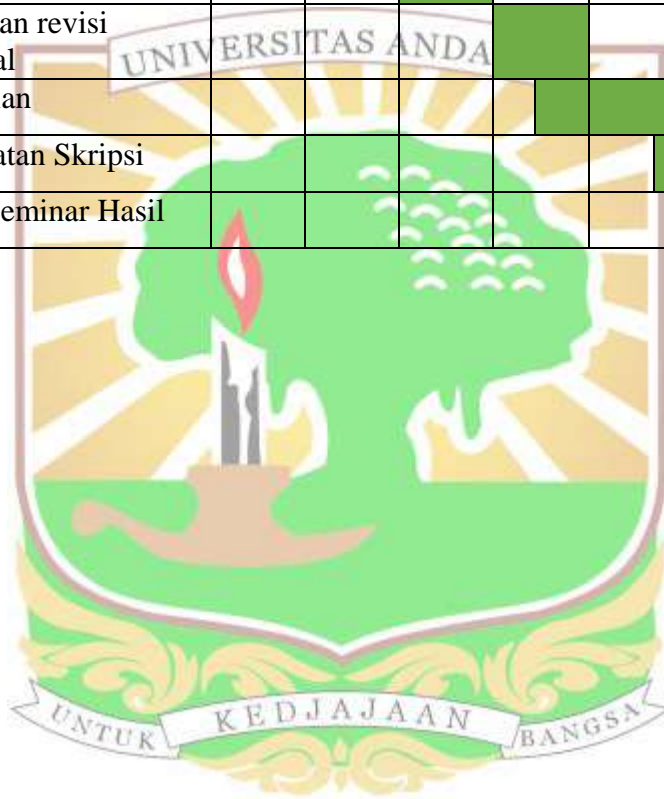
- pada Tikus Wistar Diabetes Melitus Diinduksi Aloksan. *J Kesehat Andalas*. 2014;3(3):450–6.
52. Yuliasuti D, Sari WY, Muna N. Efek pemberian jus buah kelengkeng terhadap kadar gula darah mencit yang diinduksi aloksan. *J Farmasetis Vo*. 2020;9(2):131–8.
53. Gaforio JJ, Visioli F, Alarcón-De-la-lastra C, Castañer O, Delgado-Rodríguez M, Fitó M, et al. Virgin olive oil and health: Summary of the iii international conference on virgin olive oil and health consensus report, JAEN (Spain) 2018. *Nutrients*. 2019;11(9):1–33.
54. Elabscience, Hydrogen Peroxide (H₂O₂) Fluorometric Assay Kit. www.elabscience.com. 2019.
55. Ariani. Uji efektifitas antioksidan minyak zaitun terhadap Malondialdehyde (MDA), aktifitas katalase dan Glutathione Peroksidase pada tikus hiperglikemia. Tesis, Universitas Andalas; 2023.



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Time Schedule

No.	Uraian	2022		2023			2024	
		1	2-12	1-6	7-8	8-12	11-4	5
1	Pengesahan Judul							
2	Pencarian literatur							
3	Pembuatan Proposal							
4	Ujian dan revisi Proposal							
5	Penelitian							
6	Pembuatan Skripsi							
7	Ujian Seminar Hasil							



Lampiran 2. Rincian Biaya Penelitian

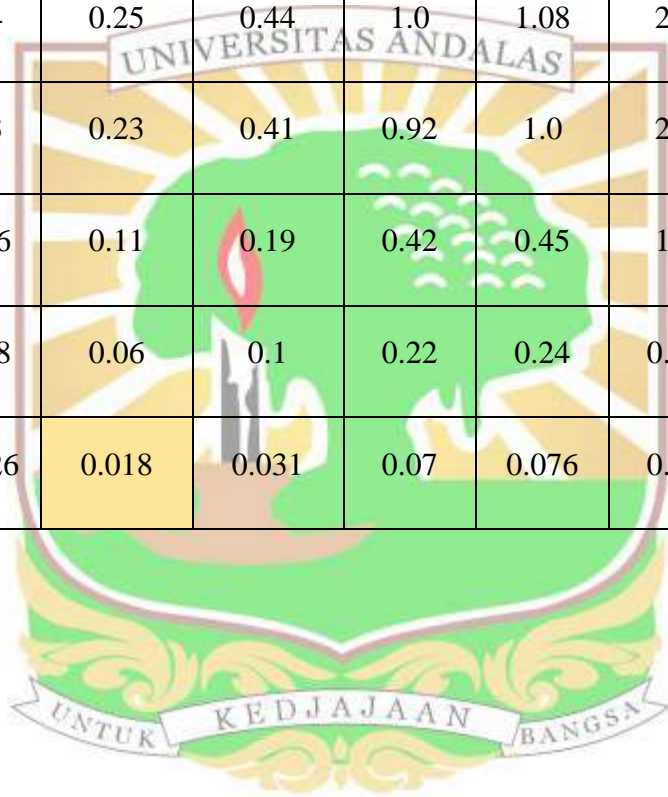
Rincian pemakaian dana sementara untuk penelitian:

No.	Kegiatan	Unit	Jumlah
1	Biaya Cetak Skripsi	12	Rp. 400.000,-
2	Biaya Penelitian	1	Rp. 1.200.000,-
3	Transportasi	-	Rp. 100.000,-
TOTAL			Rp 1.700.000,-



Lampiran 3. Tabel Konversi Perhitungan Dosis Pemberian aloksan

FK	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmot 400g	Kelinci 1.5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 g	1.0	7.0	12.25	27.8	29.7	64.1	124.2	387.9
Tikus 200 g	0.14	1.0	1.74	3.9	4.2	9.2	17.8	56.0
Marmot 400 g	0.08	0.57	1.0	2.25	2.4	5.2	10.2	31.5
Kelinci 1.5 kg	0.04	0.25	0.44	1.0	1.08	2.4	4.5	14.2
Kucing 2 kg	0.03	0.23	0.41	0.92	1.0	2.2	4.1	13.0
Kera 4 kg	0.016	0.11	0.19	0.42	0.45	1.0	1.9	6.1
Anjing 12 kg	0.008	0.06	0.1	0.22	0.24	0.52	1.0	3.1
Manusia 70 kg	0.0026	0.018	0.031	0.07	0.076	0.16	0.32	1.0



Lampiran 4. Kode Etik Penelitian Payung Ariani



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ANDALAS
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN

Alamat : Kampus Universitas Andalas, Limau Manis Padang Kode Pos 25163
Telepon : 0751-31746, Faksimile : 0751-32838, Dekan : 0751-39844
Laman : <http://fk.unand.ac.id> e-mail : dekanat@fk.unand.ac.id

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
DESCRIPTION OF ETHICAL APPROVAL

No : 1051 /UN.16.2/KEP-FK/2022

Tim Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, dalam upaya melindungi Hak Azazi dan Kesejahteraan Subjek Penelitian kedokteran/kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol penelitian dengan judul : *The Research Ethics Committee of Medical Faculty Andalas University, in order to protect human rights and welfare of medical/health research subject, has carefully reviewed the research protocol entitled :*

Uji Efektivitas Antioksidan Minyak Zaitun terhadap Malondialdehyde (MDA), Aktivitas Katalase, dan Glutathion Peroxidase pada Tikus Hiperglikemia

Nama Peneliti Utama : dr. Ariani Zaltin Okvenda
Principal Researcher

Nama Institusi : Program Studi Ilmu Biomedis Program Magister
Institution

Protokol Penelitian tersebut dapat disetujui pelaksanaannya
and approved the research protocol.

Padang, 28 November 2022

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas
Dean of Medical Faculty Andalas University

Ketua
Chairman

Dr. dr. Afriwardi, SH, Sp.KO, MA
NIP. 196704211997021001



Dr. dr. Yuliarni Syafrita, Sp.S (K)
NIP. 196407081991032001

Keterangan/notes:

Keterangan lolos kaji etik ini berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan.
This ethical approval is effective for one year from the due date.

Jika ada kejadian serius yang tidak diinginkan (KTD) harus segera dilaporkan ke Komisi Etik Penelitian.
If there are Serious Adverse Events (SAE) should be immediately reported to the Research Ethics Committee.

Lampiran 5. Surat Izin Penelitian

SURAT PERMOHONAN PENGAMBILAN DATA / PENELITIAN

Nama : Yorencia Akmal

No. BP : 1910313040

Program Studi : Pendidikan Dokter

Alamat : Kompleks Kehakiman E.11, RT/RW.05, Cengkeh Nan XX, Lubuk Begalung, Padang

No. HP / e-Mail : 081270715708

Pembimbing 1 : dr. husnil Kadri, M.Kes

Pembimbing 2 : Dr. Almurdi, DMM, M.Kes

Melaksanakan Kegiatan : Pengambilan Data / Penelitian

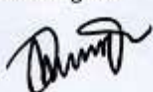
Ditujukan kepada : Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran, Unand

Dalam rangka : Pembuatan Proposal / Hasil Skripsi

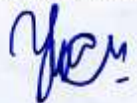
Judul : Efek Pemberian Minyak Zaitun (*Olea europaea*) Terhadap Kadar Hidrogen Peroksida Pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Aloksan

Padang, September 2023

Mengetahui,
Pembimbing I/II


(Dr. Almurdi, DMM, M.Kes)

Saya yang memohon,


(Yorencia Akmal)

Tembusan :

- 1.
- 2.

Lampiran 6. Surat Bebas Laboratorium Biokimia

LABORATORIUM BOKIMIA
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS ANDALAS
Jl. Kampus Unand Limau Manis Padang.

SURAT KETERANGAN
No : 26/PJ/LBK-FKA/2023

Yang bertanda tangan dibawah ini menerangkan bahwa :

Nama : Yorencia Akmal
No. BP : 1910313040
Pekerjaan : Mhs. S-1 Pendidikan Dokter, FK Unand

Telah melakukan Penelitian/Pemeriksaan kadar hidrogen peroksida dalam serum darah di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Andalas pada tanggal 5 September 2023.

Surat keterangan ini digunakan untuk melengkapi persyaratan dalam menyusun Skripsi dengan Judul "Efek pemberian minyak zaitun (*olea europaea*) terhadap kadar hidrogen peroksida pada tikus wistar (*rattus novergicus*) yang diinduksi aloksan".

Demikianlah surat keterangan ini dibuat agar dapat dipergunakan sebagai mana mestinya, atas perhatian dan kerja samanya diucapkan terima kasih.

Padang, 26/ September 2023
Kepala Laboratorium
dr. Husnil Kadri, M.Kes
197011262000121002



Lampiran 7 : Dokumentasi



