

**EFEK PEMBERIAN NEUROVIT E TERHADAP AKTIVITAS
HIPOGLIKEMIK GLIBENKLAMID PADA TIKUS JANTAN
GALUR SPRAGUE – DAWLEY**

SKRIPSI



**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
JOGJAKARTA
April 2006**

**EFEK PEMBERIAN NEUROVIT E TERHADAP AKTIVITAS
HIPOGLIKEMIK GLIBENKLAMID PADA TIKUS JANTAN
GALUR SPRAGUE – DAWLEY**

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi
(S.Farm) Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia Jogjakarta



**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA**

JOGJAKARTA

April 2006

SKRIPSI

**EFEK PEMBERIAN NEUROVIT E TERHADAP AKTIVITAS
HIPOGLIKEMIK GLIBENKLAMID PADA TIKUS JANTAN
GALUR SPRAGUE – DAWLEY**

Yang diajukan oleh

DWI YULIANTINO PUTRA

01 613 198

Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,



Endang Darmawan, M.Si., Apt



M. Hatta Prabowo, S.F., Apt.

**LEMBAR PENGESAHAN PENGUJI
SKRIPSI**

**EFEK PEMBERIAN NEUROVIT E TERHADAP AKTIVITAS
HIPOGLIKEMIK GLIBENKLIAMID PADA TIKUS JANTAN
GALUR SPRAGUE - DAWLEY**

Oleh
DWI YULIANTINO PUTRA
01 613 198

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 22 April 2006

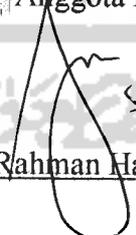
Ketua Penguji,



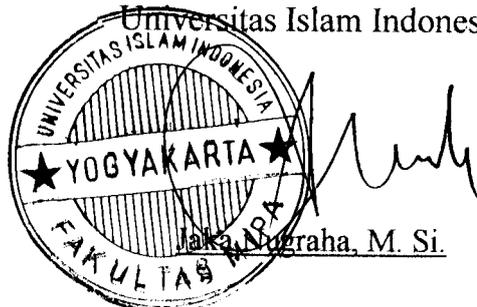
Endang Darmawan, M.Si., Apt

Anggota Penguji,

Anggota Penguji,

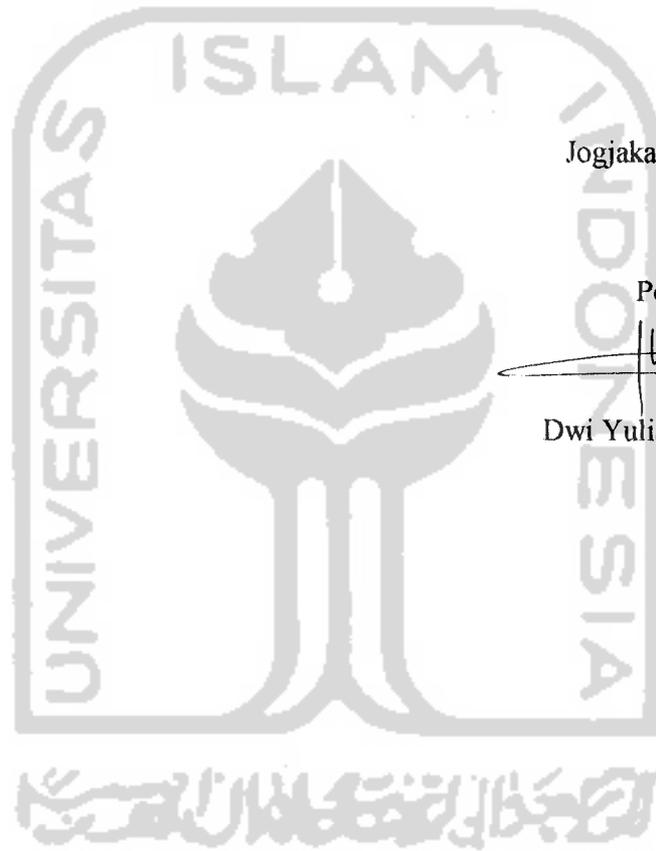

M. Hatta Prabowo S.F., Apt.
Arief Rahman Hakim, M.Si., Apt

Mengetahui
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia



PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya, juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.



Jogjakarta, April 2006

Penulis

Dwi Yuliantino Putra

PERSEMBAHAN

IT NEVER TO LATE TO MEND

(tidak pernah terlambat untuk memperbaiki diri)

Skripsiku ini kupersembahkan untuk :

Allah Yang Maha Pengasih, Maha Mengetahui dan Maha Pengampun yang selalu berada di sisiku di saat aku susah dan senang.....

Ampunkanlah segala dosaku.....

Orang Tuaku yang selalu mendukungku dan mendoakan kuAku sayang kalian

Abangku (eko), Adik-adikku (Puput dan Lia), Kalian saudaraku yang paling baik.....

My "Erma" ku terima kasih atas kesabaran dan ketulusannya dalam membantuku menyelesaikan karya ku ini.....

Teman-Teman Ngelab ku: luki, eny dan mani.....tanpa kalian aku gak tau apa aku bisa menyelesaikan penelitian initrima kasih.....

Temen-temen Farmasi'01.....trima kasih atas dukungannya....

Dan semua orang yang memberikan bantuannya atas terciptanya skripsi ini.....

I love u alllll.....

KATA PENGANTAR



Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Syukur Alhamdulillah penulis ucapkan karena berkat Rahmat, anugerah dan Bimbingan-Nya serta Sholawat dan Salam semoga senantiasa tercurahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad. SAW sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi dengan judul “Efek Pemberian Neurovit E Terhadap Aktivitas Hipoglikemia Glibenklamid pada Tikus Putih Jantan Galur Sprague – Dawlley” dengan baik dan sesuai dengan waktu yang diharapkan. Skripsi ini merupakan laporan hasil penelitian yang dimaksudkan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi (S.Farm) program studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia (FMIPA UII). Dengan skripsi ini diharapkan mahasiswa mampu memahami lebih jauh dan menerapkan salah satu ilmu yang pernah diperoleh selama proses pendidikan.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini tentunya masih memiliki banyak kekurangan. Hal ini disebabkan kurangnya dan keterbatasan kemampuan serta pengetahuan yang penulis miliki. Masukan saran dan kritik merupakan sesuatu yang berharga bagi penulis guna memperbaiki dan menyempurnakan skripsi agar menjadi lebih baik.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada pihak-pihak yang telah membantu terwujudnya tulisan ini:

1. Bapak Endang Darmawan M.Si, Apt selaku pembimbing utama yang dengan sabar meluangkan waktu dan membimbing, mengarahkan serta memberikan semangat dan dorongan sehingga penulis berhasil menyelesaikan skripsi ini tepat pada waktunya.
2. Bapak M. Hatta Prabowo SF., Apt, selaku pembimbing pendamping yang dengan sabar mencurahkan segenap waktu dan pemikirannya, masukan, bimbingan serta bantuannya.

3. Bapak Arif Rahman Hakim M.Si., Apt , selaku Dosen penguji atas masukan, saran dan kontribusi yang telah diberikan.
4. Bapak Jaka Nugraha, M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia.
5. Ibu Farida Hayati, M.Si, Apt., selaku Ketua Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
6. PT Kimia Farma atas bantuan bahan Glibenklamid untuk penelitian ini.
7. Pak Marno (staf Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Farmasi UII) yang telah membantu selama pelaksanaan penelitian.
8. Seluruh Staf Laboratorium Terpadu Universitas Islam Indonesia yang telah banyak membantu penulis selama penelitian berlangsung.
9. Bapak, Ibu, Abang dan adek-adekku terima kasih atas dukungan dan doanya selama ini.
10. Temen-temen kost ku yang dulu, Yoga, Mul, Nug, Adi, Santos, Ijal, Mas Agung, Mas Dwi dan Mas Agus, kalian temen kos ku yang paling baik
11. Temen-temen kost ku yang sekarang, Fadli, Arif, Tulus, Rojak, Wahyu, dan Endar, terima kasih atas bantuan dan doanya....
12. Teman Ngelab ku: luki,eny dan mami terima kasih bantuannya selama ngelab dan sesudahnya.
13. Erma ku yang kusayangi terima kasih atas kesabaran dan keikhlasannya selama menemaniku menyelesaikan skripsi ini.
14. Teman-teman Fa'01, Vian, Puput, Husna, Ciponk, Jerry, Roby, Febri, Aya', Om Yus terima kasih atas persahabatannya, kalian temanku yang paling baik.
15. Dan untuk semuanya yang telah membantu, baik langsung maupun tidak langsung selama Tugas Akhir, hingga skripsi ini terselesaikan.

Akhir kata penulis memohon maaf apabila selama penulisan skripsi ini melakukan kekhilafan dan hanya ini yang dapat penulis persembahkan mudah-mudahan ini bermanfaat. *Amin Ya Robbal Alamin*

Wassalamu'alaikum Wr.Wb.

Jogjakarta, April 2006

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|--|------|
| KATA PENGANTAR | v |
| DAFTAR ISI..... | vii |
| DAFTAR GAMBAR | ix |
| DAFTAR TABEL..... | x |
| DAFTAR LAMPIRAN | xi |
| INTISARI | xii |
| ABSTRACT..... | xiii |
| BAB I. PENDAHULUAN | 1 |
| A. Latar Belakang Masalah | 1 |
| B. Perumusan Masalah | 3 |
| C. Tujuan Penelitian | 3 |
| BAB II. STUDI PUSTAKA | 4 |
| A. Tinjauan Pustaka | 4 |
| 1. Diabetes Melitus..... | 4 |
| 2. Insulin..... | 9 |
| 3. Interaksi Obat..... | 10 |
| 4. Penetapan Kadar Glukosa Darah..... | 12 |
| 5. Metabolisme Obat | 12 |
| 6. Obat Antidiabetes Oral..... | 13 |
| 7. Vitamin E..... | 15 |
| B. Landasan Teori | 19 |
| C. Hipotesis | 20 |
| BAB III. CARA PENELITIAN | 21 |
| A. Alat dan Bahan | 21 |
| 1. Bahan yang Digunakan..... | 21 |
| 2. Alat..... | 21 |
| B. Cara Penelitian | 21 |
| 1. Pembuatan Larutan CMC Na 0,5 %..... | 21 |
| 2. Pembuatan Larutan Glibenklamid | 22 |
| 3. Pembuatan Larutan Neurovit E Dosis 100 mg/KgBB..... | 22 |
| 4. Pembuatan Larutan Glukosa 25 % b/v..... | 23 |
| 5. Validasi Metode | 23 |
| a. Penelitian Pendahuluan..... | 23 |
| b. Rancangan Penelitian..... | 23 |
| 6. Analisa Data dan Statistika..... | 25 |

| | |
|---|----|
| BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 27 |
| 1. Validasi Metode..... | 27 |
| a. Penetapan Panjang Gelombang Serapan Maksimum..... | 27 |
| b. Penetapan Waktu Serapan Optimum Senyawa Kuinonimin..... | 28 |
| c. Perolehan Kembali dan Kesalahan Acak Glukosa Standar Kadar 100 mg/dl..... | 31 |
| d. Penentuan Presentase Terdegradasi..... | 32 |
| 2. Uji Aktivitas Hipoglikemik Glibenklamid..... | 33 |
| BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN | 44 |
| A. Kesimpulan | 44 |
| B. Saran | 44 |
| DAFTAR PUSTAKA | 45 |
| LAMPIRAN..... | 47 |



DAFTAR GAMBAR

| | | |
|-----------|---|----|
| Gambar 1. | Struktur Glibenklamid..... | 14 |
| Gambar 2 | Struktur Vitamin E (alfa – tokoferol)..... | 16 |
| Gambar 3. | Kurva Hubungan antara Panjang Gelombang dengan Absorbansi Sampel Glukosa..... | 27 |
| Gambar 4. | Kurva Hubungan Waktu dengan Absorbansi..... | 29 |
| Gambar 5. | Reaksi Pembentukan Kompleks Warna Seyawa Kuinonimin.... | 30 |
| Gambar 6. | Kurva purata kadar glukosa darah (mg/dl) terhadap waktu (menit) akibat praperlakuan Neurovit E Dosis 9 mg/KgBB..... | 34 |



DAFTAR TABEL

| | | |
|-------------|--|----|
| Tabel I. | Hasil Penetapan Panjang Gelombang Serapan Maksimum..... | 28 |
| Tabel II. | Hasil Penetapan Waktu Serapan Optimum..... | 29 |
| Tabel III. | Harga Perolehan Kembali (<i>Recovery</i>)..... | 31 |
| Tabel IV. | Harga Persen Terdegradasi..... | 32 |
| Tabel V. | Purata Kadar Glukosa Darah Setelah Perlakuan..... | 34 |
| Tabel VI. | Nilai AUC ₀₋₂₄₀ (menit. mg/dl) Setelah Perlakuan..... | 35 |
| Tabel VII. | Analisa Uji Tukey Nilai AUC ₀₋₂₄₀ | 36 |
| Tabel VIII. | Aktifitas Penurunan Kadar Gula Darah Dibandingkan Kontrol Negatif..... | 39 |
| Tabel IX. | Analisa Uji Tukey Potensi Hipoglikemik Glibenklamid..... | 41 |



EFEK PEMBERIAN NEUROVIT E TERHADAP AKTIVITAS HIPOGLIKEMIK GLIBENKLIAMID PADA TIKUS JANTAN GALUR SPRAGUE – DAWLEY

INTISARI

Diabetes melitus merupakan penyakit kronik yang sudah mendunia. Terapi pengobatan diabetes mellitus yang sering digunakan adalah golongan sulfonilurea, misalnya glibenklamid. Glibenklamid termasuk golongan obat dengan rasio ekstraksi rendah dan kemungkinan dapat berinteraksi dengan vitamin E yang dikonsumsi sebagai food supplement dan sebagai antioksidan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh efek hipoglikemia glibenklamid akibat lamanya pemberian Neurovit E pada tikus yang telah dibebani dengan glukosa. Penelitian menggunakan hewan uji tikus putih jantan galur Sprague – Dawley yang berumur 2-3 bulan dengan berat 200 – 300 g. Hewan uji dibagi menjadi 6 kelompok (kontrol dan perlakuan). Semua hewan uji dipuaskan dahulu 18 jam sebelum pemberian glibenklamid. Kelompok I diberi larutan CMC Na 0,5% (kontrol negatif). Kelompok II diberi suspensi glibenklamid 0,45 mg/KgBB (kontrol positif), Kelompok III diberi Neurovit E 9 mg/KgBB sehari sekali selama 0 hari, Kelompok IV diberi Neurovit E 9 mg/KgBB sehari sekali selama 1 hari, Kelompok V diberi Neurovit E 9 mg/KgBB sehari sekali selama 2 hari, dan Kelompok VI diberi Neurovit E 9 mg/KgBB sehari sekali selama 3 hari setiap 24 jam, kemudian kelompok I, II, III, IV, V, dan VI diberi suspensi glibenklamid 0,45 mg/KgBB secara oral dosis tunggal. Darah dicuplik melalui vena lateralis ekor pada menit ke 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180 dan 240. Nilai AUC_{0-240} dan persentase daya hipoglikemia glibenklamid dianalisis statistik dengan uji Anava satu arah, jika terdapat perbedaan yang bermakna dilanjutkan uji Tukey. Hasil penelitian menunjukkan bahwa praperlakuan Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB sekali sehari selama 0, 1, 2, dan 3 hari mampu menaikkan aktivitas hipoglikemia glibenklamid yang ditunjukkan adanya penurunan nilai AUC_{0-240} dan peningkatan daya hipoglikemia secara signifikan ($p < 0,05$) hanya ditunjukkan pada pemberian Neurovit E 9 mg/KgBB hari ke-1 sebesar 20,7067 % dibandingkan terhadap kontrol positif (pemberian glibenklamid dosis 0,45 mg/KgBB). Pemberian Neurovit E 9 mg/Kg BB sehari sekali selama 0, 1, 2, dan 3 hari tidak menunjukkan penurunan nilai AUC secara bermakna ($p < 0,05$), artinya lamanya hari tidak mempengaruhi penurunan kadar glukosa darah hewan uji.

Kata Kunci : Vitamin E, Diabetes melitus, Glibenklamid, hipoglikemik.

THE EFFECT OF NEUROVIT E PRETREATMENT ON HIPOGLYCEMIC EFFECT OF GLIBENCLAMID IN SPRAGUE – DAWLEY MALE RATS

Abstract

Diabetes melitus was the chronic which famous in the world. Treatment therapy of Diabetes Melitus which often used was sulfonyluria category, for the example glibenclamid. Glibenclamid include in medicine category with the low extraction ratio and it may be can have interaction with Vitamin E which consumed as supplement food and also becomes antioxidant. The aim of this study was to know the influence of hipoglycemic glibenclamid effect caused by how long giving the Neurovit E to the rats that has been loaded by glucose. The study was purely the rats divided Sprague – Dawley male white rat between 2-3 months ago ant the heavy between 200-300 g. The rats divided into six groups. All the animal testing get fasting in 18 hours before has given the glibenclamid. The 1st group has given CMC Na 0,5% (negative control), the 2nd group has given the glibenclamid 0,45 mg/KgBW (positive control), the 3rd group has given Neurovit E 9 mg/Kg BW orally for 0 day, the 4th group has given Neurovit E 9 mg/Kg BW orally for 1 day, the 5th group has given Neurovit E 9 mg/Kg BW orally for 2 day, and the 6th group has given Neurovit E 9 mg/Kg BW orally for 3 day every 24 hours, and then the 1st, 2nd, 3th, 4th, 5th and 6th groups has given glibenclamid suspention 0,45 mg/KgBW orally, single dossage. The blood has taken by tail lateralis vena in minutes of 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180 and 240. The value of AUC₀₋₂₄₀ and ability percentration of hipoglycemic glibenklamid was analyzed by statistic method of One way Anova, if there signicicant differences, it will next to tukey test. The study results shows that pre-behave Neurovit E dossage 9 mg/KgBW once a day during 0, 1, 2 and 3 days abble increasing the hipoglicemic glibenclamic activity which shown by decreasing AUC₀₋₂₄₀ increasing hipoglicemic ability significant ($p < 0,05$) only shown to giving Neurovit E 9 mg/KgBW as big as 20,7067 % at the first day and compared toward positive control (giving glibenklamid dosages 0,45 mg/KgBW) Giving Neurovit E 9 mg/KgBW once a day during 0,1,2,and 3 days was not show decreasing AUC value significantly ($p < 0,05$) it means the long of day was not influence the decreasing glucose level of animal testing blood.

Key words : Vitamin E, *Diabetes Melitus*, Glibenclamid, Hipoglycemic

BAB I
PENDAHULUAN
A. LATAR BELAKANG MASALAH

Diabetes melitus merupakan penyakit kronik yang sudah mendunia dan menimbulkan komplikasi jangka pendek dan panjang yang menyebabkan kerugian ekonomi dan sosial yang besar. Dalam perkembangannya angka prevalensi diabetes melitus makin tinggi, oleh karena itu semua pihak harus bersama – sama mencegah dan menanggulangi ledakan diabetes melitus dari sekarang. Dari berbagai penelitian epidemiologis di Indonesia, sekitar tahun 1980-an didapatkan prevalensi diabetes melitus sebesar 1,5-2,3 % pada penduduk usia lebih dari 15 tahun. Buku Diabetes Atlas 2000 (*International Diabetes Federation*) mencantumkan perkiraan penduduk Indonesia diatas 20 tahun sebesar 125 juta dan dengan asumsi prevalensi diabetes melitus sebesar 4,6 %, diperkirakan pada tahun 2000 pasien diabetes melitus akan berjumlah 5,6 juta dan berdasarkan pola pertumbuhan penduduk pada tahun 2020 nanti akan didapatkan 8,2 juta pasien diabetes dari 178 juta penduduk diatas usia 20 tahun (Soegianto, 2004). Peningkatan jumlah penderita diabetes melitus ini dimungkinkan karena usia, mengkonsumsi makanan yang tidak sehat dan gaya hidup yang berlebihan (Anonim, 1999).

Terapi diabetes melitus selalu didasarkan pada diet dengan pembatasan kalori, olahraga, berhenti merokok, dan obat-obatan untuk terapi simptomatik. Terapi obat pada penderita diabetes melitus tipe I membutuhkan insulin untuk menjaga kelangsungan hidupnya sedangkan pada penderita diabetes melitus tipe II terapi obat-obatan yang sering digunakan adalah obat antidiabetes oral. Obat antidiabetes oral yang sering dipakai adalah kelompok sulfonilurea (tolbutamid, karbutamid, klorpropamid dan glibenklamid), biguanid (metformin), α -glucosidase inhibitor (akarbose), insulin sensitizer (troglitazon), dan α - amylase inhibitor (tendamistase).

Glibenklamid adalah antidiabetik oral golongan sulfonilurea generasi kedua yang daya kerjanya lebih kuat daripada generasi pertama (tolbutamid, klorpropamid). Glibenklamid dapat menurunkan kadar glukosa darah pada

penderita diabetes dan non-diabetes (Tjay & Rahardja, 2002). Glibenklamid cenderung mudah mengalami antaraksi dengan senyawa penginduksi enzim. Adanya antaraksi ini menyebabkan kadar obat didalam darah menjadi lebih kecil lebih lanjut akan mengurangi efek farmakologinya (Ferner *et al*, 1987; Ritchel, 1992; Shargel & Yu, 1993).

Dalam terapi diabetes melitus dengan menggunakan obat, seringkali tidak lepas dari adanya kemungkinan antaraksi dengan berbagai senyawa eksogen. Antaraksi tersebut sering terjadi pada kehidupan sehari-hari, misal bahan kimia yang masuk ke dalam tubuh secara sengaja ataupun tidak sengaja dan mempunyai potensi untuk mengubah kinerja farmakodinamika suatu obat didalam tubuh yang terwujud dalam efek obat tersebut. Penyebab antaraksi (antaraktan) yang berupa bahan kimia tersebut dapat berasal dari produk farmasetik, kosmetik, bahan tambahan pada bahan kimia industri, makanan, tanaman obat maupun sayur-sayuran (Gibson & Skett, 1986).

Di lain pihak adanya anggapan bahwa bahan makanan atau *food supplement* aman bagi pemakainya dalam hal penggunaan secara bersama. Namun sifat aman ini tidak berarti *food supplement* tidak dapat mempengaruhi obat lain, lebih lanjut juga akan mempengaruhi efek obat tersebut. Pengaruh vitamin E terhadap aktivitas daya hipoglikemik glibenklamid belum pernah dilaporkan.

Berdasarkan pertimbangan di atas maka dilakukan penelitian untuk mempelajari pengaruh praperlakuan pemberian Neurovit E terhadap aktifitas hipoglikemik glibenklamid pada tikus yang telah dibebani glukosa. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menerangkan adanya interaksi obat yang telah terjadi pada penggunaan secara klinik pada manusia.

B. PERUMUSAN MASALAH

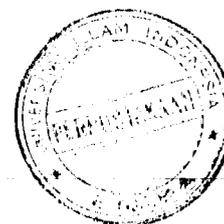
Seberapa besar pengaruh efek pemberian Neurovit E terhadap aktivitas hipoglikemia glibenklamid pada tikus putih jantan galur Sprague – Dawley yang telah dibebani glukosa.

C. TUJUAN PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perubahan efek hipoglikemia glibenklamid akibat lamanya pemberian Neurovit E pada tikus yang telah dibebani dengan glukosa.



BAB II
STUDI PUSTAKA
A. TINJAUAN PUSTAKA



1. Diabetes Melitus

a Definisi dan Klasifikasi Diabetes Melitus

Diabetes melitus adalah suatu keadaan yang timbul karena defisiensi insulin relative maupun absolute. Hiperglikemi timbul karena penyerapan glukosa kedalam sel terhambat serta metabolismenya diganggu. Diabetes dicirikan oleh peningkatan level gula darah sebagai akibat kurangnya sekresi insulin dan tidak disekresikannya insulin atau oleh keduanya. Diabetes yang tidak ditangani atau diawasi dengan baik dapat menimbulkan efek merugikan dalam jangka panjang dan dapat menyebabkan krisis metabolik dan koma diabetik. Gejala diabetes adalah rasa lapar yang berlebihan karena meningkatnya kebutuhan bahan bakar didalam tubuh, banyak kencing, rasa haus yang amat sangat untuk mengganti kehilangan cairan akibat banyak kencing. Dalam keadaan normal, kira – kira 50 % glukosa yang dimakan mengalami metabolisme sempurna menjadi CO₂ dan air, 5 % diubah menjadi glikogen dan kira – kira 30-40 % diubah menjadi lemak. Pada diabetes melitus semua proses tersebut terganggu, glukosa tidak dapat masuk kedalam sel, sehingga energi terutama diperoleh dari metabolisme protein dan lemak. Sebenarnya hiperglikemik sendiri relatif tidak berbahaya, kecuali bila hebat sekali hingga darah menjadi hiperosmotik terhadap cairan intrasel. Yang nyata berbahaya ialah glikosuria yang timbul, karena glukosa bersifat diuretik osmotik, sehingga diuresis sangat meningkat disertai hilangnya berbagai elektrolit. Hal inilah yang menyebabkan terjadinya dehidrasi dan hilangnya elektrolit pada penderita diabetes yang tidak diobati. Karena adanya dehidrasi, maka badan berusaha mengatasinya dengan banyak minum (polidipsia). Badan kehilangan 4 kalori untuk setiap gram glukosa yang diekskresi. Polifagia timbul karena perangsangan pusat nafsu makan di hipotalamus oleh kurangnya pemakaian glukosa di kelenjar itu (Ganiswara. *et al*, 1995). Gejala lainnya adalah naiknya kadar glukosa dalam darah berupa terdapatnya gula

dalam kemih (glukosuria) dan rasa letih, mata kabur, kulit kering (Dalimartha, 2004).

Kriteria untuk diagnosa diabetes telah disetujui oleh WHO yaitu :

- 1). Diabetes tipe I khususnya berkembang pada anak-anak dan manusia dewasa. Ini adalah penyakit autoimun, dalam mana sel yang menghasilkan insulin dalam pankreasnya rusak. Orang dengan penderita tipe I akan menjadi bergantung pada injeksi insulin yang seimbang, diet dan olahraga untuk mengontrol level gula darahnya. Diabetes tipe I juga disebut **IDDM** (*Insulin Dependent Diabetes Melitus*) karena penderita senantiasa membutuhkan insulin. Pada tipe ini terjadi dekstruksi dari sel-beta pankreas, sehingga tidak memproduksi insulin lagi dengan akibat sel-sel tidak bisa menyerap glukosa dari darah (Tjay & Rahardja, 2002).
- 2). Diabetes tipe II, jenis dewasa (*maturity onset*) atau tipe **NIDDM** (*Non Insulin Dependent Diabetes Melitus*) disebabkan oleh menurunnya produksi insulin dan atau resisten terhadap aksi insulin dalam jaringan tubuh. Pada semua orang, kemampuan pankreas untuk menskresikan insulin tergantung pada kebutuhan tubuh yang dipengaruhi oleh umur. Penurunan kapasitas sekresi insulin akibat toleransi gula menurun, yang kemudian menyebabkan berkembang menjadi diabetes tipe II, hubungan yang kuat antara diabetes tipe II dan obesitas telah diketahui. Sejumlah antidiabetes oral digunakan untuk mengobati diabetes tipe 2. Pasien kurus diberikan suatu sulfonilurea, pasien gemuk umumnya suatu biguanida dengan efek anoreksan. Fungsinya untuk menstimulasi pembebasan insulin, menurunkan resistensi insulin atau mempengaruhi absorpsi karbohidrat (Shank *et al*, 1995; Tuomehlito *et al*, 2001; Tjay & Rahardja, 2002).

b Diagnosis

Tindakan diagnosis dilakukan untuk menentukan apakah seseorang telah menderita diabetes melitus atau belum. Diagnosis umumnya ditegakkan berdasarkan keluhan penderita yang khas dan adanya peninggian kadar glukosa darah yang ditentukan berdasarkan pemeriksaan laboratorium (Dalimartha, 2004).

Dokter biasanya menemukan gejala khas berikut pada penderita diabetes melitus.

- 1) Rasa haus sehingga banyak minum (polidipsia)
- 2) Sering kencing (poliuria) terutama malam hari
- 3) Berat badan menurun dengan cepat

Gejala lain yang mungkin dikeluhkan pasien antara lain.

- 1) Rasa lemas
- 2) Cepat merasa lapar
- 3) Gatal-gatal
- 4) Kesemutan pada jari tangan dan kaki
- 5) Penglihatan jadi kabur
- 6) Gatal pada kemaluan (*pruritus vulvae*) bagi penderita wanita
- 7) Impotensi pada pasien pria
- 8) Luka sukar sembuh (Dalimartha, 2004)

Beberapa parameter yang dapat digunakan untuk mendiagnosis diabetes melitus sebagai berikut:

- 1) Seseorang dikatakan menderita diabetes melitus jika kadar glukosa darah ketika puasa lebih dari 126 mg/dl atau 2 jam setelah minum larutan glukosa 75 gram menunjukkan kadar glukosa darah lebih dari 200 mg/dl.
- 2) Seseorang dikatakan terganggu toleransi glukosanya jika kadar glukosa darah ketika puasa 110 – 125 mg/dl tau 2 jam setelah minum larutan glukosa 75 gram menunjukkan kadar glukosa darah 140 – 199 mg/dl.
- 3) Seseorang dikatakan normal atau tidak menderita diabetes melitus jika kadar glukosa darah ketika puasa kurang dari 110 mg/dl, kadar glukosa darah 1 jam setelah minum larutan glukosa 75 gram menunjukkan kadar glukosa darah kurang dari 180 mg/dl, dan kadar glukosa darah 2 jam setelahnya kurang dari 140 mg/dl (Utami & Tim Lentera, 2003).

Pemeriksaan tes toleransi glukosa oral (TTOG) dapat dilakukan apabila hasil pemeriksaan glukosa darah sewaktu hasilnya meragukan. Tes ini dilakukan untuk memastikan (konfirmasi) diagnosis. Untuk diagnosis diabetes melitus dan gangguan toleransi glukosa lainnya dilakukan pemeriksaan glukosa darah 2 jam setelah beban glukosa. Sekurang-kurangnya

diperlukan kadar glukosa darah pernah 2 kali abnormal untuk konfirmasi diagnosis, baik pada 2 pemeriksaan yang berbeda ataupun adanya 2 hasil abnormal pada pemeriksaan yang sama. Seseorang mempunyai kemungkinan lebih besar untuk mendapat penyakit diabetes melitus bila salah satu atau kedua orang tuanya menderita penyakit ini (Dalimartha, 2004).

Kepastian diagnosis diabetes melitus umumnya ditentukan berdasarkan hal berikut:

- 1) Ada gejala khas dan keluhan yang dikemukakan pasien ditambah hasil pemeriksaan glukosa darah sewaktu ≥ 200 mg/dl (plasma vena).
- 2) Kadar glukosa darah puasa (plasma vena) yang ≥ 126 mg/dl pada dua kali pemeriksaan pada saat berbeda (Dalimartha, 2004).

c. Komplikasi akibat diabetes melitus

Sebelum insulin ditemukan, setiap orang yang menderita diabetes yang tergantung insulin (tipe I) meninggal setelah dua tahun. Namun, dengan ditemukannya insulin ada sebuah perubahan dramatis. Orang yang menderita diabetes masih memiliki harapan untuk hidup lebih lama lagi. Namun, setelah bertahun-tahun, diabetes melitus kronis dapat merusak sejumlah jaringan tubuh yang berdampak pada timbulnya penyakit komplikasi. Berikut penyakit komplikasi yang disebabkan oleh diabetes mellitus kronis (Wijayakusuma, 2004):

1. Gangguan pada mata

a) Lensa kabur

Bentuk lensa kadang-kadang berubah seperti yang terjadi pada usia lanjut. Hal ini berkaitan dengan diabetes melitus yang diderita. Konsentrasi glukosa darah yang tinggi dapat mengubah bentuk lensa.

b) Katarak

Katarak adalah kekaburan pada lensa mata, yang dialami oleh penderita diabetes. Untuk memulihkan penglihatan, diperlukan operasi kecil.

c) Diabetic retinopathy

Retina merupakan bagian dibelakang mata yang terlibat dalam mengirimkan obyek yang dilihat ke otak. Diabetes dapat menyebabkan

kelainan pada retina (*diabetic retinopathy*). Pada *diabetic retinopathy*, terbentuk gelembung-gelembung kecil pada pembuluh darah (mikroaneurisma) yang disebabkan oleh terjadinya perdarahan kecil pada pembuluh darah (hemoragi). Perubahan pada retina dapat menjadi parah dan memerlukan perawatan. Dalam kondisi parah dan tidak dirawat, diabetes melitus dapat menyebabkan kebutaan.

d) Glaukoma

Pada glaukoma, pengeluaran cairan dari mata terganggu dan timbul tekanan dalam bola mata yang dapat menyebabkan pembuluh darah kecil yang mensuplai makanan ke saraf optik rusak sehingga menyebabkan gangguan penglihatan. Oleh karena itu, penderita diabetes sebaiknya memeriksakan diri ke dokter spesialis mata untuk mencegah hal-hal yang tidak diinginkan.

2. Migren

Migren adalah sakit kepala hebat. Jika migren disebabkan kadar glukosa tinggi, dapat disembuhkan dengan memperbaiki kontrol terhadap diabetes.

3. Diabetic neuropathy

Diabetic neuropathy adalah gangguan pada bagian saraf sensorik yang dapat menyebabkan sering kehilangan rasa nyeri. *Diabetic neuropathy* menyebabkan penderita diabetes tidak menyadari jika ada luka atau tertusuk benda tajam. Penderita juga sering kesemutan dan kram betis. Jika bagian saraf yang terkena adalah saraf pusat, mulut dapat menjadi mencong, mata tertutup sebelah, dan penglihatan menjadi ganda (Wijayakusuma, 2004).

d Pencegahan diabetes melitus

Menurut Wijayakusuma (2004) ada tiga jenis pencegahan diabetes melitus, yaitu:

1). Pencegahan primer

Tujuannya untuk mencegah terjadinya diabetes melitus. Untuk itu, faktor-faktor yang dapat menyebabkan diabetes melitus perlu diperhatikan, baik secara genetik maupun lingkungan. Berikut hal-hal yang dilakukan dalam pencegahan primer antara lain, pola makan sehari-hari harus seimbang dan

tidak berlebihan, olahraga secara teratur dan tidak banyak berdiam diri, usahakan berat badan dalam batas normal, hindari obat-obatan yang dapat menyebabkan diabetes mellitus (diabetogenik).

2). Pencegahan sekunder

Pencegahan sekunder tujuannya adalah mencegah agar penyakit diabetes yang sudah timbul tidak menimbulkan komplikasi penyakit lain, menghilangkan gejala, dan keluhan penyakit diabetes mellitus. Pencegahan sekunder meliputi deteksi dini penderita diabetes mellitus, terutama kelompok yang beresiko tinggi terkena diabetes melitus. Bagi yang dicurigai terkena diabetes mellitus, perlu diteliti lebih lanjut untuk memperkuat dugaan adanya diabetes mellitus. Pencegahan sekunder dapat dilakukan dengan hal-hal berikut ini, diet sehari-hari harus seimbang dan sehat, menjaga berat badan dalam batas normal, usaha pengendalian gula darah agar tidak terjadi komplikasi diabetes melitus, olahraga teratur sesuai dengan kemampuan fisik dan umur.

3). Pencegahan tersier

Pencegahan tersier bertujuan untuk mencegah kecacatan lebih lanjut dan komplikasi penyakit yang sudah terjadi. Berikut pencegahan yang dimaksud, mencegah terjadinya kebutaan jika menyerang pembuluh darah mata, mencegah gagal ginjal kronik jika menyerang pembuluh darah ginjal, mencegah stroke jika menyerang pembuluh darah otak dan mencegah terjadinya gangren jika terjadi luka. Oleh karena itu, diperlukan pemeriksaan secara rutin dan berkala terhadap bagian organ tubuh yang rentan terhadap komplikasi dan kecacatan.

2. Insulin

Insulin ialah suatu polipeptida dengan BM kira-kira 6000. Insulin disintesis oleh sel β pulau Langerhans dari proinsulin. Proinsulin disintesis dalam elemen poliribosom retikulum endoplasmik sel β pankreas. Prohormon tersebut ditransfer ke sisterna retikulum endoplasmik dan kemudian ke kompleks golgi. Ditempat terakhir ini terjadi perubahan proinsulin menjadi insulin (Ganiswara *et*

al, 1995). Sekresi insulin diatur dengan ketat untuk mendapatkan kadar gula stabil baik sesudah makan maupun dalam keadaan puasa. Faktor yang terutama berperan dalam pengaturan ini adalah bermacam nutrisi, hormon saluran cerna, hormon pankreas dan neurotransmitter otonom. Glukosa, asam amino, asam lemak dan benda keton merangsang sekresi insulin. Sel-sel pulau langerhans dipersyarafi oleh saraf adrenergik dan kolinergik. Stimulasi reseptor α_2 adrenergik menghambat sekresi insulin. Sedang β_2 adrenergik agonis dan stimulasi saraf vagal akan merangsang sekresi. Glukosa merupakan stimulan utama untuk sekresi insulin, disamping itu juga merupakan faktor esensial untuk bekerjanya stimulan yang lain. Bila terdapat hambatan metabolisme glukosa di dalam sel, perangsangan sekresi insulin oleh glukosa dihambat. Pada keadaan tersebut kadar glukosa yang tinggi dalam darah tidak mampu merangsang sekresi insulin, dan perangsangan baru terjadi setelah pemberian tolbutamid. Perangsangan sekresi insulin juga dapat terjadi dengan pemberian sulfonilurea (Ganiswara, 1995).

3. Interaksi Obat

Untuk keperluan terapi obat sering diberikan bersama-sama dengan obat lain misalnya senyawa yang terkandung didalam minuman, makanan, buah atau obat-obatan lain atau beberapa zat aktif yang dikombinasikan dalam satu sediaan sehingga dapat menimbulkan antaraksi dengan obat tersebut. Penggunaan dua atau lebih obat bersama-sama, belum tentu efek farmakologi yang ditimbulkan merupakan penjumlahan dari efek obat-obat tersebut ketika digunakan sendiri-sendiri pada dosis yang sama. Dalam hal tersebut dapat terjadi antaraksi obat yang satu mengganggu obat yang lain (cit Nugroho, 2001). Dalam hal ini obat pertama dapat memperkuat atau memperlemah, memperpanjang atau memperpendek kerja obat kedua Hal ini dikenal dengan istilah interaksi obat (Mutschler, 1991).

Antaraksi obat yang terjadi dapat menimbulkan dampak dengan sifat tertentu yaitu dapat merugikan atau menguntungkan. Suatu antaraksi dapat bersifat merugikan apabila efek obat tersebut pada penderita diperkuat atau dihambat oleh suatu antarkatan tertentu sehingga respon yang diperoleh adalah tidak menguntungkan. Respon tersebut dapat berwujud berkurangnya kemanjuran atau bertambahnya toksisitas secara nyata (cit Nugroho, 2001). Interaksi obat

dianggap penting secara klinik bila berakibat meningkatkan toksisitas dan atau mengurangi efektivitas obat yang berinteraksi, terutama obat dengan batas keamanan sempit. Demikian juga interaksi yang menyangkut obat-obat yang biasa digunakan atau yang sering digunakan bersama. Menurut jenis mekanisme kerjanya interaksi obat dibedakan atas interaksi farmakodinamika dan interaksi farmakokinetika (Hussar, 1990) :

- 1). Interaksi farmakodinamika terjadi jika zat khasiat saling mempengaruhi, bekerja sinergis atau antagonis, efek aditif pada reseptor spesifik atau pada organ sasaran. Interaksi farmakodinamik merupakan sebagian besar dari interaksi obat yang penting dalam klinik. Interaksi pada sistem reseptor yang sama biasanya merupakan antagonisme antara agonis dan antagonis atau bloker dari reseptor yang bersangkutan, misalnya pada reseptor kolinergik agonisnya asetilkolin dan fisostigmin sedangkan antagonisnya atropin, propantelin (Ganiswara, 1995).
- 2). Interaksi farmakokinetika dapat terjadi selama fase farmakokinetika obat secara menyeluruh, juga pada fase absorpsi, distribusi dan eliminasi. Interaksi pada proses absorpsi dapat terjadi akibat perubahan pH karena obat pertama, perpanjangan atau pengurangan waktu huni dalam saluran cerna, atau akibat pembentukan kompleks. Interaksi pada proses distribusi terjadi jika kedua obat yang diberikan bersama-sama mengalami persaingan dalam ikatannya dengan protein plasma. Penurunan ikatan obat-protein mengakibatkan kenaikan konsentrasi obat bebas sehingga memungkinkan lebih banyak obat yang dapat melewati membran sel untuk didistribusikan ke seluruh jaringan. Dengan demikian akan didapatkan respon farmakologik yang lebih kuat dan akan lebih banyak pula obat yang masuk ke organ ekskresi termasuk hepar dan ginjal. Interaksi pada proses metabolisme terjadi karena persaingan antara dua obat terhadap enzim yang berfungsi memetabolismenya, kadang-kadang juga terjadi dimana obat kedua akan mengalami percepatan atau perlambatan laju metabolisme. Sementara interaksi pada proses ekskresi melalui ginjal dapat terjadi akibat perubahan harga pH urin atau karena persaingan pada sistem transpor yang berfungsi untuk sekresi atau reabsorpsi aktif (Harvey & Withrow, 1990; Rollins, 1990).

4. Penetapan Kadar Glukosa Darah

Cara yang digunakan untuk menetapkan kadar glukosa darah sama dengan cara yang dilakukan untuk menetapkan kadar glukosa urin. Ada empat metode yang bisa diterapkan yaitu :

- a) Tes Reduksi menggunakan pereaksi Benedict Trommer, dan fehling. Metode ini kurang sensitif, karena selain glukosa gula-gula pereduksi lain juga bisa tertetapan kadarnya (menunjukkan reaksi yang positif) dengan pereaksi ini.
- b) Reaksi enzimatis dengan glukosa peroksidase atau glukosa oksidase. Metode ini paling sering digunakan karena cukup sederhana dan dapat memberikan hasil dalam waktu yang cukup singkat. Selain itu, metode ini juga memiliki sensitifitas yang cukup tinggi.
- c) Polarimetri. Metode umum yang digunakan untuk penetapan semi kuantitatif glukosa darah maupun urin. Sensitifitas lebih rendah dibandingkan glukosa peroksidase atau glukosa oksidase karena dapat dipengaruhi oleh obat-obat lain.
- d) Reaksi enzimatis heksokinase atau glukosa 6 – phosfat hidrogenase. Memberikan hasil yang paling baik untuk menetapkan kadar glukosa darah karena dapat bereaksi spesifik. Namun metode ini jarang digunakan karena memerlukan perlakuan yang tidak sederhana (Richterich dan Colombo, 1981 *cit* Siti Zubaidah, 2002).

5. Metabolisme Obat

Proses eliminasi obat terdiri dari metabolisme (biotransformasi) dan ekskresi. Pada proses metabolisme molekul suatu senyawa diubah menjadi lebih polar dan mempunyai struktur yang mudah terionisasi supaya lebih mudah diekskresikan melalui ginjal (Ritchel, 1992). Disamping itu biasanya senyawa diubah menjadi inaktif sehingga kerja obat berakhir. Tetapi hal itu tidak berlaku untuk semua senyawa, karena ada senyawa yang mengalami proses biotransformasi metabolitnya justru menjadi aktif. Dan metabolit ini tentunya akan mengalami metabolisme lebih lanjut atau diekskresikan melalui urin.

Tempat utama proses metabolisme obat terjadi di hepar, lainnya dapat terjadi di ginjal, otot dan dinding usus. Proses metabolisme umumnya dapat dibagi menjadi dua fase. Yang pertama fase nonsintetik, meliputi reaksi hidrolisa,

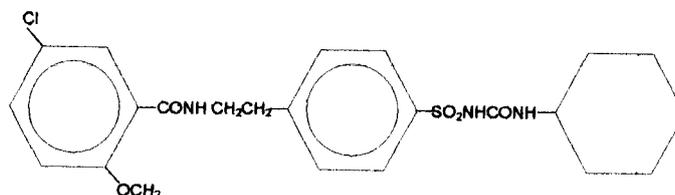
reduksi dan fase yang kedua adalah reaksi konjugasi hasil metabolit dengan substrat endogen (Ritchel, 1992). Sedang enzim yang berperan dalam metabolisme dapat dibedakan menurut lokasinya di dalam mikrosom dan nonmikrosom. Enzim mikrosom dan proses biotransformasi kebanyakan terdapat di hepar, sedikit di ginjal dan disaluran cerna. Enzim mikrosom untuk reaksi oksidasi dan reduksi sering disebut dengan MFO (*Mixed Function Oxidase*) atau monooksigenase yang mengkatalisa reaksi oksidasi, hidroksilasi, dealkilasi dan desulfurisasi. Enzim-enzim tersebut terletak pada retikulum endoplasma. Komponen utama yang terlibat dalam biotransformasi sistem enzim ini adalah sitokrom P-450 (Ritchel, 1992; Rollins, 1990; Shargel & Yu, 1998).

6. Obat Antidiabetes Oral

Antidiabetik oral (ADO) dapat dibagi dalam 2 golongan, yaitu derivat sulfonilurea dan derivat biguanid. Cara kerja kedua golongan ini sangat berbeda, derivat sulfonilurea bekerja dengan merangsang sekresi insulin dipankreas, sedangkan kerja derivat biguanid tidak bergantung pada fungsi pankreas. Sulfonilurea menstimulasi sel-sel β pulau langerhans, sehingga sekresi insulin ditingkatkan. Disamping itu kepekaan sel-sel β bagi kadar glukosa darah juga diperbesar melalui pengaruhnya atas transpor protein (Ganiswara *et al*, 1995; Tjay & Rahardja, 2002).

Glibenklamid adalah antidiabetik oral golongan sulfonilurea generasi kedua yang daya kerjanya lebih kuat daripada generasi pertama (tolbutamid, klorpropamid). Glibenklamid dapat menurunkan kadar glukosa darah pada penderita diabetes dan non-diabetes (Tjay & Rahardja, 2002). Mekanisme kerjanya dengan menstimulasi sel-sel β dari pankreas sehingga pelepasan insulin ditingkatkan dan meningkatkan kepekaan sensitivitas sel-sel β terhadap rangsangan glukosa dan non glukosa. Pada terapi jangka panjang seringkali terjadi penurunan sekresi insulin, tetapi glibenklamid dapat mempertahankan toleransi glukosa dalam darah. Efek ekstra pankreatik meningkatkan afinitas insulin pada reseptor, sehingga sensitivitas insulin meningkat dan menekan sekresi glukosa oleh hati (Tjokropawiro, 2003; Anonim, 2004). Glibenklamid merupakan serbuk hablur, putih atau hampir putih, tidak berbau atau hampir tidak berbau.

Glibenklamid praktis tidak larut dalam air dan eter sukar larut dalam etanol dan dalam methanol, larut sebagian dalam kloroform. Glibenklamid mempunyai rumus struktur sebagai berikut:



Gambar 1. Struktur glibenklamid (Anonim, 1995a)

Glibenklamid diabsorbsi dari usus secara cepat dan hampir lengkap (kira-kira 90-99%) setelah pemberian oral, dan absorpsinya tidak dipengaruhi oleh makanan. Glibenklamid 99% terikat pada protein plasma dengan ikatan nonionik, berbeda dengan golongan sulfonilurea yang lainnya, sehingga ikatannya mudah terputus dan tergantikan oleh ikatan protein yang lebih besar. Volume distribusi rata-rata pada keadaan tunak 0,125 L/Kg. Glibenklamid dimetabolisme secara sempurna dengan cara hidroksilasi gugus sikloheksil dengan metabolit utamanya turunan 4-trans-hidroksi dan turunan 3-cis-hidroksi. Semua metabolit diekskresikan keluar tubuh karena $t_{1/2}$ metabolisme dan $t_{1/2}$ eliminasinya sama. Selain itu klirens renal dari metabolit utama besar. Serum $t_{1/2}$ eliminasi antara 6-7 jam. Pada pemberian oral dosis 5 mg konsentrasi maksimum dalam serum tercapai setelah 2-6 jam dan dalam 24 jam konsentrasinya turun dengan laju eliminasi 5% dari kadar maksimum. Untuk pemakain dosis ganda tidak terjadi akumulasi dosis. Eksresi glibenklamid 50% terjadi urine urine dan 50% lagi melalui feses. Pada pasien dengan kelainan ginjal yang mengalami kerusakan pada ekskresi renalnya terjadi peningkatan eliminasi metabolit pada empedu (Tjay & Rahardja, 2002; Anonim, 2004).

Glibenklamid mempunyai sifat khusus yaitu memiliki efek hipoglikemik yang kuat, sehingga para penderita harus selalu diingatkan jangan sampai melewatkan jadwal makannya, efek hipoglikemik bertambah bila diberikan sebelum makan, mempunyai efek antiagregasi trombosit, pada batas-batas tertentu masih dapat diberikan pada penderita dengan kelainan faal hati atau ginjal (Tjokropawiro, 2003).

Glibenklamid dapat mengalami interaksi dengan ACE inhibitor, asam aminosalisilat, klorampenikol, kotrimoksazol, salisilat, penilbutason, probenesid, yang dapat meningkatkan efek hipoglikemik (Anonim, 2004). Obat tersebut tidak efektif pada kondisi penderita yang tidak mempunyai insulin endogen. Obat tersebut tidak dapat menginduksi pengeluaran insulin apabila terjadi disfungsi atau kerusakan sel-sel β pada kondisi diabetes tipe I (Anonim, 1995).

7. Vitamin E

a Definisi

Vitamin adalah zat – zat kimia organis dengan komposisi beraneka ragam, yang dalam jumlah kecil dibutuhkan oleh tubuh manusia untuk memelihara fungsi metabolisme normal. Vitamin bukan merupakan bahan bakar atau bahan untuk membangun tubuh. Kebutuhannya berkisar dari beberapa mcg (microgram). Kebanyakan vitamin atau zat pelopornya yang disebut provitamin, diperoleh dari bahan makanan dan hanya beberapa saja yang dapat disintesa sendiri dalam usus oleh tubuh, misalnya vitamin B2, B5, K2 serta biotin. Vitamin terbagi menjadi dua yakni vitamin larut lemak dan vitamin larut air. Dari berbagai jenis vitamin yang dikenal, empat di antaranya larut lemak, antara lain vitamin A, D, E, dan K. Sedangkan vitamin lainnya bersifat larut dalam air. Vitamin larut air antara lain vitamin B1 (Tiamin), B2 (Riboflavin), Niasin, Folat, B6 (Piridoksin), B12 dan vitamin C. Setiap vitamin memiliki manfaat yang berbeda-beda di dalam tubuh dan jumlah yang dibutuhkan pun tidaklah sama. (Tjay & Rahardja, 2002)

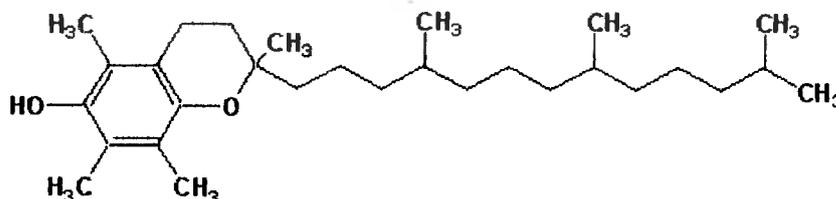
Vitamin E merupakan vitamin yang larut dalam lemak. Dalam jumlah yang bervariasi vitamin E terdapat dalam minyak biji kapas, minyak benih beras, minyak anaman polong-polongan, serta biji-bijian yang masih berkulit asri (Andarwulan dan Koswara, 1989). Jumlah vitamin E diatas dipengaruhi oleh spesies, varietas, tingkat kemampuan/ketuaan, musim, waktu dan cara pemanenan, prosedur pengolahan dan waktu penyimpanan (Harris dan Kasma, 1989).

b Sejarah dan Struktur Vitamin E

Vitamin E ditemukan pertama kali pada tahun 1922 oleh Evans dan Bishop yang menyatakan bahwa tikus betina bahan makanan penting untuk mempertahankan kehamilan. Oleh Banett Sure pada tahun 1924 diberi nama Vitamin E (Ganiswara,1995). Kemudian Evans dan Emerson memisahkan vitamin tersebut pada tahun 1936, dalam bentuk murni dan menamakannya alfa tokoferol. Pada tahun 1938, Ferholz berhasil menetapkan susunan kimia dari Vitamin E tersebut (Linder,1985).

Vitamin E adalah nama generik yang diberikan kepada sekelompok ikatan organik yang mempunyai kegiatan biologis tertentu. Ikatan ini terdiri atas dua jenis sub kelompok yaitu sub kelompok tokoferol dan sub kelompok tocotrienol (Soedioetomo, 1987).

Vitamin E atau tokoferol adalah turunan kroman, yang pada posisi dua mengandung isoprenoid dengan 16 atom karbon (Augustin, *et al.*, 1985). Vitamin E antara satu dengan yang lainnya hanya berbeda jumlah dan letak gugus metil pada inti benzen (Mutschler,1991). Alfa tokoferol merupakan ikatan yang tertinggi kegiatan biologisnya sebagai vitamin E karena mempunyai tiga gugus metil pada inti benzena, sedangkan struktur ikatan lainnya mempunyai kegiatan biologis lebih rendah dibandingkan dengan α -tokoferol (Sediaoetama, 1987). Adanya tiga gugus metil yang terikat pada inti benzena yang menunjukkan aktivitas yang penuh. Delta tokoferol (8 - metil tokol) karena mempunyai satu gugus metil pada inti benzena maka mempunyai aktivitas biologis lebih kecil. Penelitian yang menunjukkan bahwa konstituen yang paling banyak dalam jaringan tubuh manusia adalah α -tokoferol (Lestariana dan Madiyah,1988).



Gambar 2. Struktur α - tokoferol

c Fungsi fisiologis vitamin E

Senyawa vitamin E yang dikenal sebagai anti oksidan dan anti radikal bebas dipercaya pakar biokimia dapat membantu mencegah penyakit-penyakit seperti jantung koroner, katarak dan menghambat laju proses penuaan serta menjinakkan molekul-molekul radikal bebas yang berbahaya (Susanto,2001).

Molekul yang tidak stabil diudadalah penyebabnya. Begitu juga oksigen dalam tubuh mempunyai pengaruh yang serupa. Molekul-molekul oksigen yang tidak stabil karena sangat reaktif dan disebut radikal bebas dapat menghancurkan jaringan-jaringan tubuh melalui oksidasi pula. Radikal bebas merupakan bagian dari makanan yang di konsumsi atau diproduksi melalui proses oksidasi dalam tubuh, beberapa polutan seperti asap rokok, asap pabrik, pestisida, atau radiasi ultraviolet yang dapat bereaksi dalam tubuh menghasilkan radikal bebas, jika tidak dikendalikan radikal bebas dapat pula menyerang DNA serta merusak struktur dan fungsi membran sel sehingga dapat memicu beberapa penyakit. Aksi radikal bebas dapat dikontrol dengan system pertahanan anti oksidan diantaranya menggunakan vitamin E (Susant,2001).

Vitamin E merupakan anti oksidan (pencegah oksidasi) biologis yang berdiri sebagai benteng pertahanan pertama dalam melawan peroksida lipid penyebab kerusakan jaringan. Senyawa yang secara kimia juga disebut tokoferol ini mempunyai kemampuan melumpuhkan radikal bebas (molekul reaktif, pemicu oksidasi) dan melindungi membran sel dari serangan radikal bebas (Murray, *et al*, 1997)

Vitamin E adalah bentuk dari α - tokoferol ($C_{29}H_{50}O_2$) adalah vitamin larut lemak dan banyak terdapat pada minyak nabati (terutama minyak kedelai, minyak jagung, dan minyak biji bunga matahari), kacang-kacangan, biji-bijian, dan padi-padian. Vitamin E juga terdapat pada beberapa jenis sayuran. Dari diet sehari-hari diperkirakan asupan vitamin E 25 IU. Untuk memperoleh perlindungan yang memadai terhadap serangan jantung sekurang-kurangnya diperlukan 100 IU vitamin E setiap hari. Dosis harian vitamin E sebesar 400-800 IU masih dianggap aman tanpa akibat-akibat beracun yang

diketahui. Namun, dosis di atas 400 IU akan memunculkan dampak anti penggumpalan darah dan oleh karena itu bisa berbahaya bagi orang-orang yang akan dioperasi. Keracunan dapat terjadi bila dosis vitamin E lebih dari 3.200 IU setiap hari. Tanda-tanda keracunan mencakup pusing-pusing, diare, dan tekanan darah tinggi. (Tjay & Rahardja, 1991)

Mengenai efek dan mekanisme kerja vitamin E masih banyak pertentangan pendapat. Diduga aktivitasnya berhubungan dengan sifat antioksidan yang dimilikinya. Sebagai antioksidan, vitamin E agaknya mencegah oksidasi bagian sel yang penting atau mencegah terbentuknya hasil oksidasi yang toksik, misalnya hasil oksidasi peroksidasi asam lemak tak jenuh. Vitamin E juga memegang peranan penting dalam sintesis heme, dapat meningkatkan utilitas dari vitamin A, absorpsi, kadar di hati dan sel lain. Vitamin E juga dapat menghambat produksi prostaglandin, dan merangsang kofaktor yang penting pada metabolisme steroid. Vitamin E juga membantu mempertahankan fungsi dan struktur saraf. Karena vitamin E banyak terdapat dalam makanan, maka defisiensi vitamin E biasanya lebih sering disebabkan oleh gangguan absorpsi, misalnya steatore, obstruksi bilaris dan penyakit pancreas. (Ganiswara, 1995)

B. LANDASAN TEORI

Untuk keperluan terapi, obat sering diberikan bersama-sama dengan obat lain misalnya senyawa yang terkandung didalam minuman, makanan, buah atau obat-obatan lain atau beberapa zat aktif yang dikombinasikan dalam satu sediaan sehingga dapat menimbulkan antaraksi dengan obat tersebut. Penggunaan dua atau lebih obat bersama-sama, belum tentu efek farmakologi yang ditimbulkan merupakan penjumlahan dari efek obat-obat tersebut ketika digunakan sendiri-sendiri pada dosis yang sama.

Glibenklamid adalah antidiabetik oral golongan sulfonilurea generasi kedua yang daya kerjanya lebih kuat daripada generasi pertama (tolbutamid, klorpropamid). Mekanisme kerja glibenklamid menstimulasi sel-sel β dari pankreas sehingga pelepasan insulin ditingkatkan dan meningkatkan kepekaan sensitivitas sel-sel β terhadap rangsangan glukosa dan non glukosa. Glibenklamid termasuk obat dengan rasio ekstraksi rendah sehingga cenderung mudah mengalami antaraksi dengan senyawa penginduksi enzim.

Vitamin E dapat mencegah oksidasi bagian sel yang penting atau mencegah terbentuknya hasil oksidasi yang toksik, misalnya hasil oksidasi peroksidasi asam lemak tak jenuh. Vitamin E juga memegang peranan penting dalam sintesis heme, dapat meningkatkan utilitas dari vitamin A, absorpsi, kadar di hati dan sel lain. Vitamin E juga dapat menghambat produksi prostaglandin, dan merangsang kofaktor yang penting pada metabolisme steroid. Vitamin E merupakan antioksidan yang dapat mencegah terjadinya oksidasi lebih lanjut dari glibenklamid, sehingga kadar glibenklamida sedikit yang diubah menjadi metabolit yang tidak aktif sehingga kadar glibenklamid di dalam darah meningkat. Glibenklamid dimetabolisme secara sempurna dengan cara hidrosilasi gugus sikloheksil dengan metabolit utamanya turunan 4-trans-hidroksi dan turunan 3-cis-hidroksi. Enzim yang terlibat dalam metabolisme ini adalah sitokrom P 450 (CYP3A4) sebelum diekskresikan keluar tubuh. Adanya inhibitor ini akan berpengaruh terhadap metabolisme glibenklamida di hati. Akibatnya kadar glibenklamida meningkat di dalam darah, lebih lanjut akan meningkatkan efek farmakologinya yaitu akan menyebabkan aktivitas penurunan kadar glukosa darah.

C. HIPOTESIS

Berdasarkan landasan teori diatas maka hipotesis penelitian ini adalah bahwa Neurovit E diduga mempengaruhi efek hipoglikemik glibenklamid pada tikus yang telah dibebani glukosa.



BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. ALAT DAN BAHAN

1. Bahan

- a Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih jantan galur SD, berumur 2-3 bulan, berat badan 200-300 gram, berasal dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi UGM Jogjakarta.
- b Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah glibenklamid (PT. Kimia Farma, Indonesia), Neurovit E (PT. Kimia Farma, Indonesia), CMC (Daici, Korea), glukosa (E. Merck, Germany), reagen kit GOD-PAP (Sigma, Germany).

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. holder tikus
- b. spektrofotometer uv-vis (Genesis 10)
- c. neraca elektrik
- d. pipet mikro
- e. pisau steril
- f. stopwatch
- g. vortex
- h. alat- alat gelas
- i. sentrifuge (STATs-280 R)
- j. ependorf.
- k. timbangan tikus (OHAUSS)

B. CARA PENELITIAN

1. Pembuatan larutan CMC Na 0,5 %

Menimbang dengan seksama 0,5 g CMC Na, kemudian dimasukkan dalam beker glass 100 ml lalu dilarutkan dalam aquadest yang mendidih 80 ml sambil diaduk. Kemudian dimasukkan dalam labu takar 100 ml dan ditambahkan aquadest sampai batas.

2. Pembuatan larutan glibenklamid dosis 0,45 mg/KgBB

Penetapan dosis glibenklamid didasarkan pada dosis terapi untuk manusia.

$$\begin{aligned} \text{Untuk manusia (oral)} &= 5 \text{ mg/ } 70 \text{ Kg BB} \\ \text{Untuk tikus } 200 \text{ g} &= 0,018 \times 5 \text{ mg} \\ &= 0,09 \text{ mg/} 200 \text{ g} \\ &= 0,45 \text{ mg/ Kg BB tikus} \\ \text{Volume pemberian} &= 0,5 \text{ ml/} 200 \text{ g} \\ \text{Larutan stok yang dibuat} &= 0,09 \text{ mg/} 0,5 \text{ ml} \\ &= 0,18 \text{ mg/ml} \\ &= 18 \text{ mg/} 100 \text{ ml} \end{aligned}$$

18 mg glibenklamid ditimbang seksama, disuspensikan dalam larutan CMC Na 0,5% sebanyak 5 ml. Kemudian digerus sampai homogen. Larutan CMC Na 0,5% ditambahkan hingga volume 10,0 ml, dicampur hingga homogen.

3. Pembuatan larutan Neurovit E dosis 9 mg/KgBB

10 tablet Neurovit E digerus ad homogen, dibuat larutan stok dosis 100 mg/70 KgBB pada manusia, jika dosis pada tikus 200 mg yaitu, 1,8 mg/200gBB (9 mg/KgBB), yaitu dengan cara menimbang 0,36 g serbuk Neurovit E dilarutkan dengan CMC Na 0,5% ad 100 ml. Volume pemberian 0,5 ml.

Perhitungan:

$$\begin{aligned} \text{Dosis untuk manusia} &= 100 \text{ mg/} 70 \text{ KgBB} \\ \text{Dosis pada tikus } 200 \text{ g} &= 0,018 \times 100 \text{ mg} \\ &= 1,8 \text{ mg/} 200 \text{ g BB} \\ &= 9 \text{ mg/Kg BB tikus} \\ \text{Volume pemberian} &= 0,5 \text{ ml/} 200 \text{ g BB} \\ \text{Larutan stok} &= 1,8 \text{ mg/ } 0,5 \text{ ml} \\ &= 3,6 \text{ mg/ml} \\ &= 0,36 \text{ g/} 100 \text{ ml} \end{aligned}$$

4. Pembuatan larutan glukosa 25% b/v, dosis 625 mg/KgBB

12,5 gram glukosa anhidrat dimasukkan ke dalam beker glass 50 ml lalu dilarutkan dengan 20 ml air suling. Kemudian dimasukkan dalam labu takar 50,0 ml dan ditambahkan air suling ad 50 ml.

5. Uji Farmakologi

a. Penelitian Pendahuluan

1) Penetapan panjang gelombang serapan maksimum senyawa kuinonimin

Darah dicuplik sebanyak 1 ml melalui vena lateralis ekor ditampung dalam ependorf kemudian disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 2500 rpm. Serum diambil (bagian yang jernih) sebanyak 10 μ l, dimasukkan kedalam tabung reaksi. Larutan glukosa standar (E. Merck, Germany) 100 mg/dl sebanyak 10 μ l ditambahkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan pereaksi GOD-POD 1 ml. Larutan dicampur dengan vortex selama 1 menit, selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar (28°C) selama 10 menit. Serapan dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 450-550 nm.

2) Penetapan waktu serapan maksimum (*Operating Time*)

Darah dicuplik sebanyak 1 ml melalui vena lateralis ekor ditampung dalam ependorf kemudian disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 2500 rpm. Serum diambil (bagian yang jernih) sebanyak 10 μ l kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi. Larutan glukosa standar (E. Merck, Germany) 100 mg/dl sebanyak 10 μ l ditambahkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan pereaksi GOD-POD 1 ml. Larutan dicampur dengan vortex selama 1 menit, dan masing – masing sampel dinkubasi pada suhu kamar pada menit ke 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60. Serapan setiap larutan dibaca dengan menggunakan spektrofotometer (Genesis 10) pada panjang gelombang maksimal hasil percobaan. Waktu serapan optimum dipilih apabila menghasilkan serapan yang maksimum. Percobaan dilakukan dengan replikasi 3 kali.

3) Mencari harga perolehan kembali dan kesalahan acak glukosa dalam darah

Darah dicuplik sebanyak 1 ml melalui vena lateralis ekor ditampung dalam ependorf kemudian disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 2500 rpm. Serum diambil (bagian yang jernih) sebanyak 10 μ l kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi. Larutan glukosa standar (E. Merck, Germany) 100 mg/dl

kedalam tabung reaksi. Larutan glukosa standar (E. Merck, Germany) 100 mg/dl sebanyak 10 μ l ditambahkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan pereaksi GOD-POD 1 ml. Larutan divortex selama 1 menit, dan serapan setiap larutan dibaca dengan menggunakan spektrofotometer (Genesis 10) pada panjang gelombang maksimal hasil percobaan 1. Harga perolehan kembali dihitung dengan membagi kadar yang terukur dengan kadar sebenarnya (teoritis) dikalikan 100 %, sedangkan kesalahan acak dihitung sebagai perbandingan simpangan baku (*standart of deviation*) terhadap perolehan harga rata-rata dikalikan 100%. Percobaan dilakukan dengan replikasi 3 kali.

4) Persentase terdegradasi

Darah dicuplik sebanyak 1 ml melalui vena lateralis ekor ditampung dalam ependorf. kemudian disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 2500 rpm. Serum diambil (bagian yang jernih) sebanyak 10 μ l kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi. Larutan glukosa standar (E. Merck, Germany) 100 mg/dl sebanyak 10 μ l ditambahkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan pereaksi GOD-POD 1 ml. Larutan dicampur dengan vortex selama 1 menit. Serapan setiap larutan dibaca dengan menggunakan spektrofotometer (Genesis 10) pada panjang gelombang maksimal hasil percobaan 1. Persentase terdegradasi dihitung dengan cara membandingkan hasil terukur rata-rata dengan hasil teoritis dikalikan 100%. Jika nilai persentase terdegradasi kurang dari 10% maka metode yang dipakai bisa digunakan. Percobaan dilakukan dengan replikasi 3 kali.

b. Rancangan penelitian

1) Pengelompokan dan perlakuan hewan uji

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap pola searah. Hewan uji tikus dibagi menjadi 3 kelompok (kontrol negatif, positif dan perlakuan). Setiap kelompok terdiri dari 6 ekor tikus. Subjek uji dipuasakan (18 jam) terlebih dulu sebelum percobaan dilakukan. Masing-masing kelompok mendapat perlakuan sebagai berikut:

| |
|--|
| Kelompok I : Kontrol Negatif, diberi perlakuan suspensi CMC Na 0,5 %. |
| Kelompok II : Kontrol Positif, diberi perlakuan suspensi glibenklamid dosis 0,45mg/KgBB. |
| Kelompok III : Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB sehari sekali selama 0 hari dan glibenklamid 0,45 mg/Kg BB setelah dipuasakan 18 jam. |
| Kelompok IV : Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB sehari sekali selama 1 hari dan |

| | |
|---|---|
| glibenklamid 0,45 mg/Kg BB setelah dipuasakan 18 jam. | |
| Kelompok V | : Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB sehari sekali selama 2 hari dan glibenklamid 0,45 mg/Kg BB setelah dipuasakan 18 jam. |
| Kelompok VI | : Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB sehari sekali selama 3 hari dan glibenklamid 0,45 mg/Kg BB setelah dipuasakan 18 jam. |

Hewan uji diberi larutan glukosa 20 menit setelah perlakuan, kemudian darah dicuplik melalui vena pada menit-menit ke 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240. Kemudian ditetapkan kadarnya dengan pereaksi GOD-POD.

2) Penetapan kadar gula darah (metode enzimatik)

Sampel darah diambil sebanyak 1 ml dari vena lateralis ekor dan ditampung dalam ependorf, kemudian di sentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 2500 rpm sehingga serum akan terpisah dari darah. Serum yang diperoleh dipisahkan dari sel darah dengan mikropipet. Kemudian diambil 10 µl serum dan direaksikan dengan 1 ml reagen GOD-POD dan selanjutnya dilakukan perlakuan sebagai berikut :

| | Sampel | Standar | Blangko |
|------------------|---------|---------|---------|
| Serum darah | 10 µl | - | - |
| Larutan glukosa | - | 10 µl | - |
| Larutan pereaksi | 1000 µl | 1000 µl | 1000 µl |

Larutan tersebut kemudian diinkubasi 28° C selama 10 menit. Serapan dibaca secara spektrofotometri pada panjang gelombang 504 nm. Kadar glukosa darah dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ kadar glukosa darah} = (As/Ab) \times 100\text{mg/dl}$$

As : Absorbansi sampel

Ab : Absorbansi standar

6. Analisa Data dan Statistika

Data yang diperoleh dari penelitian ini berupa data absorbansi dari sampel yang dikumpulkan dari pemberian Neurovit E mulai hari ke – 0 samapi hari ke – 3 dan blanko. Kemudian dihitung kadar glukosanya dengan rumus:

$$\text{kadar glukosa darah} = (As/Ab) \times 100\text{mg/dl}$$

Data glukosa darah tiap tikus diperhitungkan AUC_{0-240} - nya (*Area Under Curve 0-240*), yaitu luas area dibawah kurva hubungan kadar gula darah (mg/dl) terhadap waktu pencuplikan (0-240) dengan metode trapezoid.

Rumus perhitungan nilai AUC_{0-240} :

$$AUC_{0-240} = \left[T_2 - T_1 \times \left(\frac{K_2 + K_1}{2} \right) + T_3 - T_2 \times \left(\frac{K_3 + K_2}{2} \right) + \dots + T_n - T_{n-1} \times \left(\frac{K_n + K_{n-1}}{2} \right) \right]$$

Keterangan :

T_1 = Waktu pengambilan cuplikan sampel darah pada menit ke - 0

T_2 = Waktu pengambilan cuplikan sampel darah pada menit ke- 15

T_3 = Waktu pengambilan cuplikan sampel darah pada menit ke -30

T_n = Waktu pengambilan cuplikan sampel darah pada menit ke - n

T_{n-1} = Waktu pengambilan cuplikan sampel darah pada menit ke - n-1

K_1 = Kadar glukosa serum darah pada menit ke - 0

K_2 = Kadar glukosa serum darah pada menit ke - 15

K_3 = Kadar glukosa serum darah pada menit ke - 30

K_n = Kadar glukosa serum darah pada menit ke - n

K_{n-1} = Kadar glukosa serum darah pada menit ke - n-1

Sedangkan untuk persentase daya hipoglikemia pada setiap perlakuan dapat dihitung dengan membandingkan nilai AUC_{0-240} tiap perlakuan dengan kontrol negatif menggunakan rumus:

$$\% \text{ Daya Hipoglikemik} = \frac{(AUC_{0-240})_{kn} - (AUC_{0-240})_{bu}}{(AUC_{0-240})_{kn}} \times 100\%$$

Keterangan:

$(AUC_{0-240})_{kn}$ = AUC_{0-240} rata-rata kontrol negatif (menit.mg/dl)

$(AUC_{0-240})_p$ = AUC_{0-240} masing-masing perlakuan (menit.mg/dl)

Data AUC_{0-240} dan persentase daya hipoglikemia semua perlakuan dianalisa dengan piranti lunak spss versi 10,0. Jika data berdistribusi normal akan dianalisa secara statistik Anava satu jalan dan dilanjutkan dengan uji Tukey dengan taraf kepercayaan 95 % jika terdapat perbedaan yang bermakna. Akan tetapi, jika data bersifat non parametrik atau tidak berdistribusi normal maka dianalisis menggunakan uji Kruskal-Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney dengan taraf kepercayaan 95 % jika terdapat perbedaan yang bermakna.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

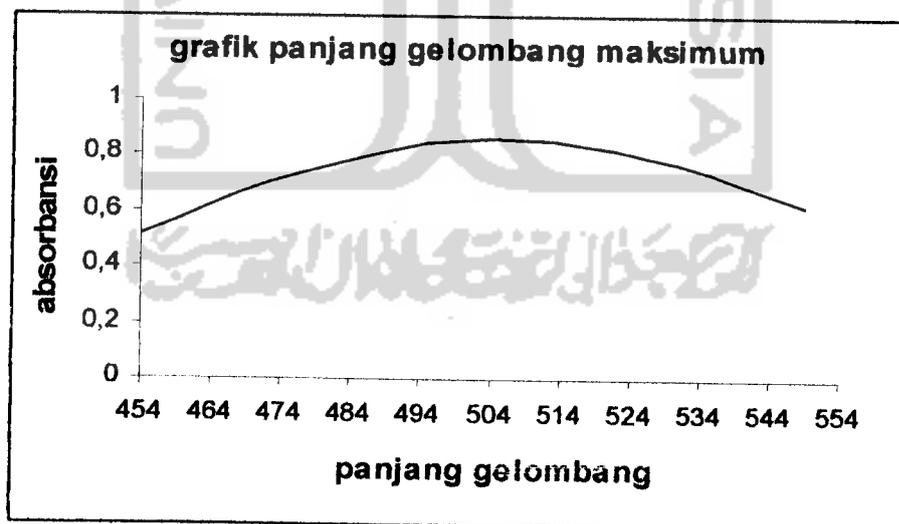


Sebelum dilakukan analisa kadar glukosa dalam darah dengan metode spektrofotometri maka harus dilakukan validasi metode dengan tujuan untuk meyakinkan bahwa metode yang digunakan sesuai dengan tujuan analisis yang ditetapkan. Kriteria penerimaan suatu metode didasarkan pada tingkat sensitivitas, selektivitas, dan keakuratan.

1. VALIDASI METODE

a. Penetapan panjang gelombang serapan maksimum

Penetapan panjang gelombang maksimum ini dimaksudkan untuk mengetahui panjang gelombang yang memberikan serapan yang maksimum dari senyawa berwarna yang terbentuk. Sehingga akan didapatkan satuan konsentrasi yang besar yang menunjukkan kepekaan dari suatu pengukuran. Serapan dibaca pada panjang gelombang antara 400 - 500 nm dengan spektrofotometer. Hasil penetapan panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada tabel I sedangkan kurva hubungan antara panjang gelombang dengan absorbansi yang dihasilkan dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Kurva hubungan antara panjang gelombang dengan absorbansi sample glukosa

Tabel I. Hasil penetapan panjang gelombang serapan maksimum

| Panjang gelombang | Absorbansi |
|-------------------|--------------|
| 450 | 0,479 |
| 459 | 0,569 |
| 468 | 0,663 |
| 477 | 0,739 |
| 486 | 0,799 |
| 495 | 0,844 |
| 504 | 0,861 |
| 513 | 0,851 |
| 522 | 0,819 |
| 531 | 0,772 |
| 540 | 0,699 |
| 549 | 0,62 |

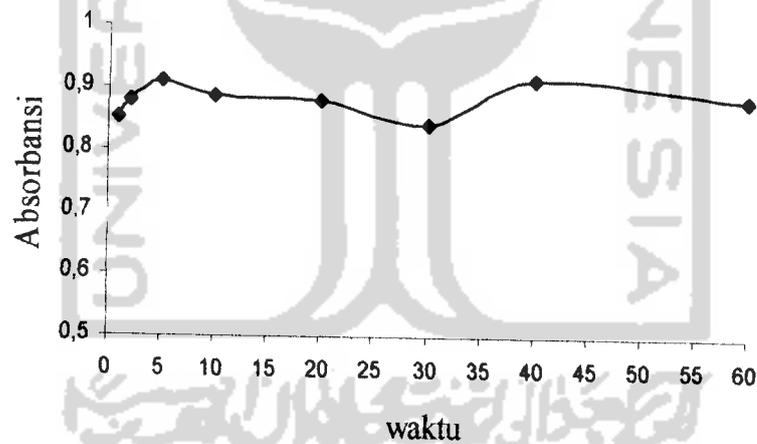
Dari gambar 3 dan tabel I dapat dilihat bahwa pada panjang gelombang 504 nm absorbansi yang dihasilkan adalah paling tinggi (maksimum) bila dibandingkan dengan panjang gelombang yang lainnya. Oleh karena itu, maka panjang gelombang yang dipakai untuk mengukur absorbansi sampel adalah 504 nm.

b. Penetapan waktu serapan optimum (*Operating Time*) senyawa kuinonimin

Penetapan waktu serapan optimum (*operating time*) ini adalah untuk mengetahui waktu pengukuran yang paling stabil dimana senyawa berwarna yang terbentuk memberikan serapan yang stabil. Pada saat itu seluruh glukosa telah bereaksi sempurna dengan reagen GOD-POD dan senyawa berwarna telah terbentuk dengan sempurna. Hasil penetapan waktu serapan optimum dapat dilihat pada tabel II sedangkan kurva hubungan antara waktu inkubasi dengan stabilitas serapan dapat dilihat pada gambar 4.

Tabel II. Hasil penetapan waktu serapan optimum glukosa senyawa kuinonimin dalam darah terhadap waktu inkubasi (menit)

| Menit ke | Absorbansi |
|----------|------------|
| 1 | 0,851 |
| 2 | 0,879 |
| 5 | 0,911 |
| 10 | 0,887 |
| 20 | 0,878 |
| 30 | 0,842 |
| 40 | 0,913 |
| 60 | 0,883 |

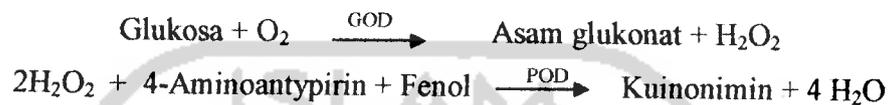


Gambar 4. Kurva hubungan waktu dengan absorbansi

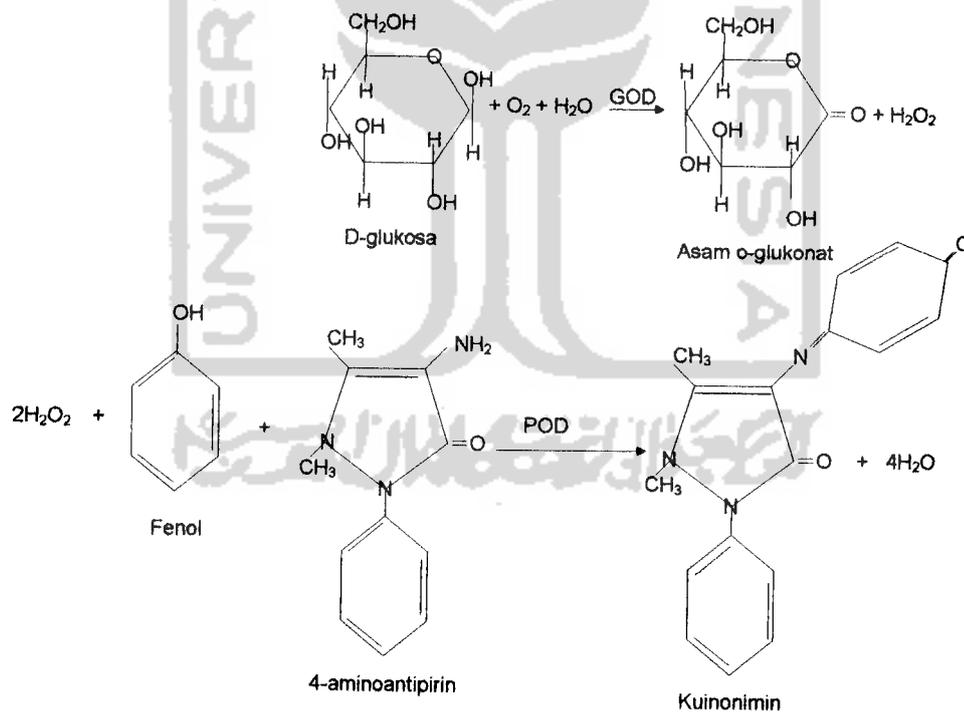
Dari gambar 4 dapat dilihat waktu yang memberikan serapan stabil terdapat pada menit ke-10 sampai dengan menit ke-20 berarti pada menit tersebut reaksi antara glukosa dengan reagen telah berjalan dengan sempurna dan membentuk senyawa berwarna merah (senyawa kuinominim), tapi pada menit ke - 30 menunjukkan

adanya penurunan serapan dimana penurunan ini menunjukkan adanya proses degradasi pada senyawa kuinonimin. Maka penetapan kadar glukosa darah membutuhkan waktu inkubasi antara 10 – 20 menit dan tidak boleh dari 30 menit.

Pada metode enzimatik, kadar glukosa dalam serum ditetapkan dengan glukosa oksidase, peroksidase, dan aseptor oksigen. Dalam metode ini β - D - glukosa oksidase diubah menjadi asam glukonat dan H_2O_2 dengan reaksi:



H_2O_2 yang terjadi oleh peroksidase dan aseptor oksigen akan diubah menjadi zat berwarna merah. Biasanya interaksi warna tersebut berbanding lurus dengan kadar glukosa yang ada (Henry *et al.*, 1974, cit Azizah, 2003)



Gambar 5. Reaksi pembentukan kompleks warna senyawa kuinonimin (Henry, *et al.*, cit. Azizah, 2003).

c. Perolehan kembali dan kesalahan acak glukosa standar kadar 100 mg/dl

Menurut Donatus (1989) yang menjelaskan ketelitian (*accuracy*) dan ketepatan (*precision*) dalam penelitian metode analisis penetapan kadar akan menentukan kesahihan hasil penetapan kadar. Ketepatan menunjukkan kedekatan hasil pengukuran berulang pada cuplikan hayati yang sama dan diketahui dari harga replikasinya yang dinyatakan dalam kesalahan acak (koefisien variasi). Ketelitian ditunjukkan oleh kemampuan metode memberikan hasil pengukuran sedekat mungkin dengan harga sesungguhnya yang dapat diketahui dari harga perolehan kembali (*recovery*). Menurut Pachla *et al* (1986) persyaratan yang dituntut bagi suatu metode tersebut dapat memberikan nilai perolehan kembali yang tinggi (75 – 90 %), kesalahan acak kurang dan sistemik kurang dari 10 %.

Penentuan ketepatan dan ketelitian suatu metode enzimatik pada penetapan kadar glukosa dengan *recovery* dan kesalahan acak yang didapat dari perhitungan kadar glukosa darah dari cuplikan sample yang dibuat 3 kali replikasi. *Recovery* rata – rata yang diperoleh adalah 80,23 % dan harga kesalahan acak yang diperoleh adalah 7,20 %, sehingga metode ini mempunyai ketepatan dan ketelitian yang tinggi dan dapat dipakai untuk penelitian ini. Harga perolehan kembali (*recovery*) dan kesalahan acak pada penetapan glukosa darah dengan metode enzimatik dapat dilihat pada table III berikut:

Tabel III. Nilai perolehan kembali (*recovery*) dan kesalahan acak glukosa standar (100 mg/dl) dalam serum

| Kadar sebenarnya | Absorbansi sampel | Kadar Terukur (mg/dl) | Perolehan Kembali (%) | Kesalahan acak (%) |
|--------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| 100 mg/dl | 1,789 | 86,69 | 86,69 | 7,20 |
| | 1,736 | 78,40 | 78,40 | |
| | 1,718 | 75,59 | 75,59 | |
| Mean ± SE : 80,23 ± 3,34 | | | | |

d. Penentuan persentase terdegradasi

Persentase terdegradasi dilakukan untuk mengantisipasi apabila sampel belum dapat segera diproses pada waktu pengambilan cuplikan. Persen terdegradasi dihitung dengan cara membandingkan hasil terukur rata – rata dengan hasil teoritis dikalikan 100 % atau dilihat dari nilai *recovery*-nya. Suatu metode analisis dikatakan reproduksibel apabila nilai *recovery*-nya antara 75 – 95 % (Pachla *et al*, 1986). Nilai persen terdegradasi yang diperbolehkan adalah kurang dari 10 %. Hasil dari persen terdegradasi dapat dilihat pada tabel IV dibawah ini.

Tabel IV. Harga persen terdegradasi penetapan kadar glukosa darah metode enzimatis

| Waktu pada menit ke | Absorbansi | Kadar terukur (mg/dl) | % terdegradasi |
|---------------------|------------|-----------------------|----------------|
| 0 | 1,020 | 94,75 | 0 |
| 5 | 1,003 | 92,02 | 2,88 |
| 10 | 0,999 | 91,39 | 3,55 |
| 15 | 0,980 | 88,49 | 6,61 |
| 30 | 0,953 | 84,11 | 11,23 |
| 60 | 0,928 | 80,28 | 15,27 |
| 90 | 0,896 | 75,27 | 20,56 |
| 120 | 0,89 | 74,33 | 21,55 |
| 180 | 0,865 | 70,50 | 25,59 |
| 240 | 0,846 | 67,45 | 28,81 |

Dari tabel IV dapat dilihat dari harga perolehan kembali glukosa dalam darah dari menit ke- 0 – ke- 15 berada diatas nilai 85 %, tetapi pada waktu diatas menit ke-30 sudah tidak mencapai nilai 85 % lagi, hal ini menunjukkan penyimpanan terlalu lama akan menyebabkan turunnya harga perolehan kembali, sedangkan dilihat dari harga % terdegradasinya bahwa setelah menit ke 15 sampel terdegradasi lebih dari 10 %. Oleh karena itu untuk menghindari kesalahan dan memperoleh hasil yang maksimal dalam penetapan kadar glukosa darah dalam sampel serum maka proses penetapan kadar dilakukan sebelum menit ke-15 karena dimungkinkan setelah 15 menit serum mengalami degradasi.

2. UJI AKTIVITAS HIPOGLIKEMIK GLIBENKLAMID

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lamanya pemberian Neurovit E terhadap efek hipoglikemia glibenklamid pada tikus jantan galur SD yang dibebani glukosa, dengan rancangan acak lengkap pola searah. Hewan uji yang digunakan harus mempunyai keseragaman galur, umur dan berat badan. Dalam penelitian ini digunakan metode enzimatis karena metode ini paling sering digunakan, cukup sederhana dan dapat memberikan hasil dalam waktu yang cukup singkat. Selain itu, metode ini juga memiliki sensitifitas yang cukup tinggi (Richerich & Colombo, *cit* Zubaidah, 2002).

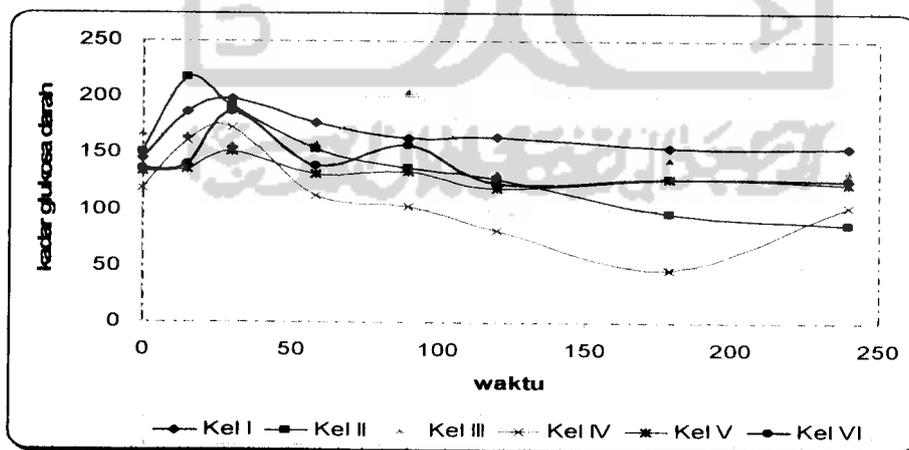
Sebelum mendapat perlakuan semua hewan uji dipuasakan terlebih dahulu selama 18 jam hal ini dilakukan untuk menghindari variasi kadar glukosa darah karena adanya asupan makanan yang masuk pada setiap hewan uji. Hewan uji dikelompokkan menjadi 3 kelompok, kelompok I diberi perlakuan suspensi CMC Na 0,5 % (kontrol negatif), kelompok II diberi perlakuan suspensi glibenklamid 0,45 mg/KgBB dalam CMC Na 0,5% (kontrol positif), kelompok III diberi Neurovit E selama 0 hari (diberi Neurovit E langsung dilakukan penyamplingan), kelompok IV diberi Neurovit E selama 1 hari (diberi Neurovit E setiap 24 jam sekali selama 1 hari, kemudian 24 jam berikutnya dilakukan penyamplingan), kelompok V diberi Neurovit E selama 2 hari (diberi Neurovit E setiap 24 jam sekali selama 2 hari, pada hari ke 2 dilakukan penyamplingan), dan kelompok VI diberi Neurovit E selama 3 hari (diberi Neurovit E setiap 24 jam sekali selama 3 hari, pada hari ke 3 dilakukan penyamplingan).

Semua hewan uji mendapatkan pembebanan glukosa dengan pemberian larutan glukosa 25 % b/v. Pembebanan glukosa ini selain untuk uji toleransi glukosa oral juga dimaksudkan untuk menimbulkan efek hiperglikemia pada hewan uji, dengan timbulnya efek hiperglikemia maka dapat merangsang pengeluaran insulin, sehingga responnya terhadap glukosa pada setiap hewan uji bisa sama dengan demikian kadar glukosa darah tidak terlalu bervariasi. Karena dalam kondisi normal atau puasa, kadar glukosa darah atau perangsangan terhadap insulin sangat bervariasi.

Sedangkan pembebanan glukosa dosis 25 % b/v didasarkan pada berbagai penelitian (Wair *et al.*, cit Nugroho, 2001). Pembebanan glukosa dilakukan pada menit ke - 20 sesudah perlakuan glibenklamid dosis 0,45 mg/KgBB dalam CMC Na 0,5%, dengan asumsi bahwa dalam jangka waktu 20 menit tersebut glibenklamid dan Neurovit E telah diabsorbsi sempurna sehingga zat aktif pada obat tersebut diharapkan telah memulai aksinya pada saat beban glukosa oral diberikan. Penentuan waktu absorbsi optimal ini (20 menit) berdasarkan percobaan orientasi pada berbagai penelitian. Pengaruh lamanya pemberian Neurovit E 9 mg/Kg BB terhadap aktivitas hipoglikemia glibenklamid pada tikus dapat dilihat pada tabel V dan gambar 6 dibawah ini.

Tabel V. Kadar glukosa darah tikus setelah perlakuan ($X \pm SE$) (n = 6)

| Waktu (menit) | Purata Kadar Glukosa Darah (mg/dl) \pm SE | | | | | |
|---------------|---|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| | I | II | III | IV | V | VI |
| 0 | 145,64 \pm 10,99 | 149,97 \pm 10,38 | 167,01 \pm 16,62 | 114,18 \pm 5,43 | 133,07 \pm 6,27 | 135,92 \pm 5,30 |
| 15 | 186,83 \pm 19,10 | 217,35 \pm 7,99 | 165,18 \pm 7,19 | 161,35 \pm 9,66 | 135,63 \pm 28,63 | 139,33 \pm 16,87 |
| 30 | 198,44 \pm 11,90 | 191,99 \pm 7,76 | 158,19 \pm 16,34 | 172,56 \pm 10,710 | 151,80 \pm 22,6 | 186,75 \pm 12,31 |
| 60 | 176,55 \pm 10,4 | 153,39 \pm 13,22 | 158,92 \pm 6,15 | 112,34 \pm 9,11 | 131,59 \pm 21,19 | 138,60 \pm 5,3 |
| 90 | 163,15 \pm 11,10 | 136,57 \pm 8,38 | 204,49 \pm 26,82 | 103,12 \pm 15,98 | 133,58 \pm 11,91 | 156,99 \pm 13,55 |
| 120 | 164,48 \pm 16,50 | 126,81 \pm 12,84 | 132,03 \pm 12,19 | 81,85 \pm 18,71 | 118,62 \pm 11,64 | 122,80 \pm 6,40 |
| 180 | 155,11 \pm 16,4 | 86,72 \pm 5,14 | 143,92 \pm 5,87 | 46,58 \pm 7,06 | 227,62 \pm 25,68 | 126,71 \pm 5,54 |
| 240 | 154,30 \pm 20,10 | 86,72 \pm 3,38 | 134,22 \pm 7,39 | 102,24 \pm 7,39 | 122,40 \pm 7,21 | 126,21 \pm 12,22 |



Gambar 6. Kurva purata kadar glukosa darah (mg/dl) terhadap waktu (menit) akibat praperlakuan Neurovit E

Keterangan :

Kelompok I : Kontrol Negatif, diberi perlakuan suspensi CMC Na 0,5 %.

Kelompok II : Kontrol Positif, diberi perlakuan suspensi glibenklamid dosis 0,45 mg/KgBB.

Kelompok III : Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/KgBB selama 0 hari (diberi Neurovit E langsung dilakukan penyamplingan) dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB

Kelompok IV : Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/KgBB selama 1 hari. (diberi Neurovit E setiap 24 jam sekali selama 1 hari) dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB

Kelompok V : Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/KgBB selama 2 hari (diberi Neurovit E setiap 24 jam sekali selama 2 hari) dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB

Kelompok VI : Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/KgBB selama 3 hari (diberi Neurovit E setiap 24 jam sekali selama 3 hari) dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB

Dari table V dan gambar 6 terlihat bahwa purata kadar glukosa darah kelompok perlakuan setelah pemberian Neurovit E 9 mg/Kg BB selama 0, 1, 2 dan 3 hari lebih rendah jika dibandingkan dengan kontrol negatif dan kontrol positif. Pada perlakuan kontrol negatif purata kadar glukosa darah paling tinggi bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain. Hal ini disebabkan karena pada kontrol negatif tikus hanya diberi perlakuan suspensi CMC Na 0,5 % saja, sehingga kadar glukosa darah cenderung lebih tinggi. Kontrol positif mengalami penurunan purata kadar glukosa darah karena mendapat perlakuan glibenklamid 0,45 mg/KgBB yang merupakan obat untuk menurunkan glukosa darah.

Pengaruh pemberian Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB sehari sekali selama 0,1, 2 dan 3 hari terhadap aktivitas hipoglikemia glibenklamid dapat dilihat dari nilai AUC_{0-240} (*Area Under Curve* $_{0-240}$) yang semakin kecil. Nilai AUC_{0-240} dapat dilihat pada tabel VI dibawah ini:

Tabel VI. Nilai AUC_{0-240} (menit.mg/dl) setelah pemberian perlakuan ($X \pm SE$)

| Kelompok | AUC_{0-240} (menit.mg/dl) \pm SE |
|--|--------------------------------------|
| Suspensi CMC Na 0,5 % | 39887,72 \pm 2324,97 |
| Suspensi glibenklamida 0,45 mg/KgBB | 31462,25 \pm 1333,51 |
| Neurovit E 9 mg/Kg BB 0 hari dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB | 36794,99 \pm 1580.40 |
| Neurovit E 9 mg/Kg BB 1 hari dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB | 23203,25 \pm 1948.16 |
| Neurovit E 9 mg/Kg BB 2 hari dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB | 31070,82 \pm 2597.66 |
| Neurovit E 9 mg/Kg BB 3 hari dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB | 33093,70 \pm 751.44 |

Harga AUC₀₋₂₄₀ dari setiap kelompok perlakuan kemudian diuji statistik dengan *one way anova* jika terdapat perbedaan yang bermakna dilanjutkan dengan uji Tukey ($p < 0,05$). Sebelum data diuji dengan anova data yang akan diuji harus memenuhi syarat yaitu populasi data yang akan diuji terdistribusi normal, varian dalam populasi sampel tersebut tidak saling berhubungan satu dengan yang lain (Santosa, 2000).

Untuk mengetahui normalitas distribusi dapat dilakukan dengan uji Kolmogorov-Smirnov, hasil output uji ini dapat dilihat pada lampiran 3.

Hipotesis:

H_0 : keenam populasi terdistribusi normal

H_1 : keenam populasi tidak terdistribusi normal

Pengambilan keputusan:

Jika probabilitas $> 0,05$ maka H_0 diterima

Jika probabilitas $< 0,05$ maka H_0 ditolak

Keputusan

Hasil yang diperoleh menunjukkan nilai probabilitas 0,893, oleh karena probabilitasnya $> 0,05$ maka H_0 diterima atau semua data terdistribusi normal.

Untuk memenuhi syarat data berasal dari populasi yang sama (varian sama) dapat diketahui dari *test of homogeneity of variance* yang merupakan bagian dari anova.

Hipotesis:

H_0 : keenam variansi populasinya sama/identik

H_1 : keenam variansi populasinya tidak sama/ tidak identik

Pengambilan keputusan:

Jika probabilitas $> 0,05$ maka H_0 diterima

Jika probabilitas $< 0,05$ maka H_0 ditolak

Keputusan

Terlihat bahwa Lavene Statistic adalah 2,607 dengan nilai probabilitas 0,045, oleh karena probabilitasnya $> 0,05$ maka H_0 diterima atau keenam varian adalah sama /identik.

Karena semua syarat anova sudah terpenuhi maka uji anova dapat dilanjutkan. Hasil output analisis anova hipotesis yang digunakan:

H_0 : Tidak ada pengaruh lamanya pemberian Neurovit E

H_1 : Ada pengaruh lamanya pemberian Neurovit E.

Pengambilan keputusan :

Jika probabilitas $> 0,05$, maka H_0 diterima

Jika probabilitas $< 0,05$, maka H_0 ditolak

Keputusan :

Terlihat bahwa F_{hitung} adalah 9,401 dengan nilai probabilitas 0,00, oleh karena probabilitasnya < 0.05 , maka H_0 ditolak atau pada keenam perlakuan berbeda nyata atau menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada nilai AUC_{0-240} -nya setelah perlakuan Neurovit E 9 mg/Kg BB selama 0, 1, 2, dan 3 hari jika dibandingkan dengan kontrol negatif dan positif. Hasil output uji anova satu arah dari AUC_{0-240} masing-masing kelompok perlakuan selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 5.

Untuk membandingkan perbedaan yang bermakna pengaruh lamanya pemberian Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB terhadap nilai AUC_{0-240} antar kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan Neurovit E 9 mg/Kg BB sehari sekali selama 0, 1, 2, dan 3 hari, maka dilakukan uji Tukey dengan tingkat kepercayaan 95 %. Hasil analisa uji Tukey dapat dilihat pada tabel VII.

Pada uji Tukey terlihat bahwa AUC_{0-240} kelompok perlakuan yang diberi Neurovit E 9 mg/Kg BB sehari sekali selama 0, 1, 2, dan 3 hari terjadi penurunan yang bermakna dibandingkan dengan kontrol negatif dan kontrol positif ($p < 0,05$). Semakin kecil nilai AUC maka penurunan kadar glukosa darah semakin meningkat dengan kata lain terjadi peningkatan aktivitas hipoglikemia glibenklamida. Akan tetapi, pemberian Neurovit E 9 mg/Kg BB sehari sekali selama 0, 1, 2, dan 3 hari tidak menunjukkan penurunan nilai AUC secara bermakna ($p < 0,05$), artinya lamanya hari tidak mempengaruhi penurunan kadar glukosa darah hewan uji.

Tabel VII. Analisa Uji Tukey nilai AUC₀₋₂₄₀ (menit. mg/dl) (P < 0,005)

| (I) perlakuan | (J) perlakuan | Sig. | Keterangan |
|-----------------------------------|------------------------------------|-------|------------------|
| Kontrol negatif | Kontrol positif | 0,035 | Signifikan |
| | Vit E selama 0 hari sehari sekali | 0,845 | Tidak signifikan |
| | Vit E selama 1 hari sehari sekali | 0,000 | Signifikan |
| | Vit E selama 2 hari sehari sekali | 0,024 | Signifikan |
| | Vit E selama 3 hari sehari sekali. | 0,133 | Tidak signifikan |
| Kontrol positif | Kontrol negatif | 0,035 | Signifikan |
| | Vit E selama 0 hari sehari sekali | 0,352 | Tidak signifikan |
| | Vit E selama 1 hari sehari sekali | 0,040 | Signifikan |
| | Vit E selama 2 hari sehari sekali | 1,000 | Tidak signifikan |
| | Vit E selama 3 hari sehari sekali | 0,999 | Tidak signifikan |
| Vit E selama 0 hari sehari sekali | Kontrol negatif | 0,845 | Tidak signifikan |
| | Kontrol positif | 0,352 | Tidak signifikan |
| | Vit E selama 1 hari sehari sekali | 0,000 | Signifikan |
| | Vit E selama 2 hari sehari sekali | 0,279 | Tidak signifikan |
| | Vit E selama 3 hari sehari sekali | 0,723 | Tidak signifikan |
| Vit E selama 1 hari sehari sekali | Kontrol negatif | 0,000 | Signifikan |
| | Kontrol positif | 0,040 | Signifikan |
| | Vit E selama 0 hari sehari sekali | 0,000 | Signifikan |
| | Vit E selama 2 hari sehari sekali | 0,056 | tidak signifikan |
| | Vit E selama 3 hari sehari sekali | 0,009 | Signifikan |
| Vit E selama 2 hari sehari sekali | Kontrol negatif | 0,024 | Signifikan |
| | Kontrol positif | 1,000 | Tidak signifikan |
| | Vit E selama 0 hari sehari sekali | 0,279 | Tidak signifikan |
| | Vit E selama 1 hari sehari sekali | 0,056 | Tidak signifikan |
| | Vit E selama 3 hari sehari sekali | 0,971 | Tidak signifikan |

| | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-------|------------------|
| Vit E selama 3 hari sehari sekali | Kontrol negatif | 0,133 | Tidak signifikan |
| | Kontrol positif | 0,989 | Tidak signifikan |
| | Vit E selama 0 hari sehari sekali | 0,723 | Tidak signifikan |
| | Vit E selama 1 hari sehari sekali | 0,009 | Signifikan |
| | Vit E selama 2 hari sehari sekali | 0,971 | Tidak signifikan |

Keterangan :

Kontrol negatif : Suspensi CMC Na 0,5%

Kontrol positif : Suspensi glibenklamid 0,45 mg/KgBB

Vit E 0 hari : Pemberian Neurovit E 9 mg/Kg BB selama 0 hari sehari sekali dan glibenklamid 0,45 mg/Kg BB setelah dipuasakan 18 jam.

Vit E 1 hari : Pemberian Neurovit E 9 mg/Kg BB selama 1 hari sehari sekali dan glibenklamid 0,45 mg/Kg BB setelah dipuasakan 18 jam.

Vit E 2 hari : Pemberian Neurovit E 9 mg/Kg BB selama 2 hari sehari sekali dan glibenklamid 0,45 mg/Kg BB setelah dipuasakan 18 jam.

Vit E 3 hari : Pemberian Neurovit E 9 mg/Kg BB selama 3 hari sehari sekali dan glibenklamid 0,45 mg/Kg BB setelah dipuasakan 18 jam.

Untuk melihat pengaruh pemberian Neurovit E 100 mg sehari sekali selama 0, 1, 2 dan 3 hari dapat dilihat dari persentase daya hipoglikemia jika dibandingkan dengan kontrol positif. Persentase daya hipoglikemia setelah perlakuan dapat dilihat pada tabel VIII dibawah ini:

Tabel VIII. Aktivitas penurunan kadar gula darah bandingkan terhadap kontrol negatif (%) ($X \pm SE$)

| Kelompok Perlakuan | N | % Daya hipoglikemik \pm SE |
|---|---|------------------------------|
| Glibenklamid 0,45 mg/KgBB | 6 | 21,12 \pm 3,34 |
| Neurovit E 9 mg/KgBB 0 hari dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB | 6 | 7,75 \pm 3,96 |
| Neurovit E 9 mg/KgBB 1 hari dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB | 6 | 41,83 \pm 4,88 |
| Neurovit E 9 mg/KgBB 2 hari dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB | 6 | 22,10 \pm 6,51 |
| Neurovit E 9 mg/KgBB 3 hari dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB | 6 | 17,03 \pm 1,88 |

Dari data diatas kemudian dianalisis dengan menggunakan uji anava satu arah, jika terdapat perbedaan yang bermakna setelah perlakuan Neurovit E 9 mg/KgBB selama 0, 1, 2 dan 3 hari dapat dilanjutkan ke uji Tukey. Hasil uji analisis anava selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 6.

Pada uji anava, hipotesis yang digunakan:

H_0 : Tidak ada pengaruh lamanya pemberian Neurovit E terhadap penurunan kadar glukosa darah.

H_1 : Ada pengaruh lamanya pemberian Neurovit E terhadap penurunan kadar glukosa darah.

Pengambilan keputusan :

Jika probabilitas $> 0,05$, maka H_0 diterima

Jika probabilitas $< 0,05$, maka H_0 ditolak

Keputusan :

Terlihat bahwa F_{hitung} adalah 8,036 dengan nilai probabilitas 0,00, oleh karena probabilitasnya < 0.05 , maka H_0 ditolak atau ada pengaruh lamanya pemberian Neurovit E terhadap penurunan kadar glukosa darah atau perlakuan Neurovit E 9 mg/Kg BB sehari sekali selama 0, 1, 2 dan 3 hari dapat menurunkan kadar glukosa darah secara bermakna. Hasil uji analisis Anova selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 7.

Hasil analisa uji Tukey pada tabel IX terlihat adanya aktivitas penurunan kadar glukosa darah secara bermakna ($p < 0,05$) perlakuan Neurovit E 9 mg/Kg BB sehari sekali selama 0, 1, 2 dan 3 hari jika dibandingkan dengan kontrol negatif berturut – turut sebesar -21,12 %; -7,75 %; -41,83 %; -22,10 % dan -17,03 %. Perbedaan yang bermakna juga ditunjukkan pada perlakuan Neurovit E 9 mg selama 1 hari sebesar 20,7067% jika dibandingkan dengan kontrol positif. Lamanya pemberian Neurovit E yang berbeda bermakna terjadi juga pada perlakuan 0, 2 dan 3 hari jika dibandingkan dengan perlakuan 1 hari , berturut – turut sebesar 34,0750 %; 19,7250 %; dan 24,7967 %.

Pengaruh pemberian Neurovit E 9 mg/KgBB hanya terdapat pada pemberian hari ke – 1 jika dibandingkan dengan kontrol positif (pemberian larutan glibenklamid 0,45 mg/KgBB), hal ini dimungkinkan pemberian Neurovit E Selama 1 hari dapat terabsorpsi sempurna oleh tubuh, semakin lama waktu pemberian maka akan menyebabkan Neurovit E termetabolisme oleh tubuh sehingga pada pemberian hari ke – 2 dan 3 tidak terlihat adanya penurunan yang signifikan jika dibanding dengan kontrol positif.

Tabel IX. Analisis Uji Tukey persentase daya hipoglikemia dibandingkan terhadap kontrol negatif ($P < 0,005$)

| (I) perlakuan | (J) perlakuan | Sig. | Keterangan |
|-------------------|-------------------|-------|------------------|
| Kontrol positif | Neurovit E 0 hari | 0,231 | Tidak signifikan |
| | Neurovit E 1 hari | 0,021 | Signifikan |
| | Neurovit E 2 hari | 1,000 | Tidak signifikan |
| | Neurovit E 3 hari | 0,964 | Tidak signifikan |
| Neurovit E 0 hari | Kontrol positif | 0,231 | Tidak signifikan |
| | Neurovit E 1 hari | 0,000 | Signifikan |
| | Neurovit E 2 hari | 0,176 | Tidak signifikan |
| | Neurovit E 3 hari | 0,577 | Tidak signifikan |
| Neurovit E 1 hari | Kontrol positif | 0,021 | Signifikan |
| | Neurovit E 0 hari | 0,000 | Signifikan |
| | Neurovit E 2 hari | 0,030 | Signifikan |
| | Neurovit E 3 hari | 0,004 | Signifikan |
| Neurovit E 2 hari | Kontrol positif | 1,000 | Tidak signifikan |
| | Neurovit E 0 hari | 0,176 | Tidak signifikan |
| | Neurovit E 1 hari | 0,030 | Signifikan |
| Neurovit E 3 hari | Neurovit E 0 hari | 0,923 | Tidak signifikan |
| | Kontrol positif | 0,964 | Tidak signifikan |
| | Neurovit E 0 hari | 0,577 | Tidak signifikan |
| | Neurovit E 1 hari | 0,004 | Signifikan |
| | Neurovit E 2 hari | 0,923 | Tidak signifikan |

Keterangan :

| | |
|--------------|---|
| Kelompok I | : Kontrol Negatif, diberi perlakuan suspensi CMC Na 0,5 %. |
| Kelompok II | : Kontrol Positif, diberi perlakuan suspensi glibenklamid dosis 0,45 mg/KgBB. |
| Kelompok III | : Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB selama 0 hari sehari sekali dan glibenklamid 0,45 mg/Kg BB. |
| Kelompok IV | : Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB selama 1 hari sehari sekali dan glibenklamid 0,45 mg/Kg BB. |
| Kelompok V | : Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB selama 2 hari sehari sekali dan glibenklamid 0,45 mg/Kg BB |
| Kelompok VI | : Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB selama 3 hari sehari sekali dan glibenklamid 0,45 mg/Kg BB |

Adanya peningkatan efek hipoglikemik glibenklamid karena pengaruh lamanya pemberian Neurovit E 9 mg/Kg BB dapat disebabkan oleh beberapa kemungkinan yang dapat dilihat dari sisi farmakokinetik dan farmakodinamik. Obat yang masuk kedalam tubuh melalui berbagai cara pemberian umumnya mengalami absorpsi, distribusi, biotransformasi, dan pengikatan untuk sampai ketempat kerja dan menimbulkan efek. Kemudian, dengan atau tanpa biotransformasi, obat diekskresikan dari dalam tubuh. Seluruh proses ini disebut proses farmakokinetik. Proses farmakodinamik meliputi efek biokimiawi dan fisiologi obat serta mekanisme kerjanya (Ganiswara, *et al.*, 1995).

Peningkatan efek hipoglikemia glibenklamida setelah perlakuan Neurovit E 9 mg/Kg BB sehari sekali selama 0, 1, 2, dan 3 hari kemungkinan disebabkan oleh hal-hal berikut ini. Kemungkinan pertama, interaksi bisa terjadi pada fase absorpsi. Pada fase ini Vitamin E dapat meningkatkan kadar glibenklamida di dalam darah. Peningkatan ini akan menyebabkan aktivitas penurunan kadar glukosa darah dari glibenklamida meningkat tajam. Kedua, vitamin E merupakan antioksidan yang dapat mencegah terjadinya oksidasi lebih lanjut dari glibenklamida, sehingga kadar glibenklamida sedikit yang diubah menjadi metabolit yang tidak aktif (Carr & Frei, 1999; Rifici & Khachadurian, 1993; Alesio, *et al.*, 1997). Glibenklamid dimetabolisme secara sempurna dengan cara hidrosilasi gugus sikloheksil dengan metabolit utamanya turunan 4-trans-hidroksi dan turunan 3-cis-hidroksi. Enzim yang terlibat dalam metabolisme ini adalah sitokrom P 450 (CYP3A4) sebelum

diekskresikan keluar tubuh (Narytomi, *et al.*, 2004). Adanya inhibitor ini akan berpengaruh terhadap metabolisme glibenklamida di hati. Akibatnya kadar glibenklamida meningkat di dalam darah, lebih lanjut akan meningkatkan efek farmakologinya (Hussar, 1990).



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat di simpulkan bahwa praperlakuan Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB sekali sehari selama 0, 1, 2 dan 3 hari ternyata dapat meningkatkan aktivitas hipoglikemia dari glibenklamid dan peningkatan daya hipoglikemia secara signifikan ($p < 0,05$) hanya ditunjukkan pada pemberian Neurovit E 9 mg/KgBB hari ke - 1 sebesar 20,7067 % dibandingkan terhadap kontrol positif (pemberian glibenklamid dosis 0,45 mg/KgBB). Pemberian Neurovit E 9 mg/Kg BB sehari sekali selama 0, 1, 2, dan 3 hari tidak menunjukkan penurunan nilai AUC secara bermakna ($p < 0,05$), artinya lamanya hari tidak mempengaruhi penurunan kadar glukosa darah hewan uji.

B. Saran

Dari hasil penelitian yang diperoleh maka saran yang dapat kami berikan adalah :

1. Perlu dilakukan penelitian efek pemberian Neurovit E terhadap aktifitas Hipoglikemik Glibenklamid dengan metode lain, seperti dengan tes reduksi, polarimetri dan reaksi enzimatik heksokinase atau glukosa 6-phosphat hidrogenase.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai senyawa lain dalam Neurovit E yang dapat berperan dalam aktifitas hipoglikemik glibenklamid selain vitamin E seperti vitamin B₁, B₆, dan B₁₂.
3. Perlu dilakukan pengujian aktifitas Hipoglikemik vitamin E selain menggunakan Neurovit E.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1995, *Farmakope Indonesia*, Ed., IV, 39, 798, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Anonim, 2004, www.yahoo.com/bentham.org/sample-issue/cmcg-1/kecskemeti-ms/htm, Diakses 14 September 2004.
- Bednova V.N., Rotanov S.V., Navolotskaia T.I., Milonova T.I., Orlina E.A., 1989, The effect of nicotinamide and nicotinic and ascorbic acids on the penicillin concentration in the blood serum and tissues of rabbits (Article in Russian), *Vestn Dermatol Venerol*, (12): 20-3.
- Ferner R.E., Chaplin S, 1987, The Relationship between the Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Effect of Oral Hypoglycaemic Drugs, *Clin. Pharmacokin*: 12: 379-401.
- Ganiswara S.G., et al., 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi IV., Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, 467-480, 714-722.
- Gibson G.G., Skett P., 1986, *Pengantar Metabolisme Obat*, diterjemahkan oleh Isisyah B., 211-231, Penerbit UI, Jakarta.
- Gonzales JP, Valdivieso A, Calvo R, Rodrigues-Sasiain JM, Jimenez R, Aguirre C, du Souich P., 1995, Influence of vitamin C on the absorption and first pass metabolism of propranolol, *Eur J Clin Pharmacol*, 48(3-4): 295-7.
- Harvey S.C., Withrow C.D., 1990, Basic Pharmacokinetics, In Gennaro AR (ed), 16th ed, *Remington Pharmaceutical Science*, Mack Publishing Company, Pennsylvania, 725-745.
- Hussar D.R., 1990, Drug Interaction, In Gennaro AR (ed), 16th ed, *Remington Pharmaceutical Science*, Mack Publishing Company, Pennsylvania, 820-1885.
- Khanduja K.L., Koul I.B., Gupta M.P., 1986, Effect of large doses of ascorbic acid on the hepatic and extra-hepatic drug-metabolizing enzymes in guinea pig, *Biochem Int*, Oct; 13(4): 659-70.
- Mutschler.1991. *Dinamika Obat*. Diterjemahkan oleh Mathilda B. Widiyanto dan Anna Setiadi Ranti, Edisi V, Penerbit Institut Teknologi Bandung. Bandung, 194-195.
- Matin S.B., Rowland M., 1973, Determination of Tolbutamide and Chlorpropamide in Biological Fluids, *J. Pharm Pharmacol* ; 25 : 186- 8.

- National Medical Research Council, 1999, *Clinical Practice Guidelines Diabetes Mellitus*, Ministry of Health, Singapore.
- Nugroho A.E., 2001, Efek Brokoli Terhadap Aktivitas Hipoglikemik Tolbutamid Pada Tikus Diabetes Melitus Tipe II, *Tesis*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta.
- Proks P., Reimann F., Green N., Gribble F., Ashcroft F., 2002, Sulfonyluera Stimulation of Insulin Secretion, *Diabetes*; 51 Suppl 3: S368-76.
- Ritschel W.W., 1992, *Handbook of Basic Pharmacokinetics*, 4th ed., Drug Intelligence Publications Inc, Hamilton-Illionis, 156-185.
- Roolins D.E., 1990, Clinical Pharmacokinetics, In Gennaro AR (ed), *Remington Pharmaceutical Sciences*, 16th ed., Mack Publishing Company, Pennsylvania, 1820-1858.
- Soegianto, wibisono, 2004, Olahraga Dan Diabetes Melitus, *Majalah Kesehatan Dexa Media*, No. 2, Vol. 17, April- Juni 2004.
- Shargel L., dan Yu A.B.C., 1988, *Biofarmasetika dan Farmakokinetika Terapan*, Diterjemahkan oleh Fasich, edisi 2, Airlangga University Press, Surabaya, 232-233.
- Shank M.L., DelPrato S., DeFronzo R.A., 1995, Bedtime Insulin/Daytime Glipizide: Effective Therapy for Sulphonyluera Failures In NIDDM, *Diabetes*; 44: 165-72.
- Tjay T.H., Rahardja K., 2002, *Obat-obat Penting : Khasiat, Penggunaannya dan Efek Sampingnya*, Ed. V, Penerbit PT Elex Media Komputindo Gramedia, Jakarta, 693-702, 791-808.
- Tjokroprawiro, A., 2003, *Diabetes Melitus: Klasifikasi, Diagnosis, dan Terapi*, Cetakan , Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, 30-34.
- Tuomehlito J., Linstrom J., Ericson J., 2001, Prevention of Type II Diabetes Mellitus by Change in Lifestyle in Among Subjects with Impaired Glucose Tolerance, *New England Journal of Medicine*, 344: 1343-50.
- Vaddi H.K., Wang L.Z., Ho P.C., Chan S.Y., Chan Y.W., 2001, Effect of Cetrime and Ascorbic Acid on In Vitro Human Skin Permeation of Haloperidol, *Chem Pharm Bull.* 49: 1395-400.
- Vaddi H.K., Wang L.Z., Ho P.C., Chan S.Y., Chan Y.W., 2001, Effect of Some Enhancers on The Permeation of Haloperidol Through Rat Skin In Vitro, *Int. J. Pharm*, 212: 165-72.



LAMPIRAN

**PENGEMBANGAN HEWAN PERCOBAAN MANDIRI (PHPM)
KENTINGAN RT.04 RW.09 SINDUMARTANI NGEMPLAK
SLEMAN JOGJAKARTA
Telp.: 081 578 043 110**

SURAT KETERANGAN

Menerangkan bahwa :

Nama : Dwi Tuliantino P.
No.Mhs : 01 613 198
Penelitian : farmakologi
Alamat : Dekat Km 14,5 Tololodi No 69 Sleman

Menerangkan bahwa hewan uji dibawah ini :

Tikus Galur : SD
Umur : 2-3 bulan
Keterangan : Sehat
Jenis kelamin : Jantan
Jumlah : 24 ekor
Data : Tugas Akhir Sekripsi
Asal usul hewan : Unit Pengembangan Hewan Percobaan
(UPHP) UGM Jogjakarta

Demikian,semoga surat keterangan ini dapat digunakan sebaik-baiknya,atas perhatian dan kerjasamanya diucapkan terima kasih.

Jogjakarta, 25 Mei, 2006

Mengetahui PHPM



(Sumarna)

Lampiran 1. Validasi metode

Tabel 1. Penetapan panjang gelombang serapan maksimum

| Panjang Gelombang | Absorbansi |
|-------------------|--------------|
| 450 | 0,479 |
| 453 | 0,508 |
| 456 | 0,540 |
| 459 | 0,569 |
| 462 | 0,599 |
| 465 | 0,633 |
| 468 | 0,663 |
| 471 | 0,692 |
| 474 | 0,718 |
| 477 | 0,739 |
| 480 | 0,764 |
| 483 | 0,784 |
| 486 | 0,799 |
| 489 | 0,817 |
| 492 | 0,831 |
| 495 | 0,844 |
| 498 | 0,853 |
| 501 | 0,858 |
| 504 | 0,861 |
| 507 | 0,860 |
| 510 | 0,857 |
| 513 | 0,851 |
| 516 | 0,842 |
| 519 | 0,832 |
| 522 | 0,819 |
| 525 | 0,804 |
| 528 | 0,789 |
| 531 | 0,772 |
| 534 | 0,751 |
| 537 | 0,727 |
| 540 | 0,699 |
| 543 | 0,674 |
| 546 | 0,645 |
| 549 | 0,620 |

Lampiran 1 (lanjutan)

Tabel 2. Penetapan waktu serapan optimum (*Operating Time*)

| Waktu inkubasi (Menit) | Replikasi I | Replikasi II | Replikasi III | Rata-rata |
|---------------------------|-------------|--------------|---------------|-----------|
| | Serapan | Serapan | Serapan | |
| 1 | 0,757 | 0,895 | 0,901 | 0,851 |
| 2 | 0,837 | 0,899 | 0,902 | 0,879 |
| 5 | 0,996 | 0,838 | 0,900 | 0,911 |
| 10 | 0,919 | 0,832 | 0,910 | 0,887 |
| 20 | 0,912 | 0,824 | 0,898 | 0,878 |
| 30 | 0,828 | 0,817 | 0,885 | 0,843 |
| 40 | 1,043 | 0,814 | 0,881 | 0,913 |
| 60 | 0,966 | 0,806 | 0,877 | 0,883 |

Tabel 3. Nilai perolehan kembali (*recovery*)

| Kadar sebenarnya | Absorbansi sampel | Kadar Terukur (mg/dl) | Perolehan Kembali (%) | Kesalahan acak (%) |
|----------------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| 100 mg/dl | 1,789 | 86,69 | 86,69 | 7,20 |
| | 1,736 | 78,40 | 78,40 | |
| | 1,718 | 75,59 | 75,59 | |
| Mean \pm SE : 80,23 \pm 3,34 | | | | |

Perhitungan :

$$\text{Absorbansi serum} + \text{Kit} = 1,235$$

$$\text{Absorbansi glukosa standar 100 mg/dl} + \text{Kit} = 0,639$$

$$\text{Kadar terukur} = \frac{A \text{ sampel} - A (\text{serum} + \text{kit})}{A (\text{Glukosa standar} + \text{kit})} \times 100 \text{ mg/dl}$$

Keterangan A sampel = Absorbansi (serum + glukosa standar + Kit)

$$\text{Perolehan kembali} = \frac{\text{kadar terukur}}{\text{kadar sebenarnya}} \times 100 \%$$

$$\text{Kesalahan acak} = \frac{\text{SD}}{\text{Perolehan kembali rata - rata}} \times 100 \%$$

Lampiran 1 (lanjutan)

Tabel 4. persentase terdegradasi (%)

| Waktu (menit) | Absorbansi | | Kadar terukur (mg/dl) | | Kadar terukur rata-rata (mg/dl) | Persen terdegradasi (%) |
|---------------|-------------|--------------|-----------------------|--------------|---------------------------------|-------------------------|
| | Replikasi I | Replikasi II | Replikasi I | Replikasi II | | |
| 0 | 1,049 | 0,992 | 99,22 | 90,30 | 94,75 | 0 % |
| 5 | 1,048 | 0,985 | 99,06 | 89,20 | 92,02 | 2,88 % |
| 10 | 1,025 | 0,973 | 95,46 | 87,32 | 91,39 | 3,54 % |
| 15 | 1,005 | 0,956 | 92,33 | 84,66 | 88,49 | 6,60 % |
| 30 | 0,974 | 0,931 | 87,48 | 80,75 | 84,11 | 11,23 % |
| 60 | 0,961 | 0,895 | 85,45 | 75,12 | 80,28 | 15,27 % |
| 90 | 0,938 | 0,854 | 81,85 | 68,70 | 75,27 | 20,56 % |
| 120 | 0,929 | 0,851 | 80,44 | 68,23 | 74,33 | 21,55 % |
| 180 | 0,898 | 0,833 | 75,59 | 65,41 | 70,50 | 25,59 % |
| 240 | 0,862 | 0,830 | 69,95 | 64,95 | 67,45 | 28,81 % |

Perhitungan :

Absorbansi serum + Kit = 0,415

Absorbansi glukosa standar 100 mg/dl + Kit = 0,639

$$\text{Kadar terukur} = \frac{A \text{ sampel} - A (\text{serum} + \text{kit})}{A (\text{Glukosa standar} + \text{kit})} \times 100 \text{ mg/dl}$$

Keterangan: A sampel = Absorbansi (serum + glukosa standar + Kit)

$$\% \text{ terdegradasi} = \frac{\text{kadar awal (menit ke - 0)} - \text{Kadar selanjutnya (menit ke - n)}}{\text{Kadar awal (menit ke - 0)}} \times 100\%$$

Lampiran 2. Data Kadar Glukosa Darah pada Semua Kelompok Perlakuan

Tabel 1. Kelompok I : Kontrol Negatif (Pemberian Na CMC 0,5%)

| Waktu (menit) | No. Tikus | | | | | | X ± SE |
|------------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| 0 | 158,37 | 179,97 | 162,13 | 139,91 | 104,38 | 129,11 | 145,64 ± 10,99 |
| 15 | 211,11 | 252,43 | 191,55 | 117,68 | 195,62 | 152,58 | 186,83 ± 19,10 |
| 30 | 251,96 | 191,55 | 176,68 | 183,73 | 210,64 | 176,06 | 198,44 ± 11,90 |
| 60 | 187,48 | 187,48 | 169,17 | 129,73 | 203,60 | 181,85 | 176,55 ± 10,40 |
| 90 | 159,00 | 156,81 | 135,68 | 189,05 | 205,95 | 132,39 | 163,15 ± 11,92 |
| 120 | 150,86 | 232,39 | 118,15 | 166,04 | 185,45 | 133,96 | 164,48 ± 16,65 |
| 180 | 86,70 | 185,45 | 151,02 | 192,18 | 180,75 | 134,59 | 155,11 ± 16,40 |
| 240 | 83,57 | 171,67 | 133,65 | 176,06 | 228,64 | 132,24 | 154,30 ± 20,18 |

Tabel 2. Kelompok II : Kontrol Positif (suspensi glibenklamid 0,45 mg/KgBB)

| Waktu (menit) | No. Tikus | | | | | | X ± SE |
|------------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| 0 | 136,47 | 163,23 | 118,00 | 181,23 | 129,58 | 171,37 | 149,98 ± 10,38 |
| 15 | 187,33 | 230,52 | 243,67 | 211,12 | 223,01 | 208,46 | 217,35 ± 7,99 |
| 30 | 196,56 | 180,91 | 215,19 | 163,23 | 208,61 | 187,49 | 192,00 ± 7,76 |
| 60 | 158,07 | 91,55 | 159,79 | 170,59 | 185,92 | 154,47 | 153,40 ± 13,22 |
| 90 | 100,63 | 133,03 | 129,11 | 150,08 | 151,96 | 154,62 | 136,57 ± 8,38 |
| 120 | 81,07 | 105,48 | 171,99 | 143,35 | 123,79 | 135,22 | 126,82 ± 12,84 |
| 180 | 96,87 | 79,35 | 117,53 | 98,44 | 89,36 | 97,81 | 96,56 ± 5,14 |
| 240 | 81,85 | 72,93 | 97,34 | 83,41 | 85,45 | 90,77 | 85,29 ± 3,38 |

Tabel 3. Kelompok III : Neurovit E 9 mg/Kg BB sehari sekali selama 0 hari dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB

| Waktu (menit) | No. Tikus | | | | | | X ± SE |
|------------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| 0 | 144,76 | 130,67 | 134,59 | 172,14 | 180,75 | 239,12 | 167,01 ± 16,62 |
| 15 | 145,38 | 169,80 | 141,63 | 174,65 | 174,02 | 185,60 | 165,18 ± 7,19 |
| 30 | 201,88 | 170,42 | 170,11 | 175,27 | 146,64 | 84,82 | 158,19 ± 16,34 |
| 60 | 167,29 | 148,83 | 155,24 | 165,88 | 136,93 | 179,34 | 158,92 ± 6,15 |
| 90 | 207,98 | 143,35 | 133,49 | 178,25 | 274,49 | 289,36 | 204,49 ± 26,82 |
| 120 | 159,94 | 89,51 | 99,53 | 154,77 | 142,72 | 145,70 | 132,03 ± 12,19 |
| 180 | 160,25 | 143,82 | 125,20 | 137,72 | 135,21 | 161,35 | 143,92 ± 5,87 |
| 240 | 141,78 | 141,78 | 118,00 | 145,85 | 125,82 | 132,08 | 134,22 ± 4,43 |

Lampiran 2 (lanjutan)

Tabel 4. Kelompok IV : Pemberian Neurovit E 9 mg/Kg BB sehari sekali selama 1 hari dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB

| Waktu (menit) | No. Tikus | | | | | | X ± SE |
|---------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| 0 | 121,91 | 124,88 | 103,29 | 102,66 | 136,46 | 123,63 | 118,81 ± 5,43 |
| 15 | 161,97 | 169,01 | 148,20 | 175,12 | 122,69 | 191,08 | 161,35 ± 9,66 |
| 30 | 156,34 | 191,86 | 148,51 | 149,61 | 175,43 | 213,62 | 172,56 ± 10,70 |
| 60 | 72,46 | 129,11 | 117,06 | 123,16 | 131,14 | 101,10 | 112,34 ± 9,11 |
| 90 | 73,40 | 136,93 | 38,34 | 127,39 | 130,83 | 111,89 | 103,13 ± 15,98 |
| 120 | 20,50 | 96,24 | 34,74 | 127,07 | 129,42 | 83,10 | 81,85 ± 18,71 |
| 180 | 29,26 | 47,26 | 33,49 | 39,44 | 43,97 | 86,07 | 46,58 ± 8,34 |
| 240 | 70,58 | 101,10 | 122,85 | 102,19 | 116,59 | 100,16 | 102,24 ± 7,39 |

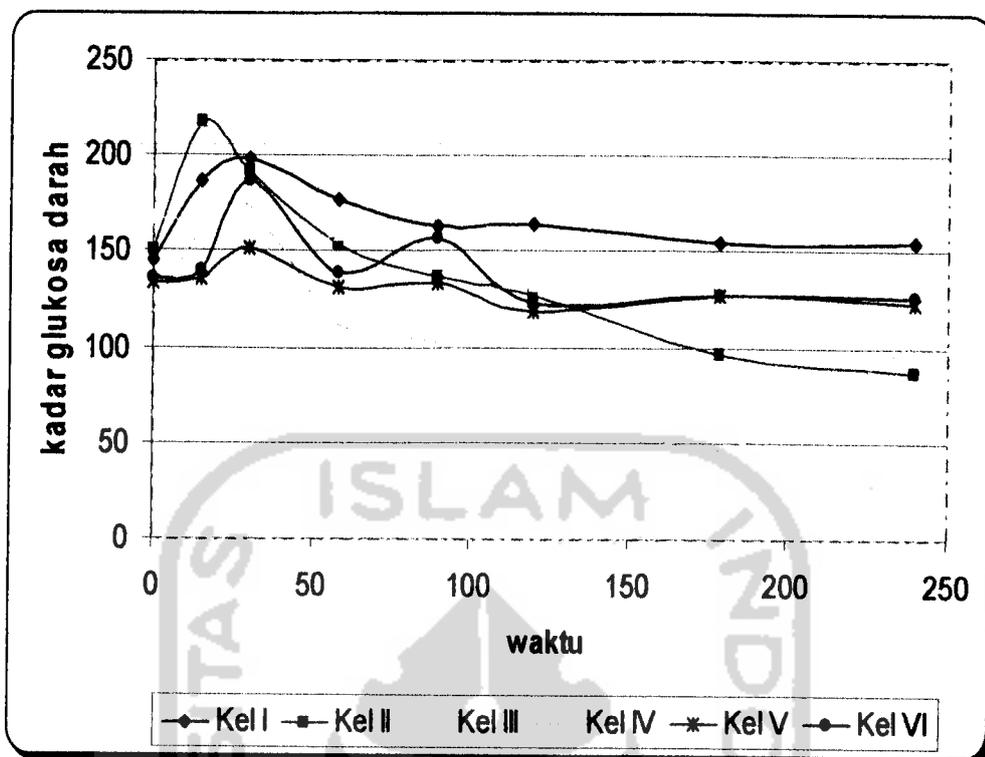
Tabel 5. Kelompok V : Pemberian Neurovit E 9 mg/Kg BB sehari sekali selama 2 hari dan glibenklamid 5 mg/Kg BB

| Waktu (menit) | No. Tikus | | | | | | X ± SE |
|---------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| 0 | 115,34 | 146,17 | 116,90 | 152,90 | 129,11 | 138,03 | 133,07 ± 6,27 |
| 15 | 141,63 | 169,01 | 54,77 | 165,57 | 52,11 | 230,67 | 135,63 ± 28,63 |
| 30 | 69,17 | 183,10 | 94,52 | 171,36 | 182,63 | 210,02 | 151,80 ± 22,96 |
| 60 | 157,43 | 171,21 | 98,59 | 105,16 | 118,31 | 138,81 | 131,59 ± 11,91 |
| 90 | 138,50 | 135,84 | 172,30 | 107,51 | 114,55 | 133,18 | 133,65 ± 9,26 |
| 120 | 77,46 | 142,41 | 134,74 | 134,27 | 88,42 | 134,43 | 118,62 ± 11,44 |
| 180 | 101,25 | 254,46 | 95,46 | 93,11 | 100,78 | 120,50 | 127,60 ± 25,68 |
| 240 | 111,89 | 120,34 | 143,04 | 125,67 | 94,99 | 138,50 | 122,40 ± 7,21 |

Tabel 5. Kelompok VI : Pemberian Neurovit E 9 mg/Kg BB sehari sekali selama 3 hari dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB

| Waktu (menit) | No. Tikus | | | | | | X ± SE |
|---------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| 0 | 120,81 | 150,23 | 127,39 | 152,74 | 135,68 | 128,64 | 135,92 ± 5,30 |
| 15 | 74,33 | 131,30 | 125,98 | 186,38 | 182,32 | 135,68 | 139,33 ± 16,87 |
| 30 | 176,06 | 185,60 | 235,37 | 179,34 | 143,97 | 200,16 | 186,75 ± 12,31 |
| 60 | 141,94 | 146,95 | 153,99 | 139,28 | 119,41 | 130,05 | 138,60 ± 5,03 |
| 90 | 144,76 | 132,71 | 120,66 | 153,83 | 211,58 | 178,40 | 156,99 ± 13,55 |
| 120 | 119,25 | 122,54 | 140,22 | 137,40 | 96,40 | 120,97 | 122,80 ± 6,40 |
| 180 | 125,04 | 121,75 | 141,31 | 123,32 | 106,26 | 142,57 | 126,71 ± 5,54 |
| 240 | 160,88 | 78,87 | 153,68 | 113,46 | 132,86 | 117,53 | 126,21 ± 12,22 |

Lampiran 3. Kurva kadar glukosa darah (mg/dl) terhadap waktu (menit)



Keterangan :

| | |
|--------------|---|
| Kelompok I | : Kontrol Negatif, diberi perlakuan suspensi CMC Na 0,5 %. |
| Kelompok II | : Kontrol Positif, diberi perlakuan suspensi glibenklamid dosis 0,45 mg/KgBB. |
| Kelompok III | : Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB selama 0 hari |
| Kelompok IV | : Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB selama 1 hari. |
| Kelompok V | : Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB selama 2 hari |
| Kelompok VI | : Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB selama 3 hari |

Lampiran 4. Nilai AUC₀₋₂₄₀ (menit.mg/dl) setelah perlakuan

| No. Tikus | Harga AUC ₀₋₂₄₀ (Menit. mg/dl) | | | | | |
|--------------|---|----------|----------|----------|----------|----------|
| | I | II | III | IV | V | VI |
| 1 | 34915,49 | 27931,92 | 40132,63 | 16032,86 | 26341,55 | 32278,17 |
| 2 | 46509,39 | 27184,27 | 33037,56 | 25969,48 | 42248,83 | 30847,42 |
| 3 | 35597,42 | 35759,39 | 31153,76 | 18259,39 | 28034,04 | 35779,34 |
| 4 | 40795,78 | 32677,23 | 37781,69 | 25429,58 | 29265,26 | 33755,87 |
| 5 | 46792,25 | 32642,02 | 37917,84 | 26630,28 | 25720,66 | 31620,89 |
| 6 | 34715,96 | 32578,64 | 40746,48 | 26897,89 | 34814,55 | 34280,52 |

Keterangan :

- I. Kontrol Negatif, diberi perlakuan suspensi Na CMC 0,5 %
- II. Kontrol Positif, diberi perlakuan suspensi glibenklamid dosis 0,45 mg/KgBB
- III. Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB sehari sekali selama 0 hari dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB.
- IV. Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB sehari sekali selama 1 hari dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB.
- V. Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB sehari sekali mg selama 2 hari dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB.
- VI. Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/Kg BB sehari sekali mg selama 3 hari dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB.

Lampiran 5. Analisis statistika nilai AUC₀₋₂₄₀ (menit.mg/dl)

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | Nilai AUC |
|----------------------------------|----------------|-----------|
| N | | 36 |
| Normal Parameters ^{a,b} | Mean | 32585.45 |
| | Std. Deviation | 6763.4067 |
| Most Extreme Differences | Absolute | .096 |
| | Positive | .096 |
| | Negative | -.089 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | .577 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | .893 |

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Lampiran 5 (lanjutan)

Oneway**Descriptives**

Nilai AUC

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 5% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-----------------|----|---------|----------------|------------|---------------------------------|-------------|----------|----------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Kontrol negatif | 6 | 9887.72 | 5695.9717 | 25.3707 | 3910.1593 | 5865.2707 | 4715.96 | 6792.25 |
| Kontrol positif | 6 | 1462.24 | 3266.3164 | 33.4681 | 8034.4561 | 4890.0339 | 7184.27 | 5759.39 |
| vit E 0 hari | 6 | 6794.99 | 3871.1817 | 80.4033 | 2732.4373 | 10857.5494 | 1153.76 | 10746.48 |
| vit E 1 hari | 6 | 3203.25 | 4771.9958 | 48.1591 | 8195.3442 | 8211.1491 | 6032.86 | 6897.89 |
| vit E 2 hari | 6 | 1070.82 | 6362.9507 | 97.6637 | 4393.3078 | 7748.3222 | 5720.66 | 2248.83 |
| vit E 3 hari | 6 | 3093.70 | 1840.6361 | 51.4365 | 1162.0726 | 5025.3307 | 10847.42 | 5779.34 |
| Total | 36 | 2585.45 | 6763.4069 | 27.2345 | 10297.0451 | 4873.8604 | 6032.86 | 6792.25 |

Test of Homogeneity of Variances

Nilai AUC

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 2.607 | 5 | 30 | .045 |

ANOVA

Nilai AUC

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | 9.77E+08 | 5 | 195459722.2 | 9.401 | .000 |
| Within Groups | 6.24E+08 | 30 | 20790998.87 | | |
| Total | 1.60E+09 | 35 | | | |

Lampiran 5 (lanjutan)

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Nilai AUC

Tukey HSD

| (I) Kelompok Perlakuan | (J) Kelompok Perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kontrol negatif | Kontrol positif | 8425.4703* | 2632.5526 | .035 | 418.2395 | 16432.7011 |
| | vit E 0 hari | 3092.7220 | 2632.5526 | .845 | -4914.5088 | 11099.9528 |
| | vit E 1 hari | 16684.4687* | 2632.5526 | .000 | 8677.2379 | 24691.6995 |
| | vit E 2 hari | 8816.9003* | 2632.5526 | .024 | 809.6695 | 16824.1311 |
| | vit E 3 hari | 6794.0137 | 2632.5526 | .133 | -1213.2171 | 14801.2445 |
| Kontrol positif | Kontrol negatif | -8425.4703* | 2632.5526 | .035 | -16432.7011 | -418.2395 |
| | vit E 0 hari | -5332.7483 | 2632.5526 | .352 | -13339.9791 | 2674.4825 |
| | vit E 1 hari | 8258.9983* | 2632.5526 | .040 | 251.7675 | 16266.2291 |
| | vit E 2 hari | 391.4300 | 2632.5526 | 1.000 | -7615.8008 | 8398.6608 |
| | vit E 3 hari | -1631.4567 | 2632.5526 | .989 | -9638.6875 | 6375.7741 |
| vit E 0 hari | Kontrol negatif | -3092.7220 | 2632.5526 | .845 | -11099.9528 | 4914.5088 |
| | Kontrol positif | 5332.7483 | 2632.5526 | .352 | -2674.4825 | 13339.9791 |
| | vit E 1 hari | 13591.7487* | 2632.5526 | .000 | 5584.5159 | 21598.9775 |
| | vit E 2 hari | 5724.1783 | 2632.5526 | .279 | -2283.0525 | 13731.4091 |
| | vit E 3 hari | 3701.2917 | 2632.5526 | .723 | -4305.9391 | 11708.5225 |
| vit E 1 hari | Kontrol negatif | -16684.469* | 2632.5526 | .000 | -24691.6995 | -8677.2379 |
| | Kontrol positif | -8258.9983* | 2632.5526 | .040 | -16266.2291 | -251.7675 |
| | vit E 0 hari | -13591.747* | 2632.5526 | .000 | -21598.9775 | -5584.5159 |
| | vit E 2 hari | -7867.5683 | 2632.5526 | .056 | -15874.7991 | 139.6625 |
| | vit E 3 hari | -9890.4550* | 2632.5526 | .009 | -17897.6858 | -1883.2242 |
| vit E 2 hari | Kontrol negatif | -8816.9003* | 2632.5526 | .024 | -16824.1311 | -809.6695 |
| | Kontrol positif | -391.4300 | 2632.5526 | 1.000 | -8398.6608 | 7615.8008 |
| | vit E 0 hari | -5724.1783 | 2632.5526 | .279 | -13731.4091 | 2283.0525 |
| | vit E 1 hari | 7867.5683 | 2632.5526 | .056 | -139.6625 | 15874.7991 |
| | vit E 3 hari | -2022.8867 | 2632.5526 | .971 | -10030.1175 | 5984.3441 |
| vit E 3 hari | Kontrol negatif | -6794.0137 | 2632.5526 | .133 | -14801.2445 | 1213.2171 |
| | Kontrol positif | 1631.4567 | 2632.5526 | .989 | -6375.7741 | 9638.6875 |
| | vit E 0 hari | -3701.2917 | 2632.5526 | .723 | -11708.5225 | 4305.9391 |
| | vit E 1 hari | 9890.4550* | 2632.5526 | .009 | 1883.2242 | 17897.6858 |
| | vit E 2 hari | 2022.8867 | 2632.5526 | .971 | -5984.3441 | 10030.1175 |

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Nilai AUC

Tukey HSD^a

| Kelompok Perlakuan | N | Subset for alpha = .05 | | |
|--------------------|---|------------------------|----------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| vit E 1 hari | 6 | 23203.25 | | |
| vit E 2 hari | 6 | 31070.82 | 31070.82 | |
| Kontrol positif | 6 | | 31462.24 | |
| vit E 3 hari | 6 | | 33093.70 | 33093.70 |
| vit E 0 hari | 6 | | 36794.99 | 36794.99 |
| Kontrol negatif | 6 | | | 39887.72 |
| Sig. | | .056 | .279 | .133 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Lampiran 6. Daya hipoglikemia setelah perlakuan Neurovit E 9 mg/KgBB dibandingkan kontrol negatif

| Kelompok Perlakuan | | | | |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| II | III | IV | V | VI |
| 29,97 | -0,61 | 59,81 | 33,96 | 19,08 |
| 31,85 | 17,17 | 34,89 | -5,92 | 22,66 |
| 10,35 | 21,90 | 54,22 | 29,72 | 10,30 |
| 18,07 | 5,28 | 36,25 | 26,63 | 15,37 |
| 18,16 | 4,94 | 33,24 | 35,52 | 20,73 |
| 18,32 | -2,15 | 32,57 | 12,72 | 14,06 |

Keterangan :

- II. Kontrol Positif, diberi perlakuan suspensi glibenklamid dosis 0,45 mg/KgBB
 III. Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/KgBB sehari sekali selama 0 hari dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB.
 IV. Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/KgBB sehari sekali selama 1 hari dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB.
 V. Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/KgBB sehari sekali mg selama 2 hari dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB.
 VI. Perlakuan Neurovit E dosis 9 mg/KgBB sehari sekali mg selama 3 hari dan glibenklamid 0,45 mg/KgBB.

Lampiran 7. Analisis statistik daya hipoglikemia

NPar Tests

Descriptive Statistics

| | N | Mean | Std. Deviation | Minimum | Maximum |
|-----------------------|----|---------|----------------|---------|---------|
| Daya Hipoglikemik (%) | 30 | 21.9693 | 15.1204 | -5.92 | 59.81 |

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | Daya Hipoglikemik (%) |
|----------------------------------|----------------|-----------------------|
| N | | 30 |
| Normal Parameters ^{a,b} | Mean | 21.9693 |
| | Std. Deviation | 15.1204 |
| Most Extreme Differences | Absolute | .106 |
| | Positive | .106 |
| | Negative | -.063 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | .579 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | .890 |

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Lampiran 7 (lanjutan)

Oneway**Descriptives**

Daya Hipoglikemik (%)

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 5% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|--------|----|---------|----------------|------------|---------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| | | | | | Kontrol positif | 6 | | |
| 0 HARI | 6 | 7.7550 | 9.7042 | 3.9617 | -2.4289 | 17.9389 | -2.15 | 21.90 |
| 1 HARI | 6 | 41.8300 | 11.9635 | 4.8841 | 29.2751 | 54.3849 | 32.57 | 59.81 |
| 2 HARI | 6 | 22.1050 | 15.9527 | 6.5127 | 5.3636 | 38.8464 | -5.92 | 35.52 |
| 3 HARI | 6 | 17.0333 | 4.6143 | 1.8838 | 12.1909 | 21.8757 | 10.30 | 22.66 |
| Total | 30 | 21.9693 | 15.1204 | 2.7606 | 16.3233 | 27.6154 | -5.92 | 59.81 |

Test of Homogeneity of Variances

Daya Hipoglikemik (%)

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 2.591 | 4 | 25 | .061 |

ANOVA

Daya Hipoglikemik (%)

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | 3729.549 | 4 | 932.387 | 8.036 | .000 |
| Within Groups | 2900.621 | 25 | 116.025 | | |
| Total | 6630.170 | 29 | | | |

Lampiran 7 (lanjutan)

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Daya Hipoglikemik (%)

Tukey HSD

| (I) Kelompok perlakuan | (J) Kelompok perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kontrol positif | 0 HARI | 13.3683 | 6.2189 | .231 | -4.8961 | 31.6327 |
| | 1 HARI | -20.7067* | 6.2189 | .021 | -38.9711 | -2.4423 |
| | 2 HARI | -.9817 | 6.2189 | 1.000 | -19.2461 | 17.2827 |
| | 3 HARI | 4.0900 | 6.2189 | .964 | -14.1744 | 22.3544 |
| 0 HARI | Kontrol positif | -13.3683 | 6.2189 | .231 | -31.6327 | 4.8961 |
| | 1 HARI | -34.0750* | 6.2189 | .000 | -52.3394 | -15.8106 |
| | 2 HARI | -14.3500 | 6.2189 | .176 | -32.6144 | 3.9144 |
| | 3 HARI | -9.2783 | 6.2189 | .577 | -27.5427 | 8.9861 |
| 1 HARI | Kontrol positif | 20.7067* | 6.2189 | .021 | 2.4423 | 38.9711 |
| | 0 HARI | 34.0750* | 6.2189 | .000 | 15.8106 | 52.3394 |
| | 2 HARI | 19.7250* | 6.2189 | .030 | 1.4606 | 37.9894 |
| | 3 HARI | 24.7967* | 6.2189 | .004 | 6.5323 | 43.0611 |
| 2 HARI | Kontrol positif | -.9817 | 6.2189 | 1.000 | -17.2827 | 19.2461 |
| | 0 HARI | 14.3500 | 6.2189 | .176 | -3.9144 | 32.6144 |
| | 1 HARI | -19.7250* | 6.2189 | .030 | -37.9894 | -1.4606 |
| | 3 HARI | 5.0717 | 6.2189 | .923 | -13.1927 | 23.3361 |
| 3 HARI | Kontrol positif | -4.0900 | 6.2189 | .964 | -22.3544 | 14.1744 |
| | 0 HARI | 9.2783 | 6.2189 | .577 | -8.9861 | 27.5427 |
| | 1 HARI | -24.7967* | 6.2189 | .004 | -43.0611 | -6.5323 |
| | 2 HARI | -5.0717 | 6.2189 | .923 | -23.3361 | 13.1927 |

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Daya Hipoglikemik (%)

Tukey HSD^a

| Kelompok perlakuan | N | Subset for alpha = .05 | |
|--------------------|---|------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| 0 HARI | 6 | 7.7550 | |
| 3 HARI | 6 | 17.0333 | |
| Kontrol positif | 6 | 21.1233 | |
| 2 HARI | 6 | 22.1050 | |
| 1 HARI | 6 | | 41.8300 |
| Sig. | | .176 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.