

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang dimanfaatkan pada penelitian pengaruh pemberian ekstrak buah bit (*Beta vulgaris L.*) terhadap kadar gula darah dan histopatologi pankreas mencit putih jantan yang diinduksi aloksan ini yaitu buah bit (*Beta vulgaris L.*). Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah buah bit yang diperoleh dari daerah Tawangmangu yang segar dan matang tetapi belum terlalu masak, berusia 2-3 bulan, berwarna merah tua, berukuran sedang, dan dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70%.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama berisi identifikasi dari keseluruhan sampel. Variabel utama pertama pada penelitian ini yaitu ekstrak buah bit dosis 0,35 g/kgBB, 0,7 g/kgBB, dan 1,05 g/kgBB mencit. Variabel utama kedua adalah kadar gula darah dan histopatologi pankreas. Variabel utama ketiga adalah mencit putih jantan.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang diidentifikasi dapat dikategorikan ke dalam berbagai jenis variabel seperti variabel bebas, variabel terkendali serta variabel tergantung.

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi hasil dari variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini merupakan variasi dosis ekstrak buah bit 0,35 g/kgBB, 0,7 g/kgBB, dan 1,05 g/kgBB.

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung merupakan variabel yang nilainya ingin dilihat akibat pengaruh variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar gula darah serta histopatologi pankreas pada mencit putih jantan.

2.3 Variabel terkendali. Variabel terkendali merupakan variabel yang efeknya dikendalikan agar tidak mempengaruhi variabel tergantung. Variabel terkendali pada penelitian ini diantaranya kondisi sampel, induksi agen pendiabet, pakan hewan uji, berat badan, serta jenis kelamin hewan uji.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, buah bit adalah umbi bit segar dan matang tetapi belum terlalu masak, berusia 2 sampai 3 bulan, berwarna merah tua, dan berukuran sedang.

Kedua, ekstrak buah bit adalah hasil maserasi dari buah bit menggunakan pelarut etanol 70% dan diuap menggunakan *rotatory evaporator*.

Ketiga, kadar gula darah adalah kadar gula darah yang diperoleh dari ujung ekor mencit.

Keempat, histopatologi adalah sampel histopatologi pankreas mencit dari seluruh kelompok uji .

Kelima, pulau langerhans adalah daerah pada pankreas mencit yang mengandung sel β pankreas.

Keenam, nekrosis adalah sel β pankreas mencit yang mengalami kerusakan.

Ketujuh, piknosis adalah inti sel pada sampel pankreas mencit yang mengalami penyusutan.

Kedelapan, kariolisis adalah proses larutnya kromatin pada inti sel sampel pankreas mencit.

Kesembilan, kariorekisis adalah inti sel yang pecah pada sampel pankreas mencit.

Kesepuluh, mencit putih adalah mencit putih jantan dengan usia 2-3 bulan dan berat 20 sampai 30 g.

Kesebelas, dosis efektif adalah dosis terkecil dengan kemampuan menurunkan kadar gula darah pada mencit yang sebanding dengan kontrol positif yang dibuktikan dengan hasil uji statistik.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *rotatory evaporator*, oven, cawan porselin, timbangan hewan, timbangan analitik, sonde oral, vial, *spuit*, alat-alat gelas, *waterbath*, gunting bedah, glukometer, strip glukosa, *staining jar*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah buah bit segar dan matang usia 2-3 bulan, berwarna merah tua, serta berukuran sedang, etanol beberapa konsentrasi (70%, 80%, 90%, dan absolut), NaCl 0,9%, aquades, pereaksi Dragendorff, Mayer, Bouchardat,

Liebermann-Burchard, FeCl_3 , CMC-Na, HCl 2N, Serbuk Mg, amil alkohol, metformin, aloksan monohidrat, paraffin cair, pewarna hematoksilin-eosin.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tujuan dilakukannya determinasi tanaman adalah untuk mengetahui identitas tanaman yang hendak diteliti apakah benar merupakan tanaman yang diinginkan. Determinasi tanaman dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu.

2. Pembuatan ethical clearance

Berdasarkan Peraturan BPOM Nomor 18 Tahun 2021, setiap uji yang menggunakan hewan harus mendapatkan Persetujuan Etik (*Ethical Clearance*). Tujuan pembuatan *ethical clearance* adalah untuk memastikan bahwa hewan uji yang digunakan dalam penelitian diperlakukan dengan baik dan mendapatkan haknya sebagai makhluk hidup. Pengajuan izin penelitian dilakukan di RSUD. Dr. Moewardi Surakarta.

3. Pembuatan serbuk simplisia

Buah bit yang digunakan pada penelitian ini adalah buah bit segar dan matang, berusia 2-3 bulan, berwarna merah tua, dan berukuran sedang. Sebanyak 15 kg buah bit dikumpulkan lalu disortir dan dibersihkan menggunakan air yang mengalir. Buah bit yang sudah dibersihkan kemudian dirajang tipis dengan ketebalan sekitar 0,1 cm, lalu dikeringkan dengan cara dijemur di bawah matahari hingga kering. Simplisia yang sudah kering kemudian dihaluskan hingga menjadi serbuk. Serbuk simplisia kemudian diayak menggunakan ayakan ukuran 60 mesh (Margata *et al.*, 2020).

4. Penetapan susut pengeringan serbuk simplisia

Sebanyak 2 g serbuk simplisia buah bit ditimbang dengan saksama dalam botol timbang dangkal bertutup yang telah ditara dan dipanaskan sebelumnya. Sampel diratakan dalam botol timbang dengan cara menggoyangkan botol hingga terbentuk lapisan setebal 5 sampai 10 mm. Botol dimasukkan ke dalam ruang pengering dengan posisi penutup terbuka. Sampel dikeringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap (FHI Edisi II, 2017).

5. Pembuatan ekstrak buah bit

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan simplisia dengan pelarut adalah 1:10. Sebanyak 900 g serbuk simplisia dan 9 L pelarut dimasukkan ke dalam maserator, lalu direndam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk dan didiamkan selama 18 jam. Maserat dipisahkan dengan filtrasi dan diulangi penyarian sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama sebanyak 4,5 L. Selanjutnya, maserat dikumpulkan dan diuapkan menggunakan rotavapor hingga diperoleh ekstrak kental, lalu dihitung rendemennya (FHI Edisi II, 2017).

6. Penetapan kadar air ekstrak buah bit

Penetapan kadar air ekstrak buah bit dilakukan menggunakan metode gravimetri. Sebanyak 10 g sampel ekstrak ditimbang dengan saksama, lalu dimasukkan ke dalam wadah yang telah ditara. Sampel kemudian dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam, lalu ditimbang. Pengeringan dilanjutkan dengan selang waktu 1 jam dan ditimbang hingga perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (FHI Edisi II, 2017).

7. Skrining fitokimia

7.1 Pengujian alkaloid. Sejumlah sampel yang hendak diuji ditambahkan dengan 1 mL HCl 2N dan 9 mL aquades, lalu dipanaskan. Filtrat kemudian disaring dengan kerta saring dan dimasukkan ke dalam 4 tabung reaksi. Tabung pertama merupakan blanko, tabung kedua ditambahkan dengan pereaksi Mayer, hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih atau terjadi kekeruhan. Tabung ketiga ditambahkan pereaksi Dragendorff, hasil positif ditandai dengan adanya kekeruhan atau terbentuknya endapan berwarna jingga kuning. Bagian keempat ditambahkan dengan pereaksi Bouchardat, hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan coklat (Sulistyarini *et al.*, 2020).

7.2 Pengujian flavonoid. Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan Mg dan HCl 2N. Campuran kemudian dipanaskan dan disaring. Filtrat yang didapatkan ditambah amil alkohol, lalu dikocok dengan kuat. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah. Warna jingga hingga merah merupakan senyawa flavon, warna merah tua menandakan senyawa

tersebut merupakan golongan flavanol atau flavanon, dan warna hijau merupakan senyawa glikon atau glikosida (Hananti *et al.*, 2012).

7.3 Pengujian tanin. Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan FeCl_3 . Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru tua (Widowati, 2009 dalam Halimu *et al.*, 2017)

7.4 Pengujian saponin. Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tabung reaksi ditambahkan aquades dan dikocok dengan kuat selama 30 detik. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya busa yang mantap dimana busa tidak hilang selama 30 detik (Marliana *et al.*, 2005 dalam Febriani *et al.*, 2021).

7.5 Pengujian antosianin. Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu dipanaskan dengan HCl 2 M selama 2 menit pada suhu 100°C. Perubahan warna pada sampel diamati. Apabila warna merah pada sampel tidak berubah, maka sampel positif mengandung antosianin (Febriani *et al.*, 2021).

7.6 Pengujian terpenoid. Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan asetat anhidrat dan asam sulfat pekat. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna merah keunguan (Dwisari *et al.*, 2016).

8. Penetapan dosis

Dosis ekstrak yang digunakan pada penelitian ini adalah dosis yang diadaptasi dari penelitian Al Harbi *et al.* (2021), yakni 0,5 g/kgBB tikus. Dosis ini kemudian dikonversi pada mencit dengan faktor konversi 0,14 menjadi 0,7 g/kgBB mencit. Dosis ini dijadikan dosis tengah dengan variasi dosis 0,35 g/kgBB, 0,7 g/kg BB, dan 1,05 g/kgBB mencit. Dosis aloksan yang digunakan pada penelitian ini adalah 0,15 g/kgBB mencit. Dosis metformin yang digunakan adalah 850 mg sehari pada manusia. Dosis ini kemudian dikonversi ke mencit dengan faktor konversi 0,0026 sehingga didapatkan dosis pada mencit sebesar 0,11 g/kgBB mencit.

9. Pengelompokan dan perlakuan hewan uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit yang dibagi menjadi 6 kelompok uji dan diberikan perlakuan yang berbeda-beda. Penentuan jumlah hewan uji tiap kelompok pada pengujian dilakukan dengan menggunakan rumus Federer. Masing-masing kelompok uji terdiri atas 4 ekor mencit. Sebanyak 24 ekor mencit putih jantan (*Mus musculus*). Hewan uji diaklimatisasi selama 7

hari sebelum diberi perlakuan dan tetap diberi pakan dan minum sesuai standar laboratorium *ad libitum*.

Kelompok pertama merupakan kelompok kontrol normal. Kelompok kontrol normal adalah kelompok mencit yang tidak diberikan perlakuan.

Kelompok kedua merupakan kelompok kontrol positif. Kelompok kontrol positif merupakan mencit yang diinduksi aloksan monohidrat dan menerima metformin 0,11 g/kg BB mencit sebagai antihiperglikemik.

Kelompok ketiga merupakan kelompok kontrol negatif. Kelompok kontrol negatif merupakan mencit yang diinduksi aloksan monohidrat serta CMC-Na 0,5%.

Kelompok keempat merupakan kelompok uji pemberian ekstrak buah bit dosis 0,35 g/kgBB terhadap mencit yang diinduksi aloksan.

Kelompok kelima merupakan kelompok uji pemberian ekstrak buah bit dosis 0,7 g/kgBB terhadap mencit yang diinduksi aloksan.

Kelompok keenam merupakan kelompok uji pemberian ekstrak buah bit dosis 1,05 g/kg BB terhadap mencit yang diinduksi aloksan.

Pemberian induksi aloksan monohidrat dosis 0,15 g/kgBB mencit dilakukan dengan cara menyuntikkan secara intraperitoneal dan diukur kadar gula darahnya setelah 5 hari pemberian. Pemberian larutan uji dilakukan dengan cara menyuntikkan secara per oral larutan uji selama 14 hari.

10. Pembuatan larutan uji

10.1 Pembuatan larutan CMC-Na 0,5%. Sebanyak 0,5 g CMC-Na diambil dan dilarutkan dengan 50 mL aquades panas sambil diaduk hingga homogen. Setelah itu, larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquades hingga volume 100 mL.

10.2 Pembuatan suspensi metformin. Suspensi metformin dibuat dengan konsentrasi 0,5%. Metformin ditimbang lalu digerus halus. Serbuk metformin kemudian dilarutkan dengan CMC-Na 0,5% sedikit demi sedikit hingga homogen.

10.3 Pembuatan larutan aloksan monohidrat. Larutan aloksan monohidrat dibuat dalam konsentrasi 1%. Aloksan monohidrat ditimbang lalu dilarutkan dengan NaCl 0,9% dan diaduk *ad homogen*.

10.4 Pembuatan suspensi ekstrak buah bit. Larutan stok buah bit dibuat dalam konsentrasi 3%. Sejumlah ekstrak buah bit

ditimbang lalu dilarutkan dengan CMC-Na 0,5% dan diaduk *ad homogen*.

11. Pengukuran kadar gula darah

Pengukuran kadar gula dilakukan menggunakan alat *test strip* (*Easy Touch®*) pada semua kelompok uji. Sampel darah diambil dari ujung ekor mencit, kemudian diletakkan pada strip dan dibaca hasilnya pada alat. Pengukuran kadar gula darah dilakukan sebanyak 3 kali, yakni pada kondisi normal sebelum mencit diinduksi aloksan (T_0), 5 hari pasca induksi aloksan (T_1), dan 14 hari setelah pemberian ekstrak (T_2).

12. Preparasi sampel dan pewarnaan preparat

Pada hari ke 15, mencit dikorbankan dengan metode dislokasi leher, kemudian organ pankreas mencit diambil dan direndam pada wadah yang berisi formalin. Sampel difiksasi dengan cairan formalin 10% selama 3 sampai 4 jam dan didehidrasi menggunakan aseton selama 2 jam sebanyak 3 kali. Sampel kemudian dibersihkan menggunakan toluen sebanyak 3 kali selama 1 sampai 2 jam. Sampel lalu direndam di paraffin cair pada suhu 600°C selama 2 jam sebanyak 3 kali. Blok paraffin kemudian dicetak dan dipotong dengan mikrotom hingga terbentuk lembaran setebal 2 μm . Lembaran sampel lalu diletakkan pada penangas air pada suhu 300°C dan ditempelkan pada gelas objek, dan dilanjutkan dengan memanaskan sampel selama 1-2 menit pada oven.

Bahan seperti xylol, alkohol konsentrasi 70%, 80%, 90%, alkohol absolut, alkohol asam, hematoksilin, eosin, serta aquades dimasukkan ke dalam *staining jar* dengan $\frac{3}{4}$ volume maksimum. Cawan yang berisi preparat kemudian dimasukkan ke dalam *staining jar* yang berisi alkohol absolut selama 5 menit sebanyak 2 kali. Cawan kemudian dipindahkan ke dalam *staining jar* yang berisi alkohol konsentrasi 90% dan direndam selama 1 menit. Hal yang sama dilakukan juga pada alkohol konsentrasi 80% dan 70%.

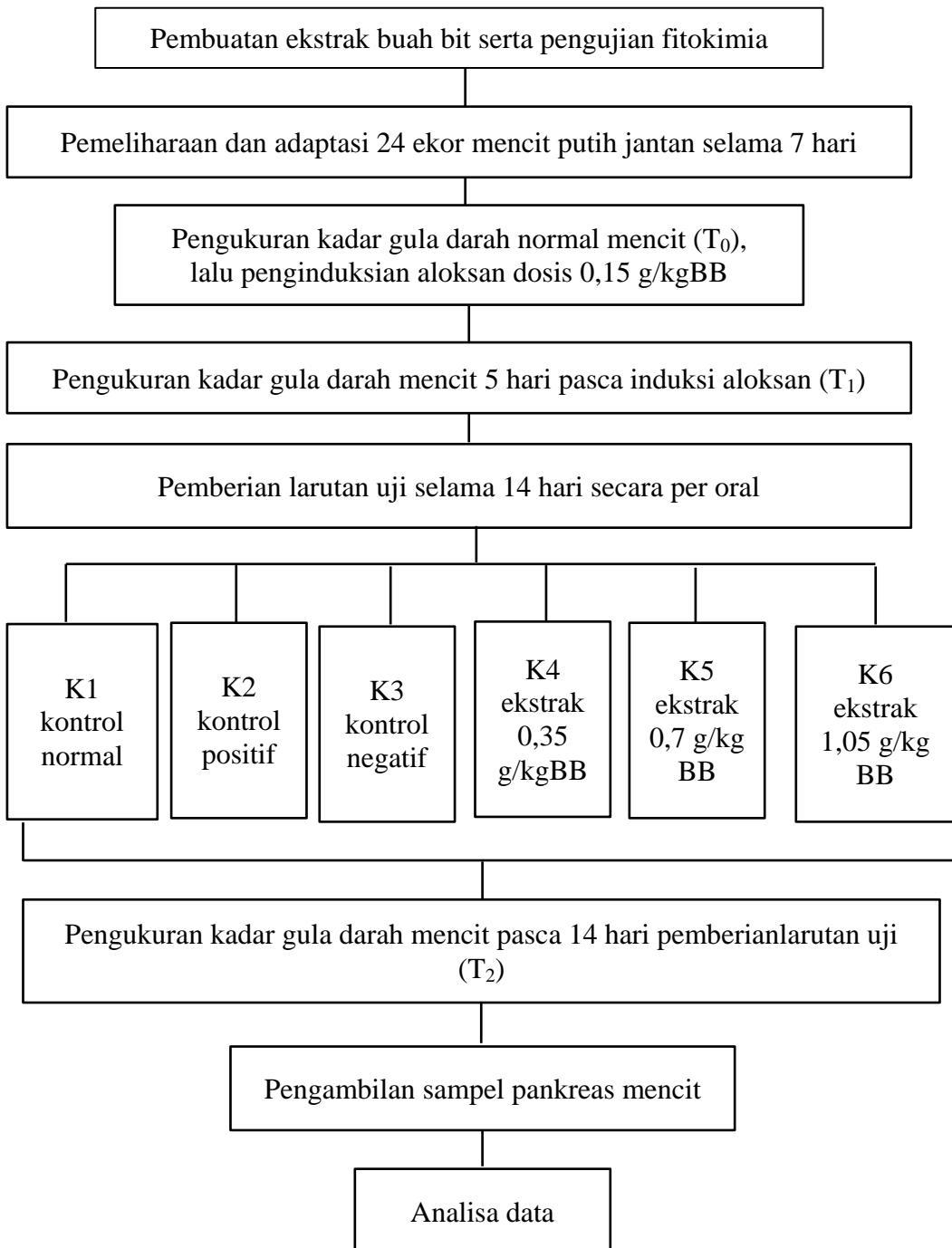
Cawan diambil dan direndam pada *staining jar* yang berisi aquades selama 4 menit. Kemudian, cawan diambil dan direndam kembali ke dalam hematoksilin selama kurang lebih 1 menit. Cawan kemudian direndam dalam *staining jar* yang berisi aquades selama 1 menit sebanyak 3 kali, lalu dipindahkan ke dalam *staining jar* yang berisi alkohol asam dan direndam selama 30 detik. Cawan kemudian direndam pada *staining jar* yang telah dialiri air selama 1 menit, lalu

dilanjutkan dengan perendaman dalam eosin selama 1 menit. Cawan kemudian dipindahkan dan direndam dalam aquades sebanyak 3 kali dengan durasi 1 menit. Kemudian, cawan direndam dalam alkohol secara berurutan mulai dari konsentrasi 70% hingga alkohol absolut selama 1 menit, dan dilanjutkan dengan xylol selama 3 menit sebanyak 2 kali. Preparat kemudian diamati di bawah mikroskop. Pengamatan yang dilakukan meliputi perhitungan jumlah sel yang mengalami nekrosis, piknosis, karioreksis, dan kariolisis (Baqarizky, 2015).

13. Analisis data

Pengujian dilakukan menggunakan SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) versi 20. Data penelitian berupa selisih penurunan kadar gula darah mencit serta gambaran kerusakan sel β pankreas. Data kadar gula darah mencit dan jumlah kerusakan sel pada pankreas akan diuji normalitas dan homogenitasnya menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan *Levene test*. Data yang terdistribusi normal dan homogen ($p>0,05$) dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc* untuk mengetahui dosis efektifnya. Jika data yang didapatkan tidak normal ($p<0,05$), maka uji *One Way Anova* diganti dengan uji non parametrik *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan menggunakan uji *Mann-Whitney*.

E. Alur Penelitian



Gambar 6. Alur jalannya penelitian