



Original Article

Pengaruh Ekstrak Daun Wungu Terhadap Luas Islet Pankreas Tikus Wistar Diabetes Melitus

Tifanni Excelinda¹, Hermawan Istiadi², Dwi Retnoningrum³, Meita Hendrianingtyas³

¹Departemen Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

²Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

³Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

Abstrak

p-ISSN: 2301-4369 e-ISSN: 2685-7898
<https://doi.org/10.36408/mhjcm.v8i1.492>

Diajukan: 29 September 2020

Diterima: 10 November 2020

Afiliasi Penulis:

Departemen Kedokteran, Fakultas Kedokteran,
Universitas Diponegoro

Korespondensi Penulis:

Tifanni Excelinda
Jl. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang, Semarang,
Jawa Tengah 50275,
Indonesia

E-mail:

tifanni.excelinda@gmail.com

Latar belakang : Diabetes melitus merupakan kumpulan gejala gangguan metabolik dengan prevalensi penyandang yang masih terus meningkat. Faktor lingkungan, gaya hidup, maupun genetik dapat menyebabkan kerusakan sel pankreas maupun resistensi insulin yang kemudian bermanifestasi sebagai diabetes melitus. Daun wungu (*Graphtophyllum pictum (L.) Griff*) mengandung metabolit aktif seperti flavonoid yang merupakan antioksidan untuk mencegah destruksi dan meregenerasi sel pankreas penderita diabetes melitus. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan adanya perbedaan ukuran luas islet pankreas tikus Wistar diabetes melitus yang mendapatkan ekstrak daun wungu (*Graphtophyllum pictum (L.) Griff*) setelah perlakuan dengan kontrol.

Metode : Penelitian *true experimental* dengan menggunakan desain *Post-Test Only Control Group Design*. Sampel 24 ekor tikus Wistar jantan dengan kriteria tertentu dibagi secara acak menjadi 4 kelompok. Kontrol negatif (K-1) diberikan aloksan dan kelompok perlakuan 1 (K-2), perlakuan 2 (K-3), dan perlakuan 3 (K-4) masing-masing diberikan aloksan dan ekstrak daun wungu 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB. Glukosa darah diperiksa pada hari ke-4 untuk memastikan tikus sudah diabetes melitus dan dilanjutkan perlakuan selama 14 hari. Terminasi dan pengambilan organ dilakukan pada hari ke-15. Data berupa luas islet pankreas kemudian dianalisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan uji *Mann-Whitney*.

Hasil : Berdasarkan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan perbedaan luas islet pankreas yang bermakna ($p = 0,000$) antar kelompok. Pada uji *Mann-Whitney* didapatkan peningkatan luas islet pankreas yang signifikan ($p = 0,000$) pada seluruh kelompok perlakuan terhadap kontrol negatif. Rerata luas islet pankreas berbanding lurus dengan peningkatan dosis pemberian ekstrak daun wungu.

Simpulan : Terdapat perbedaan ukuran luas islet pankreas yang signifikan pada seluruh kelompok perlakuan terhadap kontrol negatif.

Kata kunci : daun wungu; diabetes; islet pankreas

***Graptophyllum pictum* (L.) Griff Leaf extract effect on pancreatic islets area in diabetic wistar rat**

Abstract

Background : Diabetes mellitus is a group of metabolic disorders with prevalence that seems to still be increasing. Environmental, lifestyle, and genetic factors can cause pancreatic cell damage or insulin resistance which then manifests as diabetes mellitus. *Graptophyllum pictum* (L.) Griff contains active metabolites such as flavonoids which are antioxidants to prevent the destruction and induce regeneration of pancreatic cells in people with diabetes mellitus. The aim of this study was to prove the difference between pancreatic islet area in diabetic Wistar rats that received *Graptophyllum pictum* (L.) Griff after treatment with control.

Methods : True experimental study with Post-Test Only Control Group Design was done using sample of 24 Wistar rats randomly divided into 4 groups. Negative control group (K1) was given alloxan intraperitoneally, treatment groups (K2, K3, K4) were given alloxan and 50 mg/kg, 100 mg/kg, and 200 mg/kg dose of *Graptophyllum pictum* (L.) Griff. Blood glucose was measured to ensure the rats already had diabetes and continued the treatment for 14 days. Termination and organ sampling was done on day-15.

Results : Data in the form of pancreatic islets areas were then analyzed using *Kruskal-Wallis* test ($p=0.000$). *Mann-Whitney* tests showed value of $p=0.000$ for all comparison between each of treatment groups with the negative control.

Conclusion : Significant increase of the pancreatic islets areas was obtained by comparing each treatment group with the control. The mean area of pancreatic islets was directly proportional to the increase of the *Graptophyllum pictum* (L.) Griff leaf extract dose of administration.

Keywords : diabetes, *Graptophyllum pictum*, pancreatic islet

PENDAHULUAN

Diabetes melitus (DM) merupakan sekumpulan gejala gangguan metabolik yang bersifat kronis dimana terjadi peningkatan kadar glukosa darah sebagai akibat dari kurangnya sekresi insulin oleh pankreas maupun ketika tubuh tidak dapat menggunakan insulin atau yang disebut resistensi insulin.¹ Berdasarkan *International Diabetes Federation* (IDF) 2017, Indonesia menjadi negara peringkat ke-6 penyandang diabetes terbanyak di dunia.² Menurut Riset Kesehatan Dasar tahun 2018, prevalensi penyandang diabetes usia ≥ 15 tahun di Indonesia dari tahun 2013 hingga tahun 2018 mengalami peningkatan dari 6,9% menjadi 8,5%.³ Preparat agen antidiabetes masih memiliki banyak efek samping yang tidak diinginkan, sehingga obat herbal menjadi sebuah alternatif yang cukup diminati karena harganya yang tidak terlalu mahal dengan efek samping yang lebih ringan.⁴ Daun wungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) menjadi salah satu pilihan alternatif yang sudah banyak digunakan masyarakat Indonesia.⁵ Penelitian yang ada membuktikan bahwa daun wungu mengandung alkaloid dan flavonoid yang berperan sebagai antioksidan alami yang dapat menurunkan kadar gula darah dan meregenerasi sel pankreas yang rusak pada penderita diabetes melitus.⁶ Daun wungu juga banyak dipakai sebagai obat antidiabetes tradisional di kalangan masyarakat Indonesia walaupun belum ada data penelitian yang cukup untuk menentukan tingkat efektivitas dan formulasinya. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek antidiabetes yang dimiliki ekstrak daun *Graptophyllum pictum* (L.) Griff terhadap gambaran perbaikan histopatologi pankreas tikus Wistar yang telah dimodifikasi mengalami diabetes melitus.

Hipotesis penelitian ini adalah terdapat pengaruh ekstrak daun *Graptophyllum pictum* (L.) Griff terhadap luas islet pancreas tikus Wistar diabetes melitus yang diberi perlakuan terhadap kelompok kontrol. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan adanya perbedaan ukuran luas islet pancreas pada tikus Wistar diabetes yang diberi ekstrak daun *Graptophyllum pictum* (L.) Griff pasca terapi dengan kontrol.

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Penelitian ini telah mendapat izin dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Izin diberikan pada tanggal 13 Mei 2019 dengan nomor No. 50/EC/H/KEPK/FK-UNDIP/V/2019.

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang sebagai tempat pemeliharaan dan intervensi hewan coba serta pembuatan preparat. Sedangkan pemeriksaan histopatologi dilakukan di Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro di bawah supervisi Ahli Patologi Anatomi. Penelitian dilakukan selama 5 bulan dimulai dari tahap penyusunan proposal pada 5 Februari 2020.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : daun wungu, akuades, etanol 70%, tikus Wistar jantan dengan berat badan 200-300 gram, aloksan, larutan saline (larutan NaCl 0,9%), kertas saring, glukosa, bahan pengecatan preparat histopatologi dengan pengecatan HE : larutan buffer formalin 10%, parafin, Hematoksin-Eosin, larutan xylol, alkohol bertingkat, akuades, eter, dan albumin. Alat yang digunakan antara lain corong kaca, bejana stainless steel, penangas air,

timbangan analitik, cawan porselen, flakon, spuit injeksi 1,0 ml, 3,0 ml, 5 ml, spuit oral ukuran 18 gauge. Alat pembuatan preparat histopatologi: mikrotom, oven, cetakan paraffin, *deck glass*, *object glass*, mikroskop cahaya, kamera, dan *Olympus cellSens Imaging Software*.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *post-test only control group design*. Besar sampel dihitung menurut panduan *Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook* dan kriteria *World Health Organization (WHO)* dimana untuk keperluan evaluasi dan penelitian obat tradisional minimal dibutuhkan 5 ekor untuk masing-masing kelompok.^{7,8} Maka jumlah sampel yang dibutuhkan adalah 20 ekor tikus. *Drop out* diantisipasi dengan menambahkan 1 ekor tikus masing-masing kelompok sehingga keseluruhan sampel tikus yang digunakan adalah 24 ekor. Kriteria inklusi dari penelitian ini yaitu tikus wistar jantan yang sehat (bergerak aktif), dengan berat badan 200–400 gram dan umur kurang lebih 2–3 bulan. Kriteria eksklusi dari penelitian ini adalah adanya kecacatan anatomis. Kriteria *drop out* dari penelitian ini adalah tikus Wistar mati sebelum tiba waktu observasi dan tikus wistar tidak menderita diabetes melitus setelah injeksi aloksan.

Sampel tikus dibiarkan adaptasi selama 7 hari dan kemudian dirandomisasi menjadi 4 kelompok : kelompok kontrol (K-1), kelompok perlakuan 1 (K-2), kelompok perlakuan 2 (K-3), dan kelompok perlakuan 3 (K-4). Seluruh kelompok diberikan injeksi aloksan secara intraperitoneal. Kelompok K-2, K-3, dan K-4 diberikan terapi ekstrak daun *Graptophyllum pictum (L.) Griff* dengan dosis masing-masing 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB. Perlakuan diberikan selama 14 hari. Terminasi dilakukan pada semua hewan coba pada hari ke-15 dengan menggunakan etil alkohol⁹ kemudian membedah dan mengambil bagian pankreas tikus Wistar jantan untuk dibuat preparat histopatologi dengan metode blok paraffin menggunakan pengecatan

HE. Islet pankreas yang diamati dan didokumentasikan dengan kamera adapter yang dihubungkan dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x. Pengukuran luas islet pankreas dilakukan menggunakan metode poligon yaitu menarik garis yang didapat dengan menghubungkan titik-titik terjauh dari sudut-sudut terluar islet yang teramati dengan *Olympus cellSens Imaging Software*. Pengamatan dilakukan oleh 2 penguji dan reliabilitasnya diuji dengan uji Kappa menggunakan program SPSS. Nilai Kappa yang didapatkan adalah 0,918 (91,8%; >90%) dengan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$) yang menunjukkan data signifikan dengan kesepakatan yang tinggi antara pengamat 1 dan pengamat 2.¹⁰ Data yang diperoleh kemudian diolah dengan program SPSS.

HASIL

Penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus Wistar jantan dengan 6 ekor tikus pada setiap kelompok perlakuan. Tikus diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari sebelum diberi perlakuan. Tikus yang digunakan memenuhi kriteria tikus wistar jantan yang sehat, dengan berat badan 200–400 gram dan umur 2–3 bulan tanpa adanya kecacatan anatomis.

Jumlah sampel final yang digunakan pada pengamatan hasil adalah 20 ekor tikus. Selama penelitian, 4 tikus memenuhi kriteria *drop out*, yaitu 3 mati sebelum waktu observasi dan 1 belum diabetes pasca injeksi aloksan, sehingga tersisa 5 ekor tikus untuk masing-masing kelompok.

Data yang diperoleh dari gambaran histopatologi pankreas tikus Wistar adalah ukuran luas islet pankreas. Gambar 1 menunjukkan perwakilan dari dokumentasi gambaran histopatologi ukuran luas islet pankreas pada kelompok kontrol (K-1). Gambar 2 mewakili kelompok perlakuan 1 (K-2), gambar 3 mewakili kelompok perlakuan 2 (K-3), dan gambar 4 mewakili kelompok perlakuan 3 (K-4).

TABEL 1
Karakteristik Subyek Penelitian

Variabel	K1 (n=5)	K2 (n=5)	K3 (n=5)	K4 (n=5)
Jenis kelamin				
Jantan				
n (%)	5 (100)	5 (100)	5 (100)	5 (100)
Usia				
3 bulan				
n (%)	5 (100)	5 (100)	5 (100)	5 (100)
Rerata berat (gr) ± SD	257 ± 11,12	230 ± 10,44	221 ± 7,23	251 ± 9,38

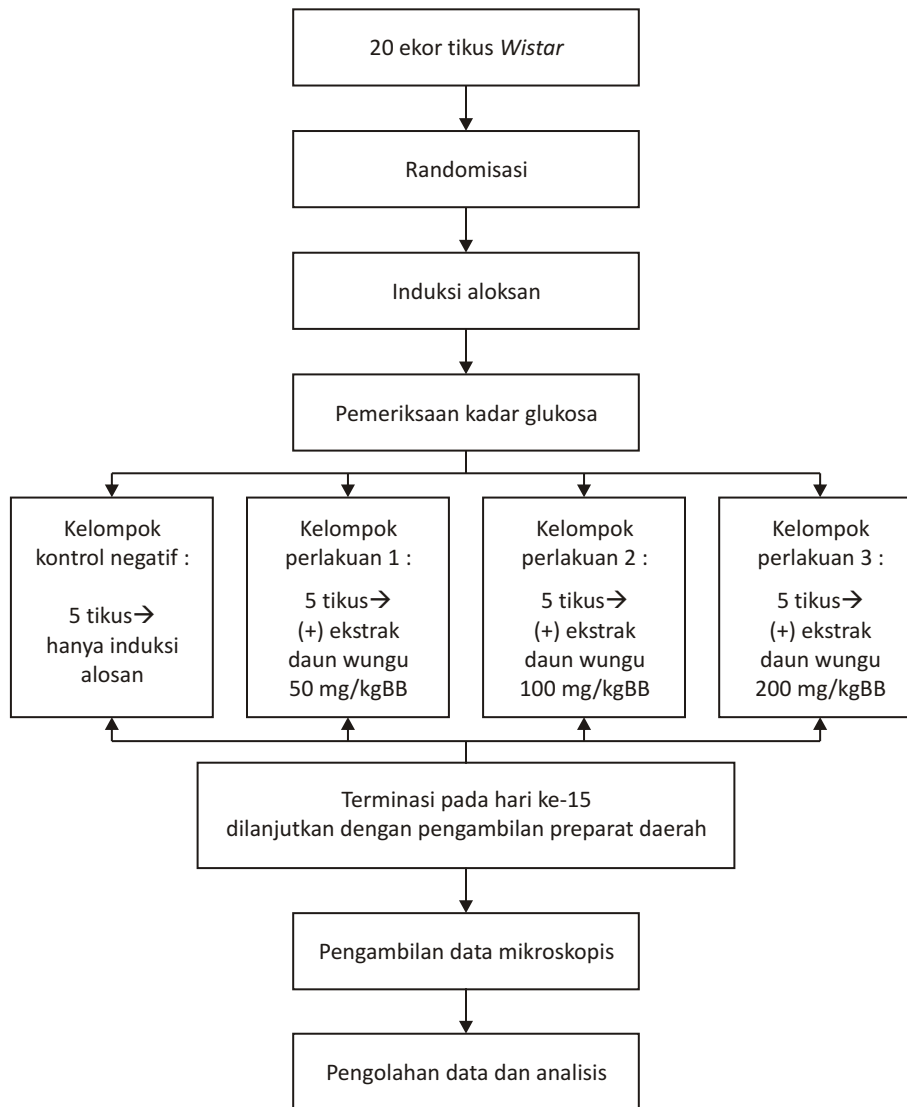


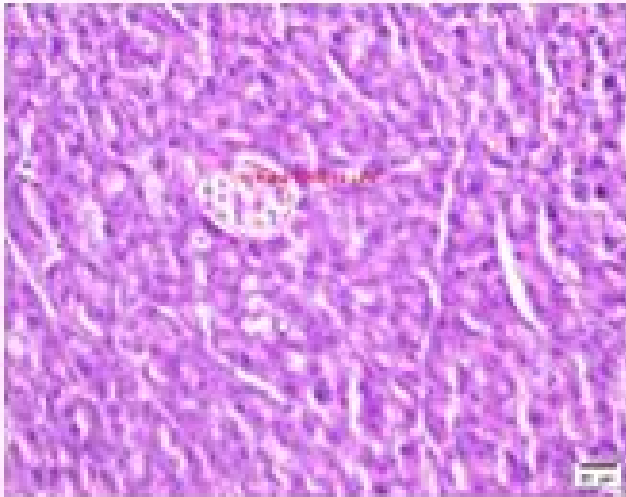
Diagram 1. Alur Penelitian

Tabel 2 menunjukkan nilai rerata dan median dari luas islet pankreas pada seluruh kelompok. Nilai tersebut menunjukkan adanya perbaikan berupa peningkatan ukuran luas islet pankreas berbanding lurus dengan pertambahan pemberian dosis ekstrak daun *Graptophyllum pictum* (L.) Griff. Uji normalitas *Shapiro-Wilk* menunjukkan nilai $p < 0,05$ untuk masing-masing kelompok. Uji *Shapiro-Wilk* diulang pada data yang telah ditransformasi dan didapatkan kelompok kontrol, perlakuan 2, dan perlakuan 3 terdistribusi normal ($p > 0,05$) namun kelompok perlakuan 1 tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) sehingga untuk uji hipotesis dilakukan analisis dengan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*. Uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan adanya perbedaan bermakna pada seluruh kelompok ($p = 0,000$). Hasil uji *Mann-Whitney* membuktikan adanya perbedaan dengan signifikansi yang jelas pada perbandingan antara

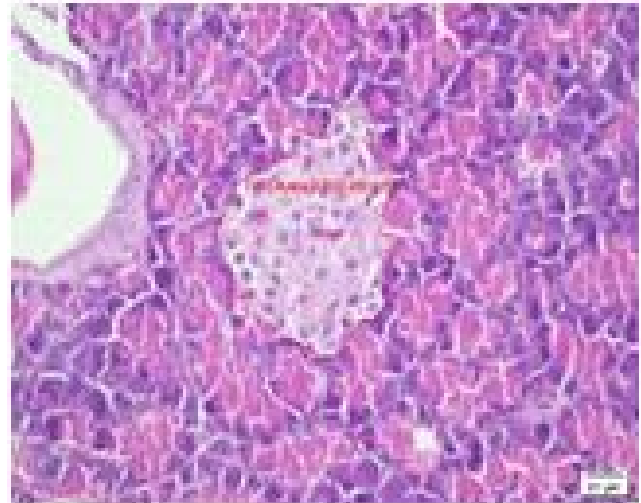
masing-masing kelompok perlakuan (K-2, K-3, dan K-4) dengan kelompok kontrol (K-1), dimana nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) untuk semua perbandingan.

PEMBAHASAN

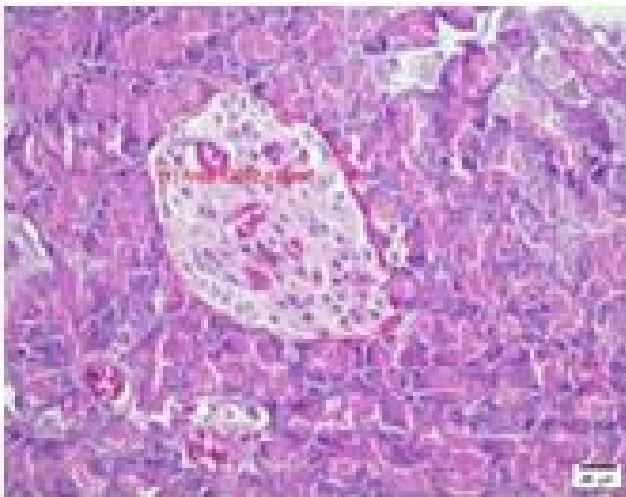
Hasil penelitian yang dilakukan selama 14 hari menunjukkan perbedaan yang bermakna antar kelompok (*Kruskal-Wallis*, $p = 0,000$). Berdasarkan hasil analisis data, hasil yang signifikan didapatkan pada perbandingan masing-masing kelompok perlakuan 1 (dosis ekstrak 50 mg/kgBB), kelompok perlakuan 2 (dosis ekstrak 100 mg/kgBB), dan kelompok perlakuan 3 (dosis ekstrak 200 mg/kgBB) dengan kelompok kontrol negatif (*Mann-Whitney*, $p = 0,000$ untuk seluruh perbandingan). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun wungu berpengaruh terhadap luas islet



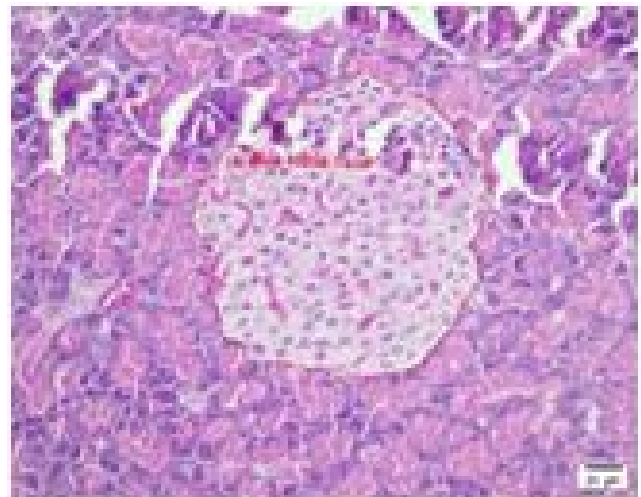
Gambar 1. K-1 (H&E, 400x)



Gambar 2. K-2 (H&E, 400x)



Gambar 3. K-3 (H&E, 400x)



Gambar 4. K-4 (H&E, 400x)

pankreas tikus Wistar diabetes melitus yang diinduksi aloksan.

Rerata luas islet pankreas pada kelompok perlakuan terus meningkat seiring dengan penambahan dosis ekstrak daun wungu. Berdasarkan data yang diperoleh, dosis ekstrak daun wungu yang paling menunjukkan efek perbaikan nyata pada morfologi pankreas adalah 200 mg/kgBB dengan rerata luas islet pankreas tertinggi dibandingkan dengan kelompok lain.

Sasaran utama dari pengobatan diabetes melitus tipe 1 adalah untuk mempertahankan sel β pankreas pada stadium awal dan memulihkan sel β pankreas pada stadium lanjut. Gambaran perbaikan histopatologi pankreas pada kelompok perlakuan dipengaruhi oleh adanya zat aktif dalam ekstrak daun wungu berupa alkaloid dan flavonoid. Kedua senyawa ini memiliki efek sitoprotektif karena perannya sebagai antioksidan alami.¹¹

Alkaloid berperan dalam induksi proses diferensiasi sel progenitor pankreas menjadi sel β yang aktif memproduksi insulin.¹² Alkaloid yang juga dapat ditemukan dalam ekstrak *Ervatamia microphylla* ini terbukti meningkatkan proses diferensiasi dan regenerasi sel β pankreas *in vivo* pada tikus diabetes.¹³ Efek protektif senyawa flavonoid yang merupakan antioksidan dan antiinflamasi terhadap sel β pankreas adalah dengan menstimulasi jalur *pro-survival* dan menghambat ekspresi protein yang bersifat *pro-apoptotic*. Flavonoid akan meningkatkan kapasitas antioksidan pada sel β pankreas sehingga proses akumulasi ROS dan lipid peroksidase pada sel β pankreas akan terhambat. Proses tersebut kemudian mencegah terjadinya autofagi, apoptosis, dan nekrosis pada sel β pankreas. Flavonoid juga berperan penting dalam meningkatkan fungsi mitokondria dan menstimulasi *amplifying pathways* pada sekresi insulin (*cAMP/PKA* dan *PLC/PKC signalling*).¹⁴

TABEL 2
Analisis Deskriptif dan Uji Hipotesis

Luas Islet Pankreas (μm^2)			p^s	p^t	$p^\#$
Kelompok	Mean \pm SD	Median (Min–Max)			
K1	869,27 \pm 382,62	799,54 (354,02 – 1752,95)	0,009	0,131	1
K2	11835,41 \pm 2754,43	12191,33 (7466,05 – 16517,83)	0,029	0,038	0,000*
K3	13087,09 \pm 1827,24	12582,11 (10129,01 – 19591,46)	0,005	0,113	0,000*
K4	19615,27 \pm 2206,97	19275,47 (16468,57 – 24144,58)	0,020	0,064	0,000*

Uji *Kruskal–Wallis* luas islet pankreas, $p=0,000^*$ ($p<0,05$)

Keterangan :

^sUji normalitas *Shapiro–Wilk*

^tUji normalitas *Shapiro–Wilk* data transformasi

[#]Uji *Mann–Whitney* terhadap kelompok K1

*Signifikan ($p<0,05$)

Glukotoksikitas, lipotoksikitas, dan paparan stres oksidatif kronis pada diabetes akan meningkatkan ekspresi gen *pro-apoptotic (caspase)* dan mengakibatkan *down regulation* gen yang bersifat anti apoptosis (protein Bcl-2) pada sel β . Flavonoid menghambat proses perubahan ekspresi gen-gen tersebut sehingga progresivitas apoptosis pada sel β dapat dicegah.¹⁵ Flavonoid juga terlibat dalam menurunkan kadar sitokin IL-1 β serum dan IL-6/1 β yang kemudian menghambat ekspresi iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*) dan mencegah overproduksi NO yang mana bisa menyebabkan kerusakan sel.¹⁶

Hasil penelitian yang didapatkan sesuai dengan hipotesis awal yang menyatakan bahwa terdapat adanya pengaruh ekstrak daun wungu (*Graphthophyllum pictum (L.) Griff*) terhadap luas islet pankreas tikus Wistar diabetes melitus yang diberi perlakuan dengan kontrol. Peningkatan signifikan pada luas islet pankreas ini bisa terjadi karena adanya pembentukan sel β baru melalui proses stimulasi diferensiasi maupun peningkatan survival dari sel β pankreas itu sendiri. Pengaruh berupa perbaikan gambaran histopatologi pankreas ini berbanding lurus dengan peningkatan dosis pemberian ekstrak daun wungu. Penelitian sebelumnya oleh Okky Prameswari (2014), Joni Tandi (2018), Wanodya Ayu (2018), dan Susanti (2019) juga membuktikan bahwa senyawa alkaloid dan flavonoid yang terdapat pada daun pandan, daun kelor, kulit lidah buaya, dan biji labu kuning tidak hanya mencegah progresivitas kematian sel beta pulau Langerhans pankreas, namun juga dapat

meregenerasi sel beta pankreas tikus diabetes yang sudah rusak oleh induksi aloksan. Hal ini menunjukkan bahwa hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang telah ada sebelumnya, dimana alkaloid dan flavonoid dapat memperbaiki morfologi pankreas diabetes melitus.^{6,17-19}

Selama penelitian berlangsung, terdapat beberapa keterbatasan dan kendala yang dihadapi. Tikus Wistar tidak mengalami kondisi hiperglikemi dalam satu waktu sehingga diperlukan pengecekan berulang kali untuk memastikan bahwa semua tikus sudah mengalami diabetes melitus. Uji fitokimia untuk melihat kandungan pasti dari ekstrak daun wungu juga belum dilakukan. Selain itu, penelitian ini juga tidak melihat efek terhadap jumlah sel β pankreas secara langsung namun hanya menjadikan luas islet pankreas secara keseluruhan sebagai perwakilan dari tanda kerusakan serta perbaikan sel β pankreas. Hal ini terkait dengan metode pengecatan *Hematoxylin-Eosin* yang digunakan pada penelitian ini tidak memungkinkan untuk membedakan sel-sel yang menjadi bagian dalam satu islet pankreas.

SIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah terdapat adanya perbedaan ukuran luas islet pankreas yang signifikan pada tikus Wistar diabetes melitus induksi aloksan yang mendapatkan ekstrak daun wungu (*Graphthophyllum pictum (L.) Griff*) dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB peroral setelah perlakuan dibandingkan

dengan kontrol. Efek perbaikan oleh ekstrak daun wungu berbanding lurus dengan peningkatan dosis pemberian. Saran untuk penelitian selanjutnya adalah perlunya penelitian lebih dalam mengenai efek terapeutik ekstrak daun wungu dengan metode pengecatan imunohistokimia parameter jumlah sel β pankreas secara lebih spesifik serta uji fitokimia untuk mengetahui kandungan pasti dari ekstrak daun wungu.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO. Global Report on Diabetes Executive Summary [Internet]. 2016. Available from: www.who.int/diabetes/global-report
2. IDF Diabetes Atlas. 8th ed. International Diabetes Federation. 2017.
3. Menteri Kesehatan Republik Indonesia. Hasil Utama Riskesdas 2018 [Internet]. 2018. Available from: <https://www.litbang.kemkes.go.id/hasil-utama-riskesdas-2018/>
4. Chandrashekhariah KS. Antioxidant and type II diabetes-related enzyme inhibit on properties of few selected medicinal plants. *Biomed Pharmacol J*. 2013;6(2):341-7.
5. Budiaji A, Nani H. Identification Compound Contained in Extract Methanol Leaf Wungu (*Graptophyllum Pictum* (L.) Griff). 2018;3(03):961-4.
6. Prasmewari OM, Widjanarko SB. Uji Efek Ekstrak Air Daun Pandan Wangi Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Dan Histopatologi Tikus Diabetes Mellitus. *J Pangan dan Agroindustr*. 2014;II(2):16-27.
7. World Health Organization. Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines [Internet]. Manila: WHO Regional Office for the Western Pacific; 1993. 44 p. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/207008>
8. National Research Council of the National Academy. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Internet]. 8th ed. Vol. 46. Washington DC: The National Academies Press; 2011. 267-268 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21595115>
9. Allen-Worthington KH, Brice AK, Marx JO, Hankenson FC. Intraperitoneal injection of ethanol for the euthanasia of laboratory mice (*mus musculus*) and rats (*rattus norvegicus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2015;54(6):769-78.
10. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med [Internet]*. 2012;22(3):276-82. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3900052/>
11. Singh P. Pharmacognostical evaluation of aerial parts of *Graptophyllum pictum* (L.) Griff. (Syn: *Justicia picta* Linn.): A well-known folklore medicinal plant Title. *Anc Sci Life [Internet]*. 2015;34(4):223-229. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4535071/>
12. Oh YS. Plant-derived compounds targeting pancreatic beta cells for the treatment of diabetes. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2015;2015:12.
13. Kawakami M, Hirayama A, Tsuchiya K, Ohgawara H, Nakamura M, Umezawa K. Promotion of β -cell differentiation by the alkaloid conophylline in porcine pancreatic endocrine cells. *Biomed Pharmacother [Internet]*. 2010;64(3):226-31. Available from: doi.org/10.1016/j.biopha.2009.09.025
14. Ghorbani A, Rashidi R, Shafiee-Nick R. Flavonoids for preserving pancreatic beta cell survival and function: A mechanistic review. *Biomed Pharmacother*. 2019;111(October 2018):947-57.
15. Al-Ishaq RK, Abotaleb M, Kubatka P, Kajo K, Büsselberg D. Flavonoids and their anti-diabetic effects: Cellular mechanisms and effects to improve blood sugar levels. *Biomolecules*. 2019;9(9).
16. Vinayagam R, Xu B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: A cellular mechanism review. *Nutr Metab [Internet]*. 2015;12(1):1-20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12986-015-0057-7>
17. Tandi J, Rahmawati R, Isminarti R, Lapangoyu J. Efek Ekstrak Biji Labu Kuning Terhadap Glukosa, Kolesterol dan Gambaran Histopatologi Pankreas Tikus Hiperkolesterolemia-Diabetes. *Talent Conf Ser Trop Med*. 2018;1(3):14451.
18. Chandradevi WA, Avesina M, Anggriyawanti DP, Purnama ER. Pemanfaatan Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Pemulihan Struktur Pankreas Mencit Diabetik. *Biotropic J Trop Biol*. 2018;2(2):85-92.
19. Susanti R, Setiadi E, Peniati E, Article H. The Effect of Aloe Vera Peel Extract on Histopathology of Rat Pancreas Induced by Alloxan. *Biosaintifika J Biol Biol Educ*. 2019;11(3):311-7.