

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang bajakah kalalawit (*Uncaria gambir Roxb*) yang diperoleh dari Kuala Kurun, Palangkaraya, Kalimantan Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang bajakah yang telah dipisahkan dari kulitnya.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama adalah ekstrak dari batang bajakah kalalawit (*Uncaria gambir Roxb*) yang diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Variabel kedua adalah penurunan kadar glukosa darah. Variabel ketiga dalam penelitian ini adalah scoring nekrosis sel pankreas pada tikus yang diinduksi aloksan.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama merupakan identifikasi dari semua. Variabel utama yang akan diidentifikasi antara lain, variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol batang bajakah kalalawit dalam berbagai dosis.

Variabel tergantung adalah variabel penelitian yang diukur untuk mengetahui besarnya efek atau pengaruh variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar glukosa darah dan perbaikan profil histopatologi sel pankreas tikus yang diinduksi aloksan.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah kondisi fisik dari hewan uji yang meliputi : jenis kelamin tikus, umur tikus, berat badan tikus, makan dan minum tikus, kebersihan kandang tikus, kondisi fisik peneliti, dan pemberian pakan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, batang bajakah adalah batang yang berwarna coklat, dengan permukaan kulit luar yang tebal dan kasar, ukuran batang yang kecil, dan dipercaya dapat menurunkan kadar gula darah oleh masyarakat Kalimantan Tengah.

Kedua, serbuk batang bajakah adalah serbuk yang diperoleh dengan mengeringkan batang bajakah kalalawit kemudian digiling di mesin penggiling hingga menjadi serbuk serta pengayakan serbuk batang bajakah kalalawit.

Ketiga, ekstrak etanol batang bajakah kalalawit adalah ekstrak yang diperoleh dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, lalu dipekatkan menggunakan mesin rotary evaporator hingga didapat ekstrak kental bajakah.

Keempat, kadar glukosa adalah kadar gula hewan uji yang diukur menggunakan glukometer sebelum dan sesudah perlakuan dengan ekstrak batang bajakah kalalawit sebelum dipuasakan selama 12 jam. Dilakukan perbandingan kadar glukosa dalam darah ini memiliki makna sebagai analisa statistik.

Kelima, hiperglikemia adalah kadar glukosa darah yang diukur setelah pemberian induksi aloksan dengan kadar glukosa darah lebih dari 200mg/dL dan berbeda makna dengan kadar glukosa darah sebelum dilakukan penginduksian.

Keenam, hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan yang seragam.

Ketujuh, dosis efektif adalah dosis terkecil yang memberikan efek penurunan kadar glukosa pada tikus dengan parameter berat badan tikus dan penurunan kadar glukosa darah pada tikus yang berbeda makna terhadap kontrol negatif dan sebanding dengan kontrol positif .

Kedelapan, berat badan yang diamati ialah berat badan hewan uji akibat efek dari penurunan kadar glukosa darah tikus putih jantan hiperglikemia.

Kesembilan, Nekrosis sel pankreas adalah kondisi di mana sel-sel dalam pankreas mengalami kematian yang diamati dari jumlah skoring nekrosis.

C. Alat, Bahan dan Hewan Uji

1. Alat

Alat yang digunakan adalah timbangan analitik, *glucometer easy toch* dan *tes strip*, kertas saring, kain flannel, beaker gelas, tabung

reaksi, Erlenmeyer, batang pengaduk, ayakan no 40, vacuum rotary evaporator, *moisture balance*, jarum suntik oral, pipet tetes. Alat perlakuan tikus meliputi kandang tikus, wadah makanan dan minuman. Alat untuk pengujian histopatologi antara lain alat bedah (pinset, scalpel, meja, pisau/gunting) object glass, deg glass, pot salep, mikrotom putar (rotary microtome), counter dan mikroskop cahaya.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah batang bajakah kalalawit, etanol 96%, tablet glibenklamid, CMC 0,5%, aloksan, HCL pekat, serbuk Mg, FeCl₃, FeCl₃ 5%, akuades, alkohol, xylol, parafin, hematoxilin dan eosin (HE) Toluene.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar berumur 2-3 bulan dengan berat badan berkisar 180-200 gram sebanyak 25 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi batang bajakah kalalawit

Pada penelitian ini, tahap awal yang dilakukan yaitu melakukan determinasi batang bajakah kalalawit. Tujuan dilakukannya determinasi ialah menetapkan kebenaran sampel yang hendak digunakan dalam penelitian. Determinasi batang bajakah kalalawit ini dilakukan di Lab Universitas Setia Budi

2. Pengambilan bahan

Bahan yang digunakan adalah batang bajakah kalalawit yang diambil dari Kuala Kurun, Palangkaraya Kalimantan Tengah.

3. Pembuatan serbuk bajakah kalalawit

Batang Bajakah kalalawit yang diperoleh dari Kuala Kurun, Palangkaraya, Kalimantan Tengah, disortasi basah dan dicuci dengan air mengalir. Sampel diserut menggunakan khatam kayu, dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C, kemudian digiling dan dihaluskan menggunakan mesin penggiling dan blender, dan diayak dengan saringan no 40 hingga diperoleh serbuk batang bajakah kalalawit yang diinginkan.

4. Penetapan kadar air serbuk batang bajakah kalalawit

Penetapan kadar air bertujuan untuk memberikan Batasan minimal serta rentang mengenai besarnya kandungan air didalam

simplisia. Pengujian kadar air menggunakan metode destilasi toluene. Dibersihkan tabung penerima maupun tabung pendingin memakai asam pencuci dan dibilas dengan air lalu dikeringkan. Menimbang sampel yang akan mengandung 1-4 ml air (20 gram) dan masukkan kedalam labu kering. Tambahkan toluene jenuh air sebanyak 200 mL ke dalam labu dan rangkain alat destilasi.

Pemanasan dilakukan dengan hati-hati dan dihentikan jika sudah tidak ada air yang menetes lagi, air yang tertampung dapat diukur dengan volum dan membaca skala yang terdapat pada tabung penampung yaitu tabung *sterling bidwell* (FHI, 2017) Persen kadar air dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume air yang terdestilasi}}{\text{Berat bahan awal}} \times 100\%$$

5. Penetapan susut pengeringan simplisia batang bajakah kalalawit

Penetapan susut pengering adalah pengurangan berat bahan setelah dikeringkan. Simplisia yang digunakan harus dalam bentuk serbuk dengan derajat halus nomor 8, suhu pengeringan 105°C prosedur kerja susut pengeringan dilakukan dengan menggunakan *moisture balance*. Masukkan neraca timbang dengan posisi 0,00 setelah itu masukkan serbuk batang bajakah kalalawit ke atas neraca timbang sebanyak 2 gram, kemudian tutup dan tunggu sampai alat berbunyi yang menandakan jika analisis telah selesai. Syarat serbuk memenuhi persyaratan yaitu tidak boleh lebih dari 10% (Kemenkes RI, 2017).

6. Pembuatan ekstrak etanol batang bajakah kalalawit

Ekstrak etanol batang bajakah dibuat dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10. Rendam serbuk selama 6 jam pertama sambil sekali-kali diaduk kemudian didiamkan lagi selama 18 jam. Maserat dipisah dengan cara disaring dengan kain flanel dan kertas saring. Proses penyarian diulangi sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis dan jumlah pelarut setengah kalinya. Semua maserat dikumpulkan, kemudian dilakukan pemisahan dari pelarutnya dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C, selanjutnya diuapkan dengan menggunakan oven pada suhu 40-45°C. Rendemen yang diperoleh dihitung persentasi bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan (Kemenkes RI, 2017).

7. Penetapan kadar air ekstrak etanol batang bajakah kalalawit

Penetapan kadar air ekstrak etanol batang bajakah kalalawit menggunakan metode gravimetri yaitu dengan menimbang sampel 10 gram kemudian dimasukkan kedalam krush yang sebelumnya telah ditara dan dipanaskan pada suhu 105°C . Sampel yang berada dalam krush kemudian dimasukkan dalam oven dengan membuka tutupnya, keringkan pada suhu 105°C selama 5 jam, kemudian didinginkan dalam desikator dalam keadaan tertutup, setelah itu ditimbang Kembali dan dilakukan pemanasan ulang pada oven dengan suhu 105°C selama 1 jam berturut-turut hingga mendapat bobot konstan. Susut pengering dapat diartikan sebagai pengurangan berat bahan sampel setelah dikeringkan dengan cara tertentu yang telah diterapkan (FHI, 2017)

8. Identifikasi kandungan senyawa

8.1. Identifikasi flavonoid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak etanol batang bajakah dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan etanol 5 ml lalu dipanaskan selama 5 menit dalam tabung reaksi. Kemudian larutan ditambahkan asam klorida (HCl) pekat 10 tetes. Setelah itu tambahkan serbuk magnesium (Mg) 0,2 gram. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna menjadi merah (Anshari, 2012).

8.2. Identifikasi saponin. 10 ml air panas didinginkan dalam tabung reaksi, menambahkan sebanyak 0,5 gram ekstrak etanol batang bajakah lalu dikocok dengan kuat selama kurang lebih 10 detik. Reaksi positif ditunjukkan terbentuknya buih yang stabil selama kurang lebih 10 menit setinggi 1-10 cm. Jika ditambah HCl buih tidak hilang .

8.3. Identifikasi tanin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak etanol batang bajakah dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan air panas 10 ml. Kemudian larutan ditetesi dengan besi (III) klorida (FeCl₃). Hasil positif ditandai perubahan warna menjadi hijau kehitaman (Anshari, 2012).

8.4. Identifikasi fenolik. Memasukkan sebanyak 0,5 gram ekstrak etanol batang bajakah ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan reagen FeCl₃ 5%. Terbentuknya warna biru sampai kehitaman menandakan positif fenolik.(Suryani *et al*, 2017).

9. Penentuan dosis

9.1. Dosis Glibenklamid. Dosis glibenklamid dihitung dari dosis lazim yang dikonversi ke tikus. Faktor konversi manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus 200 g adalah 0,018. Dosis terapeutik

glibenclamide untuk manusia adalah 5 mg per 70 kg berat badan manusia. Jadi, jika diubah menjadi 200 g berat badan tikus, $5 \text{ mg} \times 0,018 = 0,09 \text{ mg}/200 \text{ g}$ berat badan tikus, atau 0,45 mg/kg berat badan tikus.

9.2. Dosis aloksan. Dosis aloksan yang diberikan untuk membuat tikus hiperglikemia adalah sebesar 150 mg/kg BB tikus (Kumalasari *et al*, 2019)

9.3. Dosis ekstrak etanol bajakah. Dosis ekstrak etanol batang bajakah yang digunakan dalam penelitian yaitu 1,8mg/KgBB tikus, 3,6mg/KgBB tikus dan 7,2mg/KgBB tikus.

10. Pembuatan sediaan uji

10.1. Glibenklamid 0,005 %. Suspensi glibenklamid 5mg/100 mL dibuat dengan cara melarutkan 1 tablet glibenklamid 5 mg kedalam 100 ml larutan Na CMC 0,5% lalu aduk ad homogen. Sebagai pembanding (Kontrol Positif).

10.2. CMC Na 0,5%. Ditimbang 500mg CMC Na 0,5% kemudian dimasukkan kedalam mortir hangat dan tambah aquadest hangat sedikit demi sedikit, aduk ad CMC Na mengembang setelah itu masukkan ke dalam labu takar 100 mL dan tambahkan aquadest ad tanda batas.

10.3. Aloksan 10 mg/mL. Larutan aloksan 10 mg/mL adalah larutan yang digunakan sebagai penginduksi diabetes. Larutan aloksan dibuat dengan cara dilarutkan serbuk aloksan sebanyak 1 gram dalam NaCl 0,9% hingga volume 100 mL yang akan diinjeksi secara intraperitoneal dengan dosis 150 mg/kg BB.

10.4. Ekstrak etanol bajakah 0,01%. Menimbang 3400 mg ekstrak batang bajakah kalalawit. Kemudian ditambahkan Na CMC 0,5% sedikit demi sedikit aduk ad homogen.

10.5. Ekstrak etanol bajakah 0,05%. Menimbang 16416 mg ekstrak batang bajakah kalalawit. Kemudian ditambahkan Na CMC 0,5% sedikit demi sedikit aduk ad homogen.

11. Perlakuan hewan uji

25 ekor hewan uji berumur 2-3 bulan dengan berat 180 200 gram dikandangkan pada suhu ruang, diberi pakan berupa pelet, dan diberi air ad libitum. Pembiasaan hewan uji dengan memeliharanya dalam kondisi uji selama 5 hari. Hewan uji dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus dengan perlakuan yang berbeda sebagai berikut.

- Kelompok 1 : Kelompok normal tanpa perlakuan
 Kelompok II : Kontrol negatif. Tikus diberikan CMC 0,5%.
 Kelompok III : Kontrol positif. Tikus diberikan glibenklamid 0,09 mg/kg BB.
 Kelompok IV : Kelompok perlakuan I. Tikus diberikan ekstrak etanol bajakah dengan dosis 1,8 mg/kg BB selama 14 hari.
 Kelompok V : Kelompok perlakuan II. Tikus diberikan ekstrak etanol bajakah dengan dosis 3,6 mg/kg BB selama 14 hari.
 Kelompok VI : Kelompok perlakuan III. Tikus diberikan ekstrak etanol bajakah dengan dosis 7,2 mg/kg BB selama 14 hari.

12. Prosedur uji diabetes aloksan

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan berumur 2-3 bulan dengan kisaran berat badan 180-200 g. Tikus dibagi menjadi lima kelompok dan dipuasakan selama 18 jam kemudian tiap kelompok tikus ditimbang berat badannya. Hari pertama sebelum tikus diberikan perlakuan, dilakukan pengambilan darah yang bertujuan untuk mengetahui kadar glukosa awal (T_0), selain itu pada hari yang sama juga diberikan larutan aloksan monohidrat 150 mg/kg BB tikus secara intraperitoneal. Setelah 5 hari diinduksi dengan larutan aloksan, setiap hewan uji dengan kadar gula darah > 200 mg/dL dikelompokkan dan diambil darahnya kembali untuk mengetahui kadar glukosa darah (T_1).

Pengambilan darah dilakukan pada ekor tikus menggunakan alat glukometer. Masing-masing kelompok diberikan suspensi CMC Na 0,5% (kelompok 2 : kontrol negatif), suspensi glibenklamid 0,45 mg/kg BB tikus (kelompok 3 : kontrol positif), suspensi ekstrak etanol bajakah dosis 1,8 mg/kg BB (kelompok 4), suspensi ekstrak etanol bajakah dosis 3,6 mg/kg BB tikus (kelompok 5), suspensi ekstrak etanol bajakah dosis 7,2 mg/Kg BB tikus (kelompok 6) setiap hari pada pagi hari selama 14 hari, kecuali kelompok normal yang hanya diberikan pakan dan minum ad libitum (kelompok 1).

13. Pengukuran kadar gula darah

Pada penelitian ini dilakukan 3 kali pengukuran konsentrasi glukosa darah tikus, yang meliputi :

- T_0 : Sebelum tikus diinduksi aloksan.
 T_1 : Setelah 5 hari diinduksi aloksan, tikus yang mengalami diabetes ditandai dengan kondisi hiperglikemia dan kadar gula darah > 200 mg/dL.

T2 : Hari ke-12 (7 hari setelah induksi aloksan dan diberikan ekstrak bajakah).

T3 : Hari ke-19 setelah diinduksi ekstrak bajakah

Pemeriksaan glikemik menggunakan tes strip ditempatkan pada alat dan darah ditetaskan ke zona sampel hingga berbunyi klik dan hasilnya ditampilkan di layar dalam waktu 10 detik. Hasil yang dihasilkan dicatat dan strip dikeluarkan dari perangkat. Hasil dibaca dalam mg/dL. Kode dan tanda pengumpulan darah secara otomatis ditampilkan di layar alat glukosa darah.

14. Penyiapan preparat jaringan pankreas

Pertama, mengambil pankreas tikus dan dimasukkan kedalam pot plastik. Kemudian dilakukan fiksasi dengan menggunakan formalin 10% yang bertujuan supaya preparat yang akan digunakan tidak mengalami kerusakan kemudian diberi tanda sesuai dengan kelompok perlakuan. Proses pembedahan pada bagian pankreas yang sudah melewati proses diseksi dimasukkan kedalam *tissue cassette* dan dilakukan pencucian dalam air mengalir selama 30 menit.

Kedua, proses penarikan cairan yang terdapat pada bagian jaringan atau disebut dengan dehidrasi. Jaringan pankreas yang telah dimasukkan kedalam *tissue cassette* kemudian direndam dalam etanol bertingkat dan berturut dari konsentrasi 70%, 80% dan 90% proses perendaman dalam 1 jam untuk masing-masing konsentrasi.

Ketiga, tahap penjernihan (*clearing*) yaitu menggunakan larutan xylene untuk menghilangkan sisa alkohol dalam proses dealkoholasi. Prosesnya dengan memasukkan bagian jaringan pankreas kedalam xylene selama 20 menit.

Keempat, proses infiltrasi paraffin. Dimana bagian organ pankreas yang sudah disiapkan dimasukkan kedalam paraffin panas untuk memperoleh jaringan yang keras serta mudah untuk dilakukan pembedahan dengan mikrotom. Tahap pertama masukkan jaringan ke paraffin 1, paraffin 2 dan paraffin 3 masing-masing 1 jam dalam suhu 60°C.

Kelima, penanaman jaringan atau *embedding* menggunakan paraffin yaitu masukkan bagian jaringan ke blok paraffin, pembedahan dilakukan dengan mikrotom untuk memberikan hasil pada bagian lapisan dengan tebal 5mm, lapisan jaringan diletakkan pada bagian atas kaca objek untuk dilakukan proses pewarnaan.

Keenam, pewarnaan dilakukan dengan *hematoxylin eosin*. Proses tahapan ini dimulai dengan tahap deparafinasi dengan menggunakan xylen untuk menghilangkan paraffin yang masih melekat dibagian jaringan dengan memasukkan bagian jaringan kedalam xylen 1, xylen 2 dan xylen 3 dalam waktu 3 menit terhadap pengujian.

Ketujuh, proses mengembalikan bagian cairan kedalam jaringan dengan menggunakan larutan etanol atau bisa disebut dengan rehidrasi. Proses ini dilakukan dengan memasukkan jaringan ke dalam bagian etanol dimulai dari bagian absolut 1 dan absolut 2 selama 3 menit, jaringan dimasukkan kedalam etanol 80% dan 70% secara bergantian dengan waktu masing-masing 3 menit.

Kedelapan, tahap pewarnaan dengan memasukkan bagian jaringan kedalam larutan yang berisi pewarna *hematoxylin* selama 10-20 menit, kemudian dilakukan proses pengamatan sampai terbentuk warna ungu. Jaringan yang sudah diwarnai tersebut selanjutnya dilakukan proses pencucian dengan air mengalir dalam waktu 10 menit, pewarnaan dilanjutkan dengan memasukkan sediaan yang sudah diproses tadi kedalam pewarna eosin dalam waktu 10 menit.

Kesembilan, proses menarik air dari jaringan agar tetap awet serta tidak cepat rusak atau bisa disebut dengan dehidrasi, yaitu dimana pada jaringan dicelupkan sebanyak 4 kali secara berurutan yang dimulai dari 70%, 80% dan 90% masing-masing selama 30 detik. Kemudian dicelupkan Kembali ke dalam etanol sebanyak 4 kali selama waktu 1 menit.

Kesepuluh, proses penjernihan dengan cara memasukkan bagian jaringan yang sudah disiapkan kedalam larutan xylene 1 dan proses penutupan sediaan dengan penggunaan gelatin sebagai perekat dan ditutup dengan *deck glass* (Lerebulan, 2014)

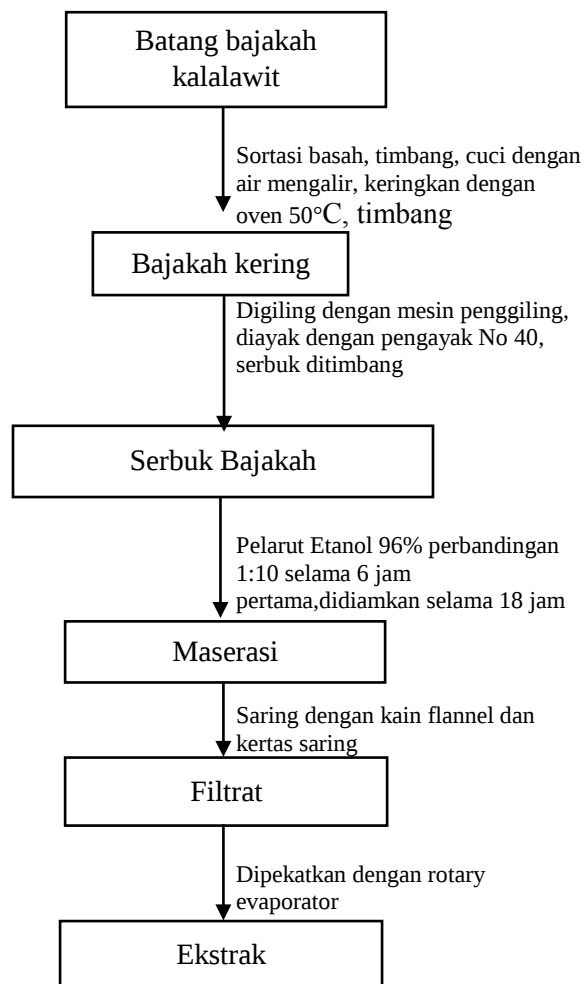
15. Tahap pembacaan sampel

Pembacaan sampel dilakukan untuk mengamati letak kerusakan pada jaringan dan melihat apakah terjadinya nekrosis sel serta mengamati skor nekrosis Skor 0 (Tidak ada nekrosis sel), 1 (1/4 total nekrosis sel pankreas), 2 (1/2 total nekrosis sel pankreas) 3 (3/4 nekrosis sel pankreas) 4 (Seluruh sel pankreas). Preparat difoto dengan menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX41 dengan perbesaran 100x untuk mengevaluasi efektivitas sediaan uji sebagai antihiperglikemi dalam meregenerasi sel pankreas.

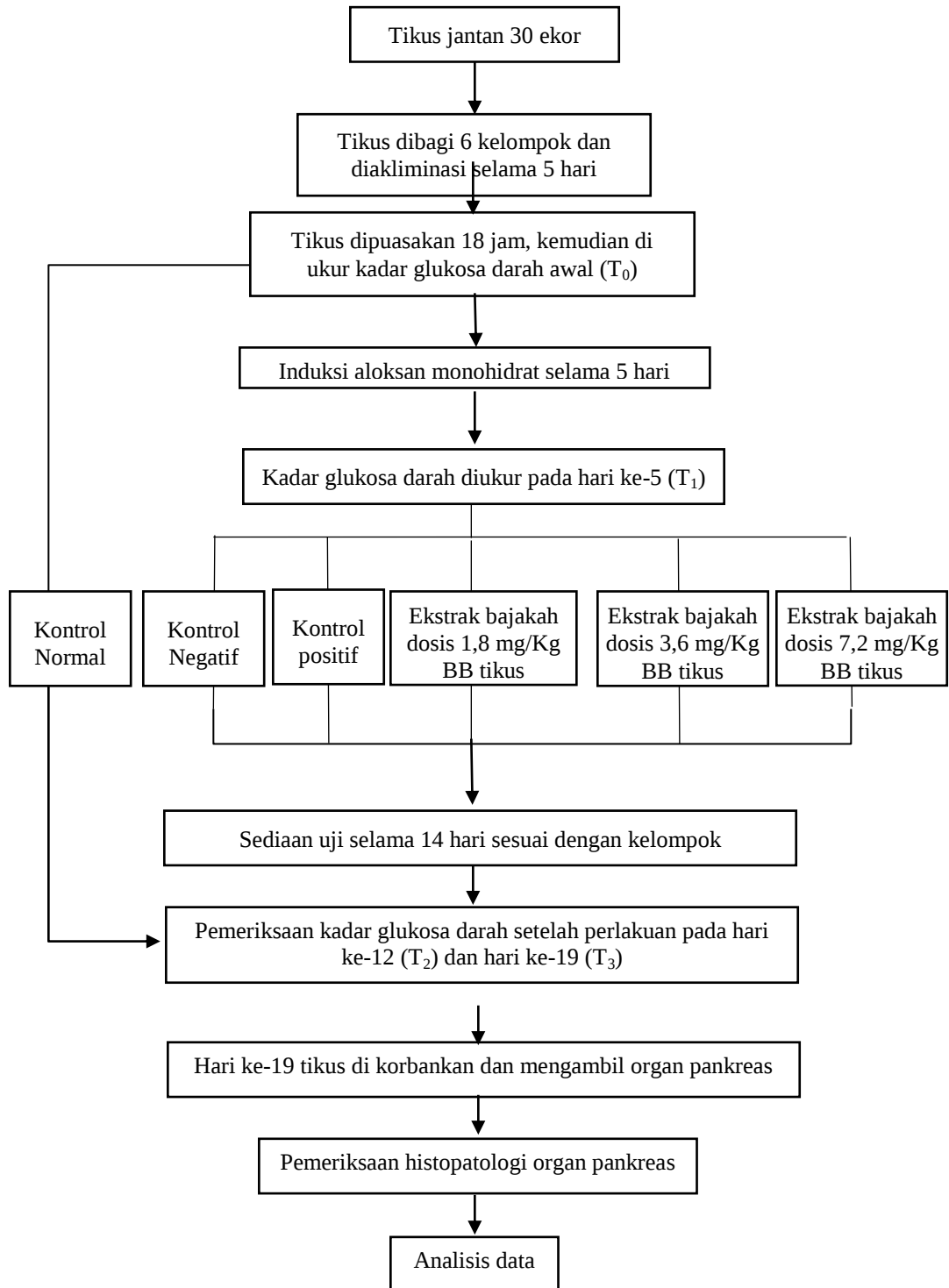
E. Analisis Hasil

Menganalisis hasil, secara statistik melakukan uji distribusi normal (Saphiro-Wilk) dan uji homogenitas (Lavene) membantu menentukan apakah data terdistribusi normal dan homogen. Jika data berdistribusi normal dan homogen (Sig. > 0,05), dilanjutkan dengan uji parametrik (ANOVA). Jika data tidak normal dan homogen (Sig. < 0,05), dilanjutkan dengan uji nonparametrik (Kruskal-Wallis). Studi dilanjutkan dengan studi post hoc untuk memastikan apakah ada perbedaan antara masing-masing kelompok perlakuan.

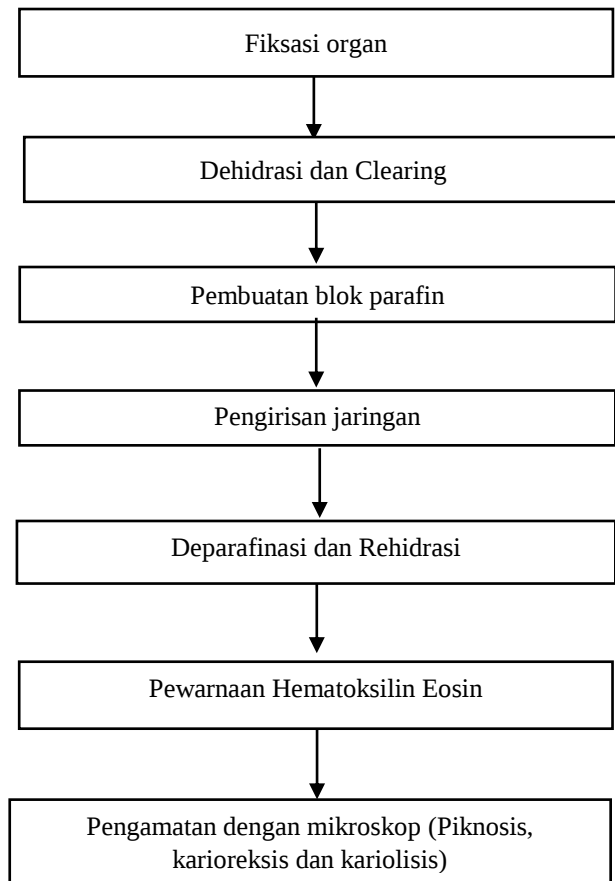
F. Skema Penelitian



Gambar 4. Skema pembuatan ekstrak



Gambar 5. Skema prosedur uji aktivitas antihiperglikemi



Gambar 6. Skema prosedur uji histopatologi organ pankreas