

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi merupakan seluruh objek yang dijadikan sumber penentuan sampel. Penelitian ini menggunakan populasi tumbuhan bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) yang diambil dari Kelurahan Jendi, Kec. Selogiri, Kab. Wonogiri pada bulan Agustus tahun 2022.

2. Sampel

Sampel merupakan pemaparan dari populasi yang menjadi sumber informasi yang dibutuhkan sebagai jawaban permasalahan penelitian. Sampel yang dipakai adalah daun dari tumbuhan bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) yang dipilih secara acak dengan persyaratan daun yang tidak rusak, segar, bebas hama, dan sudah berbunga.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pada penelitian berikut adalah ekstrak etanol daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) yang dihasilkan dari ekstraksi maserasi menggunakan etanol 70%. Variabel utama kedua pada riset ini adalah aktivitas antihiperlikemik dan antioksidan ekstrak daun bandotan pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar yang dilakukan induksi dengan aloksan.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang sudah dilakukan identifikasi bisa mulai digolongkan kedalam beberapa jenis variabel yakni variabel bebas, tergantung, serta terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang telah dirubah terlebih dahulu sebelum dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruhnya pada variabel tergantung. Variabel bebas dalam hal ini adalah dosis ekstrak etanol daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) dalam tiga variasi dosis yaitu $\frac{1}{2}x$ dosis, $1x$ dosis, dan $2x$ dosis.

Variabel tergantung adalah variabel yang diakibatkan oleh variabel utama. Variabel tergantung yang dimaksud pada penelitian berikut adalah aktivitas antihiperlikemik dan antioksidan ekstrak etanol daun bandotan berupa penurunan kadar MDA pada hewan uji

setelah diberi perkaluan. Perlakuan diberikan setelah tikus diinduksi aloksan dan dibuat mengalami hiperglikemia (kadar gula darah >200 mg/dL), kemudian diberi ekstrak etanol daun bandotan dosis bertingkat sebagai kelompok pengujian.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang berpengaruh terhadap variabel terikat, sehingga diperlukan kualifikasi supaya informasi yang dihasilkan akurat dan tidak meluas. Variabel terkontrol yang dimaksud adalah kondisi fisik hewan uji yang terdiri atas bobot tubuh, umur, jenis kelamin, kondisi laboratorium, galur, serta praktikan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun bandotan adalah daun yang bersumber dari tumbuhan *Ageratum conyzoides* L. dengan kondisi yang segar, tidak rusak, bebas hama, dan sudah berbunga yang diperoleh dari Kelurahan Jendi, Kec. Selogiri, Kab. Wonogiri.

Kedua, serbuk daun bandotan adalah serbuk yang dihasilkan dari simplisia daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) yang diambil saat kondisi bersih, kering, dan tidak rusak yang di buat serbuk menggunakan alat penghalus (*bender*) dan diayak pada ayakan no. 40 hingga didapatkan serbuk yang halus.

Ketiga, ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) adalah hasil ekstraksi maserasi serbuk daun bandotan dengan pelarut etanol 70% dan diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator*.

Keempat, tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah tikus putih galur Wistar jantan berusia 3-4 bulan dan bobotnya 150-200 gram yang didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kelima, aloksan adalah bahan yang diberi secara intraperitoneal menggunakan dosis 150 mg/kg bobot tubuh untuk merusak sel beta di pankreas, mengganggu fungsi penghasil insulin, menyebabkan diabetes pada hewan laboratorium.

Keenam, kadar glukosa darah adalah darah yang diperoleh dari vena lateral tikus putih jantan wistar yang diukur menggunakan glukometer.

Ketujuh, kadar malonaldehid darah adalah darah yang dipilih dari vena mata pada tikus serta diambil plasmanya kemudian diukur dengan alat Kit ELISA MDA.

Kedelapan, dosis efektif adalah dosis terkecil yang memberikan

aktifitas antihiperlikemik dan antioksidan yang sebanding dengan kontrol positif.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan yang diperlukan yaitu corong kaca, gelas ukur, kain flannel, gelas beker, seperangkat peralatan glukometer, botol berwarna gelap, seperangkat alat sentrifugasi, tabung vaculab, pipa kapiler, pipet tetes, spoit, sonde, timbangan tikus, timbangan analitik, *moisture balance*, peralatan gelas, oven, *vacum rotary evaporator*, *blender*, ayakan nomor 40 dan kit ELISA MDA.

2. Bahan

Bahan-bahan yang dipakai pada penelitian berikut yaitu pelat silika gel 60 F254, reagen identifikasi senyawa, aquadest, aloksan, daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.), EDTA, etanol 70%, NaCl, NaCMC, dan tablet Glibenclamid 5 mg.

3. Hewan uji

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) galur Wistar berkelamin jantan, umur 3-4 bulan berbobot 150-200 gram dan sehat.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengajuan *Ethical Clearance*

Penggunaan tikus menjadi hewan percobaan di laboratorium diharapkan memenuhi kaidah-kaidah kesejahteraan hewan percobaan. Sebagai pemenuhan syarat penggunaan hewan uji pada riset yang akan dilakukan, maka diperlukan persetujuan dari komite etik dengan dikeluarkannya surat *Ethical Clearance*. *Ethical Clearance* diajukan pada komisi etik yang berada di RSUD Dr. Moewardi Surakarta dengan mengisi formulir pengajuan dan menyerahkan dokumen rencana penelitian. Pengurusan surat *Ethical Clearance* dilakukan pada bulan September 2022.

2. Determinasi tanaman

Pada penelitian ini, identifikasi tanaman dilakukan pada tahap awal, bertujuan untuk mengetahui sampel tanaman yang digunakan sesuai dengan keaslian tanaman yang diharapkan yaitu tumbuhan bandotana (*Ageratum conyzoides* L.) berdasarkan ciri morfologi

tanaman. Tanaman diperiksa menggunakan ketetapan determinasi dengan melampirkan surat hasil laboratorium. Determinasi dijalankan di Balai Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

3. Pengumpulan sampel

Daun bandotan yang dibutuhkan diambil di Kelurahan Jendi, Kec. Selogiri, Kab. Wonogiri. Pengumpulan sampel secara acak dengan keadaan tumbuhan segar, tidak rusak, dan bebas dari hama. Pengumpulan sampel dilakukan pada bulan Agustus tahun 2022.

4. Pembuatan serbuk

Setelah dilakukan pengumpulan daun bandotan lalu dilakukan sortasi basah dan dilakukan pencucian. Tahap berikutnya dilakukan perajangan, setelah itu dikeringkan di bawah sinar matahari dan tertutup kain hitam hingga didapatkan daun yang kering (Cahyanto, 2021). Daun yang telah mengering selanjutnya dibentuk serbuk menggunakan cara diserbukkan menggunakan alat penghalus (*blender*) dan diayak pada ayakan no. 40 (FHI, 2017).

4.1. Penetapan rendemen serbuk. Rendemen dihitung sesuai bobot akhir dibanding bobot awal dikalikan 100% baik pada serbuk (Martinus & Verawati, 2016).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot simplisia kering (g)}}{\text{bobot serbuk (g)}} \times 100\%$$

Persentase rendemen yang diperoleh sebisa mungkin tidak lebih rendah dari persen minimal rendemen yang di persyaratkan dalam monografi Farmakope Herbal Indonesia (FHI) tahun 2017.

4.2. Penetapan susut pengeringan serbuk . Sejumlah 2 gram serbuk diukur kehilangan senyawa yang menguap atau hilang dan bobot serbuk daun bandotan menggunakan alat *moisture balance* yang diatur suhunya pada 105°C selama 2 menit, direplikasi 3 kali selanjutnya dilakukan perhitungan persen susut pengeringan (FHI, 2017).

5. Pembuatan ekstrak daun bandotan

Ekstrak dibuat dari serbuk daun bandotan memakai metode maserasi yang mengacu pada monografi FHI (2017), dengan cara memasukkan 1 kg serbuk daun bandotan ke dalam botol maserasi dan menambahkan 10 liter pelarut etanol 70%. Direndam selama 2x24 jam dengan sesekali dilakukan penggojogan, kemudian memisahkan maserat

dengan cara filtrasi menggunakan kain flanel. Pada aktivitas penyarian dilakukan remaserasi minimum sekali menggunakan pelarut etanol serta banyaknya pelarut setengah kali volume dari pelarut penyarian awal. Hasil ekstraksi disaring memakai kain flannel dan semua filtrat dilakukan penyaringan ulang memakai kertas saring. Selanjutnya filtrat yang didapatkan dipekatkan memakai alat *rotary evaporator* pada suhu 40°C – 50°C, selanjutnya diuapkan dengan oven bersuhu 40- 50°C sampai menghasilkan ekstrak yang kental.

5.1. Penetapan rendemen ekstrak. Rendemen dihitung sesuai bobot akhir dibanding bobot awal dikalikan 100% baik pada ekstrak (Martinus & Verawati, 2016).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot serbuk (g)}}{\text{bobot ekstrak (g)}} \times 100\%$$

Persentase rendemen yang diperoleh sebisa mungkin tidak lebih rendah dari persen minimal rendemen yang di persyaratkan dalam monografi Farmakope Herbal Indonesia (FHI) tahun 2017.

5.2. Penetapan susut pengeringan ekstrak. Susut pengeringan ekstrak ditetapkan dengan metode gravimetri. Ditimbang sebanyak 10 gram ekstrak dan dimasukkan ke dalam kurs porselin yang sudah ditara (Cahyanto, 2021). Ekstrak disimpan pada oven bersuhu 105°C dalam waktu 5 jam kemudian dipindahkan pada desikator dan dilakukan penimbangan. Penimbangan dan pengeringan dijalankan pada periode 1 jam sampai didapatkan bobot konstan yaitu perbedaan antara dua penimbangan yang tidak melebihi 0,25% (FHI, 2017).

6. Identifikasi kandungan senyawa

Pada proses identifikasi berikut bertujuan untuk mengidentifikasi kebenaran kadar senyawa dalam daun bandotan meliputi senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, serta steroid dan terpenoid (Agbafor *et al.*, 2015).

6.1. Flavonoid. Diambil ekstrak sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dicampur dengan 3 ml etanol 70% dan dikocok, setelah itu dipanaskan lalu dikocok kembali dan disaring. Hasil yang didapat, ditambahkan serbuk Mg 0,1 gram dan 2 tetes HCl pekat. Terlihatnya warna merah bata, atau merah pada lapisan etanol artinya ekstrak mengandung flavonoid (Harborne, 1987).

6.2. Alkaloid. Hasil ekstrak dibasahi dengan reagen amonia

10%, penyarian larutan basa dilakukan menggunakan kloroform, selanjutnya ekstrak dari kloroform ditambahkan HCl 1 N agar menjadi asam. Selanjutnya hasil larutan asam difiltrasi untuk dilakukam uji menggunakan dragendorf. Terbentuknya endapan berwarna jingga kecoklatan menandakan ekstrak daun bandotan secara positif mengandung alkaloid. Endapan putih kekuningan akan terbentuk apabila ditambahkan pereaksi mayer (Harborne, 1987).

6.3. Saponin. Ekstrak sejumlah 0,5 gram diletakkan pada tabung reaksi serta ditambah air panas selanjutnya dikocok dalam waktu 10 detik kemudian ditambahkan 1 tetes HCl 2N. Hasil positif diberikan bila busa terbentuk dalam 10 menit dan tinggi busa 1-10 cm (Depkes RI., 1995).

6.4. Tanin. Sejumlah 0,5 gram ekstrak dimasukkan pada tabung reaksi serta ditambah 10 ml air suling lalu dipanaskan. Setelah dingin, 5 ml FeCl_3 1% (b/v) ditambah pada filtrat. Terbentuknya warna hijau tua atau kebiruan menunjukkan bahwa ekstrak daun bandotan positif memiliki tanin (Harborne, 1987).

6.5. erpenoid dan Steroid. 1 gram ekstrak diletakkan pada tabung reaksi, ditambah 3 ml kloroform serta 2 ml asam sulfat pekat serta 2 ml asam asetat anhidrat. Adanya senyawa steroid yaitu adanya pergantian warna dari ungu menjadi biru kehijauan, dan terbentuk warna coklat menunjukkan adanya terpenoid positif (Harborne, 1987).

6.7. Kromatografi Lapis Tipis. 1 gram serbuk dan 10 ml etanol 95% dihomogenkan dalam penangas air dalam waktu 10 menit. Filtrat ditempatkan dalam labu 10 mL dan pelarut ditambahkan sampai tanda batas volume, lalu ditotolkan pada fase diam dari pelat KLT silika gel GF254 dan baku quercetin (FHI, 2017) dan kemudian dicuci dengan fase gerak yang mengandung n-heksana : etil asetat : metanol : air (3:4.5:2:0,5) sampai tanda batas. Pelat dikeringkan udara dan diamati bercak-bercaknya dengan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm .

7. Penentuan dosis

7.1. Dosis ekstrak daun bandotan. Dasar penghitungan dosis ekstrak etanol daun bandotan yaitu dari penelitian dari Martinus & Verawati, (2016) tentang ekstrak daun bandotan yang memiliki aktivitas penangkap radikal bebas dengan nilai IC_{50} 228,431 $\mu\text{g/ml}$. Dosis penelitian tersebut dikonversikan ke dosis untuk tikus sebagai hewan

percobaan dengan rumus $IC_{100} \times \text{volume darah} \times 5$. Dosis yang diperoleh dikonversikan ke dalam variasi dosis $\frac{1}{2}$ dosis, 1 dosis, dan 2 dosis ekstrak daun bandotan yang digunakan dalam penelitian ini.

7.2. Dosis alokasan monohidrat. Penelitian ini menggunakan aloksan dengan dosis 150 mg/kg BB yang diberikan secara intraperitoneal. Jadi dosis aloksan untuk tikus yang memiliki berat badan 200 gram adalah $150 \text{ mg}/1000 \text{ g} \times 200 \text{ g} = 30 \text{ mg}/200 \text{ g}$ BB tikus. pembuatan larutan stok adalah dengan melarutkan aloksan monohidrat dalam larutan dapar NaCl 0,9% yang sudah dibuat sebelumnya.

7.3. Dosis Glibenclamid. Penelitian ini digunakan obat standar Glibenclamid 5 mg sebagai kontrol positif. Adapun dosis pemakaian Glibenclamid pada manusia (*initial dose*) 5 mg/70 kg BB . Dosis untuk tikus = $5 \text{ mg}/70 \text{ kg BB} \times 0,018 = 0,45 \text{ mg}/\text{kgBB}$. badan 200 gram adalah $200 \text{ gram}/1000 \text{ gram} \times 0,45 \text{ mg} = 0,09 \text{ mg}$.

8. Pembuatan larutan uji

8.1. Larutan dapar NaCl 0,9%. Sebanyak 0,9 gram serbuk NaCl dilarutkan dengan sebagian pelarut, 9%, setelah homogen volumenya dicukupkan hingga 100 ml.

8.2. Larutan aloksan monohidrat 1%. Sebanyak 1 gram aloksan dilarutkan dengan sebagian pelarut NaCl 0,9%, setelah homogen volumenya dicukupkan hingga 100 ml.

8.3. Pembuatan larutan Na-CMC 0,5%. Sebanyak 500 mg Na-CMC ditambahkan kedalam wadah berisi 50 ml aquadest panas dan dibiarkan selama 15 menit sampai massa berwarna bening kemudian diaduk secara konstan sampai terbentuk suspensi yang homogen, kemudian volumenya dicukupkan hingga 100 ml.

8.4. Pembuatan larutan stok Glibenclamid 0,005%. Dosis Glibenclamid untuk orang dewasa adalah 5 mg per hari, jika ketetapan konversi untuk tikus 200 gram adalah 0,018. Maka dosis Glibenclamid untuk tikus sebesar 0,45 mg/kg BB atau 0,09 mg/200 gram BB. Larutan stok Glibenclamid dibuat dengan menimbang serbuk tablet Glibenclamid yang setara dengan 7,5 mg Glibenclamid lalu dilarutkan ke dalam larutan Na CMC 0,5% sebanyak 150 ml.

8.5. Larutan ekstrak etanol daun bandotan, Larutan ekstrak etanol daun bandotan dibuat melarutkan serbuk daun bandotan dengan Na-CMC 0,5% sesuai dosis yang telah ditentukan.

9. Perlakuan hewan uji

Penelitian ini menggunakan tikus putih jantan galur wistar, berumur 3-4 bulan berbobot 150-200 gram. Tikus ditimbang untuk mengetahui berat badannya dan setiap tikus diberikan tanda pengenal, tikus yang dipakai sejumlah 25 ekor yang terbagi dalam 5 kelompok, satu kelompok berisikan 5 ekor tikus. Sebelum perlakuan, tikus diaklimatisasi selama 7 hari dengan diberikan makanan komersial dan air minum secukupnya. Perlakuan dimulai pada hari ke-8 dengan tikus diinduksi dengan aloksan dosis 150 mg/kg BB secara intraperitoneal. Setelah 3 hari pasca induksi darah tikus diambil untuk pengukuran kadar glukosa darah, selanjutnya dilakukan perlakuan selama 14 hari adalah sebagai berikut:

Kelompok I, Kontrol negatif : diinduksi aloksan + larutan CMC 0,5% b/v. Kelompok II, Kontrol positif : diinduksi aloksan + Glibenclamid 0,45 mg/kg BB.

Kelompok III, Kelompok dosis ekstrak 1 : diinduksi aloksan + ekstrak etanoldaun bandotan $\frac{1}{2}$ x dosis (EDB 1).

Kelompok IV, Kelompok dosis ekstrak 2 : diinduksi aloksan + ekstrak etanoldaun bandotan 1x dosis (EDB 2).

Kelompok V, Kelompok dosis ekstrak 3 : diinduksi aloksan + ekstrak etanol daunbandotan 2x dosis (EDB 3).

10. Pengukuran kadar glukosa darah

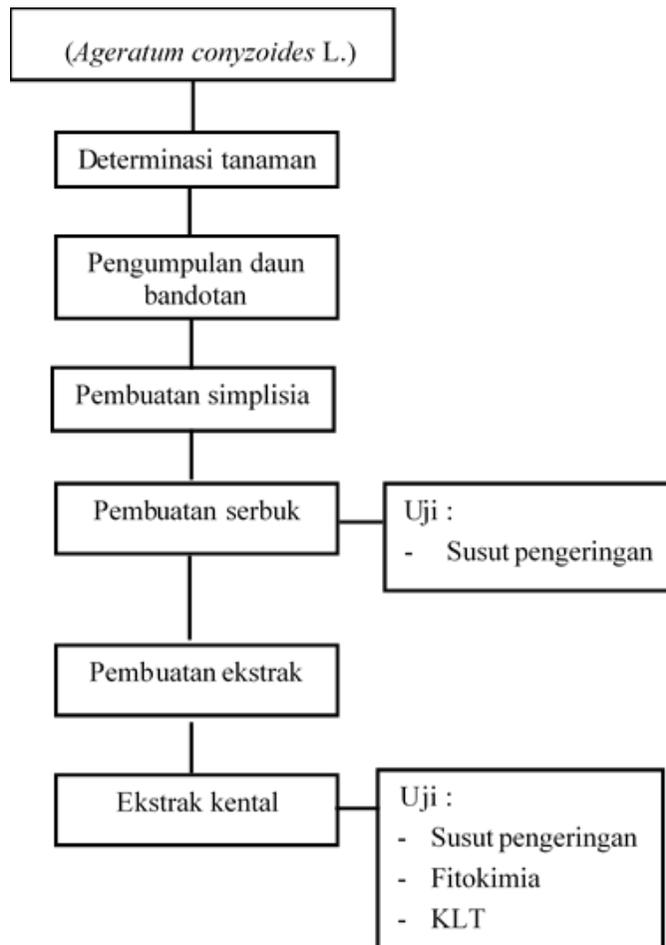
Kadar glukosa darah tikus dilakukan pengukuran sebanyak 3 kali yaitu sebelum diinduksi aloksan (kadar normal), setelah induksi aloksan (untuk melihat tercapainya kondisi hiperglikemik (kadar glukosa >200 mg/dl)), dan setelah perlakuan 14 hari. Tikus dipuasakan semalaman sebelum pengukuran glukosa darah, hal ini bertujuan untuk memastikan bahwa kondisi hiperglikemia yang tercapai disebabkan karena induksi aloksan bukan hasil dari pengaruh makanan yang diberikan. Gula darah tikus diukur dengan glukometer dengan cara menggoreskan darah tikus yang terkumpul pada strip glukometer dan secara otomatis menyerap darah, sehingga hasil pengukuran muncul di layar monitor dalam satuan mg/dl setelah beberapa detik. Alat tersebut bekerja berdasarkan prinsip enzimatik dan bereaksi terutama dengan gula dalam darah. Molekul gula dilakukan oksidasi oleh enzim God (glukosa oksidase) melepaskan elektron diperoleh elektroda, hingga kadar gula sebanding terhadap sinyal elektronik yang didapatkan.

11. Pengukuran kadar MDA

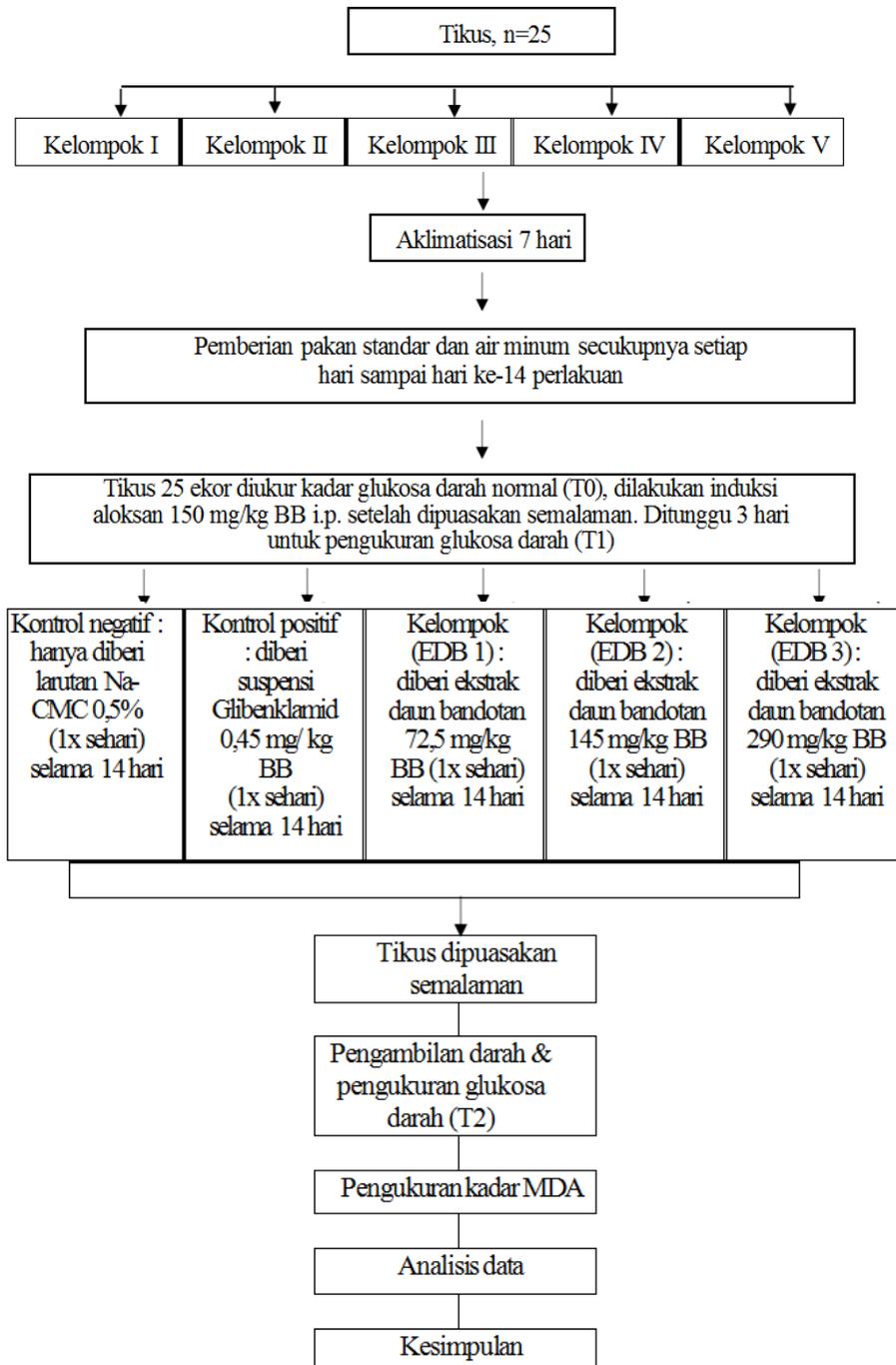
11.1. Pengambilan sampel darah. Tikus dipuasakan semalaman sebelum diambil darahnya agar kandungan dalam sampel darah yang diamati tidak terakumulasi dengan glukosa maupun produk radikal bebas yang berasal dari makanan yang diberikan (Rahman, 2014). Pada hari ke-14 sesudah masa perlakuan, darah tikus diambil dari vena mata. Darah diambil sebanyak 1,5 ml menggunakan Vaculab yang berisi EDTA. Proses mengumpulkan plasma darah dilakukan dengan sentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Plasma yang dipisahkan dikumpulkan dengan mikropipet dan dipasang ke dalam tabung mikro kemudian disiapkan untuk pengukuran kadar MDA plasma (Fitria, 2017).

11.2. Pengukuran kadar MDA. Pengukuran kadar MDA dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret menggunakan kit ELISA MDA. Kurva standar ditetapkan dan diuji kinerja presisi, *recovery*, dan linearitas. Sampel ditempatkan dalam mikrolat dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 450 nm. Absorbansi yang diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan kuadrat untuk menghitung kadar MDA.

E. Alur Penelitian



Gambar 5. Diagram ekstraksi daun bandotan



Gambar 6. Diagram perlakuan hewan uji

F. Analisis Data

Data kadar glukosa dan MDA diuji *Shapiro-wilk* untuk memperoleh normalitas datanya, kemudian dilanjutkan uji statistik *One way Anova* dengan program IBM SPSS 23 Windows. Bila terdapat perbedaan akan diteruskan memakai pengujian LSD (*Least Significant Difference*) untuk memperoleh data kelompok yang berbeda (untuk melihat perbedaan pada setiap kelompok). Penelitian ini akan bermakna bilai nilai $p < 0.05$ dan hipotesis yang menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun bandotan mempunyai kegiatan antihiperlikemik dan antioksidan yang dilihat dari kadar gula darah serta MDA plasma terhadap tikus yang dilakukan induksi aloksan diterima. Namun, jika nilai $p > 0.05$ maka hipotesis tersebut ditolak.