

Aktivitas ekstrak etanol daun singawalang (*Petiveria alliacea* L.) dan fraksinya sebagai antidiabetes

Elis Susilawati¹, I Ketut Adnyana², Neng Fisher²

¹Sekolah Tinggi Farmasi Bandung, Jl. Soekarno Hatta No. 754 Cibiru, Bandung

²Sekolah Farmasi, ITB, Jl. Ganesha No. 10 Bandung

Corresponding author email: elis.susilawati@stfb.ac.id

Abstrak

Diabetes melitus (DM) adalah sekelompok gangguan metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia. Salah satu tanaman yang mempunyai efek antidiabetes adalah daun singawalang (*Petiveria alliacea* L.). Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antidiabetes dengan model hewan defisiensi insulin dan penghambatan enzim alfa glukosidase. Pengujian defisiensi insulin dilakukan menggunakan mencit induksi aloksan. Mencit dikelompokkan menjadi 11 kelompok, yaitu normal, kontrol negatif, kontrol positif (glibenklamid 0,65 mg/kgbb), ekstrak etanol (dosis 80 dan 160 mg/kgbb), fraksi n-heksana (dosis 80 dan 160 mg/kgbb), fraksi etil asetat (dosis 80 dan 160 mg/kgbb), dan fraksi air (dosis 80 dan 160 mg/kgbb). Pemberian bahan uji dilakukan berulang setiap hari selama 14 hari dan kadar glukosa darah diukur pada hari ke-7, 14, 17, dan 19. Kemudian hewan dikorbankan, dilakukan isolasi pankreas, dan dihitung luas pulau Langerhans, jumlah sel alfa dan beta pankreas. Pada uji hambat enzim alfa glukosidase, dilakukan penentuan nilai IC50 tiap fraksi terhadap aktivitas enzim, dan akarbose digunakan sebagai pembanding. Hasil uji defisiensi insulin menunjukkan bahwa ekstrak etanol dosis 80 dan 160 mg/kgbb memiliki kemampuan untuk menurunkan kadar glukosa darah. Berdasarkan hasil histologi pankreas juga menunjukkan bahwa ekstrak etanol dosis 80 dan 160 mg/kgbb mengurangi jumlah sel alfa pankreas, diperkirakan dapat menurunkan sekresi glukagon. Pada metode penghambatan enzim alfa glukosidase fraksi n-heksana dan fraksi air menunjukkan adanya penghambatan aktivitas enzim alfa glukosidase yang lebih baik dibandingkan akarbose. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak etanol daun singawalang dan fraksinya mempunyai aktivitas sebagai antidiabetes.

Kata kunci: Daun singawalang, defisiensi insulin, enzim alfa glukosidase.

In vivo and in vitro activity of ethanol extracts from the leaves of singawalang (*Petiveria alliacea* L.) and its fractions as antidiabetic

Abstract

*Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic disorders characterized by hyperglycemia. One of the plants that has antidiabetic effect is the leaves of singawalang (*Petiveria alliacea* L.). This study aims to examine antidiabetic activity with animal model of insulin deficiency and inhibition of alpha glucosidase enzyme. Tests of insulin deficiency were performed using alloxan induction mice. The mice were grouped into 11 groups, normal, negative control, positive control (glibenclamide 0.65 mg/kgbw), ethanol extract (doses 80 and 160 mg/kgbw), n-hexane fractions (doses 80 and 160 mg/kgbw), ethyl acetate doses 80 and 160 mg/kgbw, and water fractions (doses of 80 and 160 mg/kgbw). Testing was performed daily for 14 days and blood glucose was measured on days 7, 14, 17, and 19. Later animals were sacrificed, isolated pancreas, and calculated the area of Langerhans Island, the number of alpha and beta cells of the pancreas. In the alpha glucosidase enzyme inhibition test, IC50 values were determined for each fraction of enzyme activity, and the acarbose was used as a comparison. Insulin deficiency test results showed that ethanol extract dose 80 and 160 mg/kg bw has the ability to lower blood glucose levels. Based on histological results of the pancreas also showed that ethanol extract dose 80 and 160 mg/kgbw reduce the number of pancreatic alpha cells, is expected to decrease glucagon secretion. In the inhibition method of alpha glucosidase enzyme n-hexane fraction and water fraction showed the inhibition of alpha glucosidase enzyme activity better*

than akarbose. The conclusion of this research is the ethanol extract of singawalang leaves and fraction has activity as antidiabetes.

Keywords: Diabetes mellitus, leaf singawalang, insulin deficiency, the enzyme alpha-glucosidase.

Pendahuluan

Diabetes melitus (DM) adalah sekelompok gangguan metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia dan kelainan pada metabolisme protein, lemak dan karbohidrat (Dipiro, 2015). Kejadian diabetes melitus terus meningkat tiap tahunnya di tiap negara dan berdasarkan data dari *International Diabetes Federation* (IDF) diperkirakan terdapat sekitar 382 juta orang di dunia menderita diabetes pada tahun 2013. Jumlah penderita DM di Indonesia menempati diposisi ketujuh berada dibawah China, India, USA, Brazil, Rusia dan Meksiko (IDF, 2013).

Diabetes melitus ditandai oleh adanya resisten insulin, disregulasi produksi glukosa hati, toleransi glukosa terganggu (TGT) dan penurunan fungsi sel beta pankreas. Bila sel beta tidak lagi dapat menghasilkan sekresi insulin yang cukup tinggi untuk mengimbangi resistensi insulin akan muncul hiperglikemia saat puasa dan diabetes (DeFronzo, 1988).

Untuk menjaga agar tidak terjadi diabetes, seseorang harus dapat menjaga kadar gula darah tetap normal dengan cara meningkatkan produksi insulin dan menghambat aktivitas alfa glukosidase pada organ pencernaan sehingga akan terjadi penghambatan secara kompetitif enzim-enzim pencernaan karbohidrat di usus

halus seperti maltase, isomaltase, sukrase, dan glukamilase (Dipiro dkk., 2005). Penghambatan enzim-enzim tersebut akan menghambat penyerapan karbohidrat pada saluran pencernaan sehingga dapat mencegah meningkatnya kadar glukosa darah (Chisholm-Burns dkk., 2008).

Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai antidiabetes adalah daun singalawang. Susilawati dkk. (2016) telah membuktikan efek ekstrak etanol daun singawalang dan fraksinya sebagai antidiabetes pada model hewan uji toleransi glukosa. Oleh karena itu, untuk melengkapi penelitian sebelumnya, maka penelitian ini bertujuan menguji efek ekstrak etanol daun singawalang dan fraksinya dengan metode defisiensi insulin dan penghambatan aktivitas alfa glukosidase.

Metode penelitian

Alat. Alat maserasi, penangas air, rotary evaporator, timbangan analitik, timbangan hewan, glukometer Easy Touch®, inkubator, *micro-reader*, dan peralatan gelas yang digunakan di laboratorium.

Bahan. Bahan uji daun singawalang (*P.alliacea* L) diperoleh dari Kampung Cijahe, Kelurahan Curug Mekar, Kecamatan Bogor Barat, Kota Bogor.

Bahan lain yang digunakan adalah etanol 96%, aquadest, etil asetat, *n*-heksana, glibenklamid, aloksan monohidrat, larutan NaCl 0,9%, carboxy methyl cellulosa (CMC), dapar formalin, asam asetat, kloroform, metanol, enzim alfa glukosidase (rekombinan *Saccharomyces cerevisiae*) yang berasal dari Sigma-Aldrich, substrat p-nitrofenil- α -D-glukosidase (PNPG), larutan bufer fosfat pH 7, akarbose, dan natrium karbonat.

Hewan Uji. Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan galur Swiss Webster dengan bobot badan 20-30 gram, berumur 2-3 bulan, sehat dan memiliki aktivitas normal yang diperoleh dari Laboratorium Hewan, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung.

Prosedur Penelitian. Tahapan penelitian ini dibagi dalam dua metode, yaitu metode defisiensi insulin (*in vivo*) dan penghambatan pada enzim alfa glukosidase (*in vitro*). Pengujian secara *in vivo* dengan menggunakan model hewan defisiensi insulin menggunakan induksi aloksan (Etuk, 2010). Sedangkan metode *in vitro* terhadap penghambatan aktivitas enzim α -glukosidase dengan menggunakan substrat p-nitrofenil- α -D-glukosidase (PNPG) (Kaskoos, 2013).

Pengujian *in vivo* metode defisiensi insulin

- Setiap hewan uji menggunakan aloksan 50-55 mg/kg bb, kecuali kelompok normal
- Setelah 3 hari pemberian aloksan, diukur kadar glukosa darah setiap hewan uji. Hewan uji dinyatakan diabetes jika kadar glukosa darah lebih dari 200 mg/dL.

- c. Hewan uji yang dinyatakan diabetes dibagi menjadi 11 kelompok:
- Kelompok normal (tidak diinduksi aloksan dan menerima suspensi CMC 0,5%),
 - Kontrol negatif (diinduksi aloksan, dan menerima suspensi CMC 0,5%)
 - Kontrol positif (diinduksi aloksan dan menerima suspensi glibenklamid 0,65 mg/kg bb)
 - 2 kelompok ekstrak etanol (diinduksi aloksan dan menerima ekstrak etanol singalawang dosis 80 dan 160 mg/kg bb)
 - 2 kelompok fraksi n-heksana (diinduksi aloksan dan menerima fraksi n-heksana dosis 80 dan 160 mg/kg bb)
 - 2 kelompok fraksi etil asetat (diinduksi aloksan dan menerima fraksi etil asetat dosis 80 dan 160 mg/kg bb)
 - 2 kelompok fraksi air (diinduksi aloksan dan menerima fraksi air dosis 80 dan 160 mg/kg bb)
- d. Pemberian bahan uji dilakukan secara berulang setiap hari selama 14 hari dan kadar glukosa darah mencit diukur pada hari ke- 7, 14, 17 dan 19.
- e. Hewan yang telah diuji selama 19 hari dikorbankan kemudian pankreasnya diisolasi dan dilakukan pewarnaan Gomori (Fitriani, N.H.N. 2014)

Pengujian *in vitro* metode penghambatan aktivitas alfa glukosidase

Pada metode secara *in vitro* terhadap penghambatan aktivitas enzim α -glukosidase dilakukan pada kondisi optimum yang meliputi pH 6,8 dan suhu 37°C.

- a. Ekstrak etanol dan fraksi di buat dalam beberapa konsentrasi yang dilarutkan dalam dafar fosfat 0,1 M (pH 6,8), dengan menggunakan pembanding akarbose.
- b. Enzim ditimbang sebanyak 1,2 mg yang kemudian dilarutkan dengan dafar fosfat 0,1 M (pH 6,8) menghasilkan konsentrasi enzim sebesar 27,84 U/mL. Kemudian larutan induk enzim diencerkan hingga konsentrasinya menjadi 0,078 U/mL.
- c. Sebanyak 60 μ L sampel uji ditambahkan 50 μ L dafar fosfat 0,1 M (pH 6,8) dan diinkubasi dalam *micro plate* 96 *well* pada suhu 37°C

selama 20 menit. Pembuatan blangko dilakukan dengan mengganti 60 μ L sampel uji dengan dafar fosfat.

- d. Setelah prainkubasi, 50 μ L *p-nitrophenil- α -D-glukopyranoside* (PNPG) 5 mM dimasukkan kedalam *mikro plate*, dan selanjutnya diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 20 menit.
- e. Pada tahap akhir, reaksi dihentikan dengan penambahan 160 μ L larutan Na₂CO₃ 0,2 M ke dalam *well* dan absorbansi dibaca dengan menggunakan *micro-reader* pada panjang gelombang 425 nm.
- f. Persentase penghambatan aktivitas α -glukosidase dapat dihitung menggunakan persamaan :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A_{co} - A_t}{A_{co}}$$

Keterangan: A_{co} = Absorbansi kontrol

A_t = Absorbansi sampel

- g. Perhitungan IC₅₀ Aktivitas Inhibisi Enzim α -glukosidase melalui persamaan regresi linear $y = a + bx$, dimana sumbu x adalah konsentrasi sampel dan sumbu y adalah % inhibisi, maka nilai IC₅₀ dapat dihitung menggunakan rumus :

$$IC_{50} = \frac{50-a}{b}$$

(Kaskoos, 2013)

Hasil dan pembahasan

Uji antidiabetes *in vivo* metode defisiensi insulin. Hasil pengujian antidiabetes *in vivo* metode defisiensi insulin dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil menunjukkan penurunan kadar glukosa darah yang cukup bervariasi sehingga memberikan standar deviasi yang cukup besar. Secara umum seluruh kelompok uji menunjukkan adanya penurunan kadar glukosa darah di hari ke-19 di bandingkan dengan kondisi awal, kecuali fraksi n-heksan 80 dan 160 mg/kg bb juga fraksi etil asetat 80 mg/kg bb menunjukkan terjadinya kenaikan kadar glukosa darah. Berdasarkan data kelompok kontrol positif, hewan uji masih menunjukkan keadaan hiperglikemia hingga akhir hari ke-17 sehingga metode diabetes aloksan ini cocok untuk digunakan sebagai model hewan untuk pengujian aktivitas antidiabetes.

Tabel 1. Kadar Glukosa Darah Mencit Hari ke 7- 19 pada Uji Defisiensi Insulin

Kelompok	Kadar glukosa darah (mg/dL) hari ke-			
	7	14	17	19
Kontrol normal	103,40±9,65*	137,60±20,47*	139,40±10,92*	110,60±15,32*
Kontrol negatif	458,80±92,77	477,60±89,92	500,20±106,62	455,00±97,10
Kontrol positif (Glibenklamid 0,65 mg/kg bb)	252,00±112,91	248,40±101,92*	242,60±80,11*	205,80±89,73*
Ekstrak etanol 80 mg/kg bb	311,40±185,17	287,40±144,25	259,40±178,57*	203,20±86,03*
Ekstrak etanol 160 mg/kg bb	244,40±165,09	227,00±112,16*	252,60±161,68*	226,80±89,77*
Fraksi n-heksan 80 mg/kg bb	359,60±172,93	309,80±142,60	303,00±180,48	356,20±173,34
Fraksi n-heksan 160 mg/kg bb	342,40±151,14	306,40±187,90	348,40±205,76	414,20±187,48
Fraksi etil asetat 80 mg/kg bb	440,60±195,84	372,60±217,56	349,40±134,32	373,80±160,02
Fraksi etil asetat 160 mg/kg bb	431,80±166,81	428,40±192,13	333,20±185,19	292,80±147,98
Fraksi Air 80 mg/kg bb	308,60±164,56	288,40±197,47	311,00±189,77	368,20±227,10
Fraksi Air 160 mg/kg bb	494,20±155,36	492,40±166,37	555,00±72,10	454,20±160,02

* = Berbeda bermakna ($p < 0,05$) terhadap kontrol positif

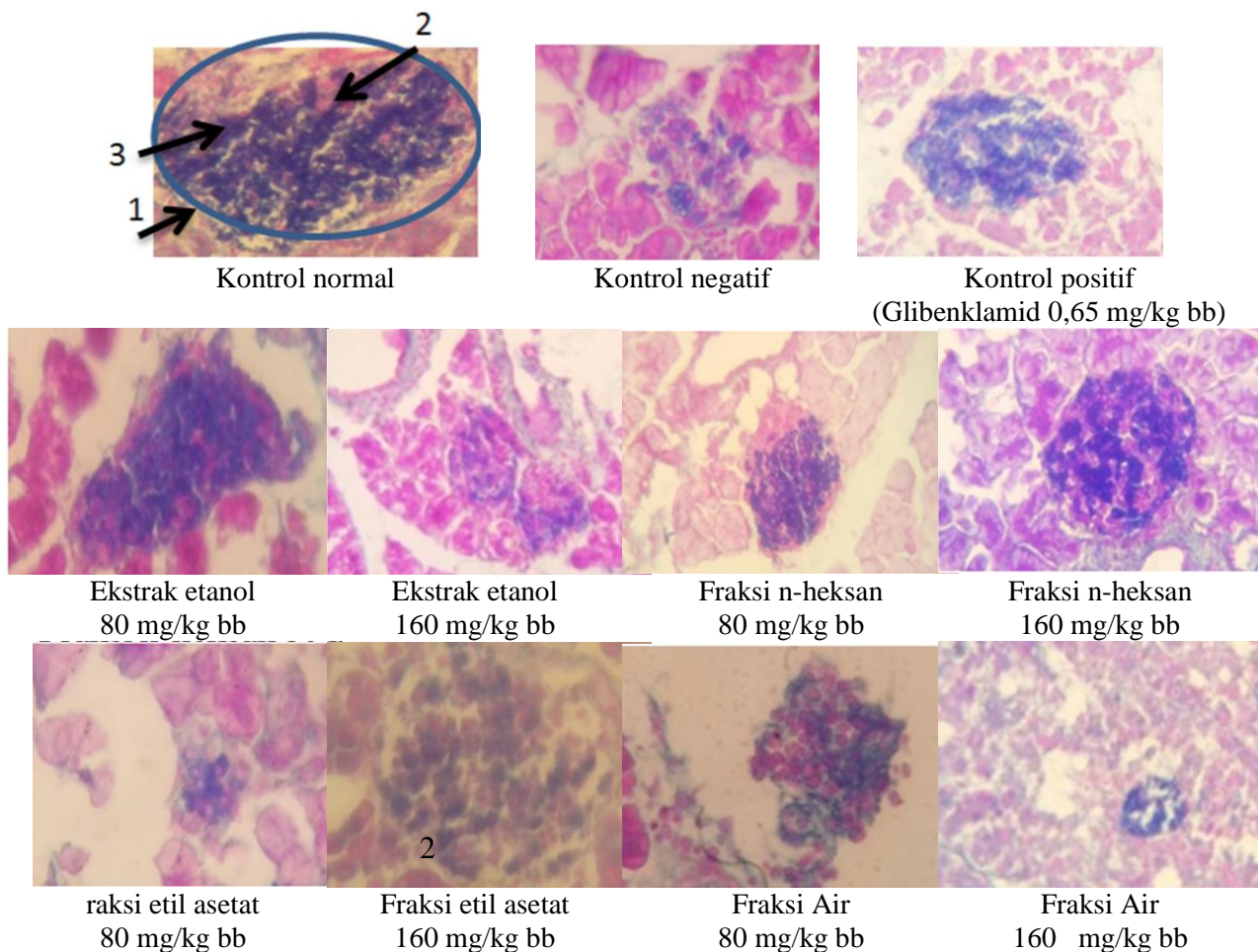
Berdasarkan Tabel 1, pada hari ke 14 menunjukkan kelompok ekstrak etanol 160 mg/kgbb dan glibenklamid 0,65 mg/kg bb dapat menurunkan kadar glukosa darah berbeda bermakna ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif. Pada hari ke 17 dan 19 kelompok ekstrak etanol 80 dan 160 mg/kg bb juga glibenklamid 0,65 mg/kg bb dapat menurunkan kadar glukosa darah berbeda bermakna ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif.

Pada hasil pengujian dengan metode defisiensi insulin ekstrak etanol daun singawalang memiliki aktivitas antidiabetes lebih baik di bandingkan dengan fraksinya, dengan ditunjukkan penurunan penurutan glukosa darah mencit pada hari ke 14 sama dengan pembanding glibenklamid.

Hewan yang telah diuji selama 19 hari dikorbankan dua ekor dari tiap kelompok,

kemudian pankreasnya diisolasi dan dilakukan pewarnaan Gomori dengan menggunakan pewarna *victoria blue* dan floksin. Hasil pewarnaan Gomori (Gambar 1).

Parameter yang diamati untuk menilai keberhasilan terapi dapat dilihat dari luas rata-rata pulau langerhans, jumlah sel alfa dan jumlah sel beta dalam pulau Langerhans pada satuan luas yang sama. Sel alfa memiliki porsi sekitar 20% sedangkan sel beta memiliki porsi sekitar 75% dari pulau Langerhans (Katzung, 2009). Sel alfa merupakan sel yang memproduksi hormon glukagon sedangkan sel beta memproduksi hormon insulin (Martini, 2009). Adanya perbaikan terapi ditunjukkan oleh tingginya sel beta, sebaliknya jumlah sel alfa yang tinggi akan memperparah keadaan diabetes melitus. Hasil pengamatan histologi dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 1. Hasil histologi pankreas dengan pembesaran 40 kali

Keterangan :

- 1 : Pulau langerhans
- 2 : Sel alfa
- 3 : Sel beta

Tabel 2. Luas Pulau Langerhans, Jumlah Sel Alfa dan Jumlah Sel Beta

Kelompok	Luas pulau langerhans (mm ²)	Sel Alfa	Sel Beta
Kontrol normal	1,10±0,10	9,50±0,50	47,50±2,50
Kontrol negatif	0,10±0,00	51,00±3,00	16,50±6,50
Kontrol positif (Glibenklamid 0,65 mg/kg bb)	0,20±0,04	28,00±5,00	43,50±0,50
Ekstrak etanol 80 mg/kg bb	0,12±0,04	29,50±6,50	15,00±3,00
Ekstrak etanol 160 mg/kg bb	0,20±0,01	34,00±5,00	19,00±1,00
Fraksi n-heksan 80 mg/kg bb	0,12±0,01	43,50±7,50	32,00±3,00
Fraksi n-heksan 160 mg/kg bb	0,15±0,07	47,50±12,50	32,00±4,50
Fraksi etil asetat 80 mg/kg bb	0,01±0,00	11,00±0,00	5,00±1,00
Fraksi etil asetat 160 mg/kg bb	0,12±0,06	43,00±14,00	24,00±5,00
Fraksi air 80 mg/kg bb	0,04±0,03	59,50±9,50	5,00±1,00
Fraksi air 160 mg/kg bb	0,16±0,05	17,50±2,50	7,50±1,50

Berdasarkan Tabel 2, kelompok kontrol negatif menunjukkan adanya perbedaan antara luas pulau langerhans, jumlah sel alfa dan sel beta dibandingkan dengan kontrol positif. Hal ini membuktikan bahwa pemodelan uji defisiensi insulin dengan aloksan berhasil. Sedangkan perbedaan antar kelompok uji dengan kontrol positif hanya di tunjukkan oleh ekstrak etanol 80 dan 160 mg/kg bb pada jumlah sel alfa, yaitu berkurangnya jumlah sel alfa pankreas, sehingga diperkirakan dapat menurunkan kadar glukosa darah dengan menekan sekresi glukagon.

Uji antidiabetes secara *in vitro* metode penghambatan enzim α -glukosidase. Penelitian ini dilakukan pada pH 6,8 dan suhu 37°C, disesuaikan dengan suhu optimum reaksi enzimatis. Pengurangan aktivitas enzim dapat disebabkan oleh faktor penyimpanan setelah produksi yang tidak sesuai kriteria yang tercantum pada label enzim, seperti terpapar cahaya matahari, suhu penyimpanan yang terlalu tinggi dan hal-hal lain yang dapat memicu hilangnya aktivitas enzim. Aktivitas enzim ditetapkan dalam internasional unit, yaitu jumlah enzim yang dapat mengkatalisis pembentukan 1,0 μ mol D-glukosa dari p-nitrofenil- α -D-glukosidase pada pH 6,8 dan suhu 37°C selama satu menit (Sigma, 1996).

Inkubasi dilakukan dua tahap, pertama di inkubasi selama 20 menit untuk memberikan waktu agar larutan uji mencapai suhu 37°C dan inkubasi tahap kedua selama 20 menit yang merupakan inkubasi untuk reaksi enzimatis kemudian reaksi dihentikan dengan penambahan natrium karbonat. Produk hasil reaksi antara α -glukosidase dan p-nitrofenil- α -D-glukosidase adalah p-nitrofenil yang berwarna kuning (Cihan, *et al.*, 2010), sehingga produk ini dapat diukur serapannya dengan *microreader* pada panjang gelombang 425 nm. Untuk mengkoreksi serapan yang dihasilkan, maka dilakukan pengukuran serapan blanko dengan menggantikan posisi enzim dengan dapar. Hal ini bertujuan untuk melihat serapan yang diberikan sampel uji tanpa adanya reaksi enzimatis. Berdasarkan pengujian didapat absorban sebesar 0,779.

Besarnya penghambatan aktivitas enzim dilihat dari berkurangnya p-nitrofenil yang terbentuk bila dibandingkan dengan aktivitas enzim awal. Besarnya aktivitas inhibisi dari setiap rentang konsentrasi dilihat dari persen inhibisi yang dihasilkan, dimana semakin besar persen inhibisi yang dihasilkan maka semakin banyak aktivitas enzim yang dihambat. Pengujian

ini dilakukan terhadap ekstrak dan fraksi daun singawalang dengan beberapa konsentrasi yang berbeda, hal ini tergantung pada persen inhibisi yang dihasilkan oleh setiap sampel uji yang berbeda-beda pula. Pengujian juga dilakukan terhadap akarbose sebagai obat pembanding yang mempunyai mekanisme menghambat enzim α -glukosidase.

Pada penelitian ini semua komponen dilarutkan dalam dapar fosfat pH 6,8, termasuk didalamnya enzim, substrat dan sampel uji. Hal ini bertujuan agar pH larutan tetap terjaga pada pH 6,8. Hal ini penting karena merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap aktivitas enzim sehingga diharapkan dengan menjaga pH enzim maka akan menjaga enzim tetap bereaksi secara optimum. Kekuatan dari suatu sampel dalam menghambat aktivitas enzim digambarkan dengan nilai IC₅₀, yaitu konsentrasi yang menghambat 50% aktivitas enzim. Semakin kecil nilai IC₅₀ yang diperoleh maka semakin kuat sampel tersebut dalam menghambat aktivitas enzim α -glukosidase (Tabel 3)

Tabel 3. Penghambatan Aktivitas Enzim α -glukosidase

Kelompok	IC ₅₀ (mg/mL)
Akarbose	1,28±31,07
Ekstrak etanol	Tidak berefek
Fraksi n-heksan	0,36±9,09
Fraksi etil asetat	Tidak berefek
Fraksi air	0,33±10,05

Persen inhibisi (IC₅₀) akarbose, fraksi n-heksana dan fraksi air berturut-turut adalah 1,28 mg/mL, 0,36 mg/mL dan 0,33 mg/mL. Nilai IC₅₀ akarbose yang diperoleh merupakan IC₅₀ yang paling besar bila dibandingkan terhadap sampel uji. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa akarbose mempunyai aktivitas yang rendah terhadap enzim α -glukosidase yang berasal dari mikroorganisme seperti *Saccharomyces cereviceae*, namun akarbose lebih efektif dalam menghambat α -glukosidase yang berasal dari mamalia (Zhang, 2014). Sedangkan untuk ekstrak etanol dan fraksi etil asetat tidak terjadi penghambatan aktivitas α -glukosidase. Sehingga dapat disimpulkan bahwa hanya fraksi n-heksana dan fraksi air yang dapat menghambat kerja enzim α -glukosidase.

Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak etanol daun singawalang dan fraksinya mempunyai aktivitas sebagai antidiabetes.

Daftar pustaka

- Chisholm-Burns, Marie; Schwinghammer, Terry; Wells, Barbara; Malone, Patrick; Dipiro, Joseph; Kolesar, Jill; John, Rotschafer, 2008, *Pharmacotherapy Principles and Practice*. New York: Mc Graw Hill.
- DiPiro J.T., Wells B.G., Schwinghammer T.L. and DiPiro C. V., 2015, *Pharmacotherapy Handbook*, Ninth Edit., McGraw-Hill Education Companies, Inggris, 161
- DiPiro J.T., Wells B.G., Schwinghammer T.L. and DiPiro C. V., 2005. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic approach*. New York: Mc Graw Hill.
- IDF, 2013. *IDF Diabetes Atlas*. 6th ed. s.l.:International Diabetes Federation.
- DeFronzo, R.A, (1988) *The Triumvirate of β -cell, muscle, liver: a collusion responsible for NIDDM*. *Diabetes* 37:667-687.
- Fitriani, N.H.N. (2014) : Aktivitas Antidiabetes Melitus Fraksi dari ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap Mencit Jantan Swiss Webster, Tesis, *Institut Teknologi Bandung*, 14-19.
- Gomori, G. (1939) : A Differential Stain for Cell Types in The Pancreatic Islets, *Am. J. Pathol*, 15(4), 497-499.
- Etuk, E.U. (2010) : Animals Models for Studying Diabetes Mellitus, *Agric. Biol. J. N. Am.*, 2010, 1(2): 130-134
- International Diabetes Federation. (2013) : *IDF Diabetes Atlas Sixth edition*, 34
- Katzung, B.G., Masters, S.B and Trevor, A.J. 2009. *Basic and Clinical Pharmacology* 11th Ed. McGraw-Hill Companies, China.
- Kaskoos A, R., 2013. *In-vitro α -glucosidase inhibition and antioxidant activity of methanolic extract of Centaurea calcitrapa from Iraq*. *American Journal of Essential Oils and Natural Product*, 1(1), pp. 122-125.
- Martini, F.H., Nath, J.L., Bartholomew, E.F., 2012. *Fundamentals of Anatomy & Physiology*. 9th ed. US: Benjamin Cummings, 620-621
- Susilawati E, I Ketut Adnyana Neng Fisher, 2016, *Kajian Aktivitas Antidiabetes Dari Ekstrak Etanol dan Fraksinya dari Daun Singawalang (Petiveria alliacea L.)*, Bandung, STFB.
- Zhang, J., Wang, G., Beta, T, and Dong, J. (2014) : α -Glucosidase Inhibitory Activity of Polyphenols from the Burs of Castanea mollissima Blume. *Molecules*, Volume 19, pp. 8373-8386.