

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi ialah cabe jawa segar yang berasal dari Plaosan, Magetan, Jawa Timur.

2. Sampel

Daun cabe jawa dari Plaosan, Magetan, Jawa Timur dengan sampel yang diambil secara acak dari masyarakat yang membudidayakan pohon cabe jawa segar serta bebas hama.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam studi ini ialah ekstrak daun cabe jawa. Daun cabe jawa yang diekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Variabel kedua studi ini ialah mencit jantan dengan berat ± 20 gram sebagai hewan uji. Variabel ketiga pada studi ini yaitu aktivitas antihiperqlikemi dan gambaran histopatologi ekstrak daun cabe jawa terhadap mencit.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama merupakan identifikasi dari seluruh sampel. Identifikasi variabel utama meliputi variabel tergantung, variabel terkendali serta variabel bebas.

Variabel bebas ialah variabel yang memiliki nilai berubah- ubah guna diteliti dampak yang ditimbulkan kepada variabel tergantung. Variabel bebas yang pada studi ini yaitu dosis ekstrak daun cabai jawa 1,4 mg/kg BB mencit, 2,8 mg/kg BB mencit dan 5,6 mg/kg BB mencit.

Variabel tergantung ialah variabel yang menjadi fokus dalam penelitian. Variabel tergantung dalam studi ini yaitu perubahan kadar gula darah mencit dan gambaran histopatologi pankreas mencit sebelum dan sesudah pemberian terapi.

Variabel terkendali ialah variabel yang dapat berdampak kepada variabel tergantung, maka dapat ditetapkan batasan-batasannya. Variabel terkendali pada studi ini yaitu kondisi fisik dari hewan uji yang mencakup: jenis kelamin, umur, lingkungan hidup, galur, berat badan hewan uji, kondisi laboratorium percobaan, serta peneliti itu sendiri.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun cabe jawa segar didapat dari Plaosan, Magetan, Jawa Timur.

Kedua, serbuk daun cabe jawa adalah serbuk daun cabai jawa yang diperoleh dari hasil penggilingan, pengeringan serta pengayakan daun cabe jawa nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun cabe jawa ialah ekstrak kental yang diperoleh dari hasil ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan memanfaatkan pelarut etanol 70% dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C.

Keempat, kadar gula darah ialah kadar yang diukur dengan menggunakan glukometer sesudah dan sebelum diberikan perlakuan dengan menggunakan ekstrak daun cabai jawa sebelum dipuasakan selama 12 jam. Perbandingan kadar gula darah dijalankan sebagai analisa statistik.

Kelima, hiperglikemia, yaitu kadar gula darah lebih dari 200 mg/dL setelah diinduksi aloksan.

Keenam, mencit jantan yang digunakan untuk pengujian berusia sekitar 2-3 bulan, berat badan sekitar 20 gram, dan menderita penyakit diabetes yang diinduksi dengan aloksan.

Ketujuh, efek yang diamati adalah penurunan kadar gula darah pada mencit jantan yang paling maksimal

Kedelapan, gambaran pankreas tikus jantan yang dilihat melalui histopatologi, khususnya perubahan pulau pankreas pada pankreas hewan uji setelah induksi aloksan.

Kesembilan, dosis efektif ialah dosis terkecil yang memberikan efek penurunan kadar gula darah dan dapat memperbaiki histopatologi pankreas yang sebanding dengan kontrol positif. Variasi dosis efektif daun cabai jawa yang digunakan yaitu 1,4 mg/kg BB mencit, 2,8 mg/kg BB mencit dan 5,6 mg/kg BB mencit.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang dipakai memproduksi ekstrak etanol pada daun cabai jawa adalah gunting, timbangan, wadah pencucian, air kran, pisau, blender, bejana maserasi, kain flanel, *waterbath*, *rotary evaporator*, kembang mencit, spuit injeksi, *glucometer easy touch*, neraca

kelembaban, *Sterling Bidwell*, ayakan no 40 mesh, Beaker glass, gelas ukur, spuit, sonde, mortir, stamper, kain flanel, tabung reaksi.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Adalah daun cabe jawa segar yang didapat dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

2.2 Bahan kimia. Etanol 70% sebagai cairan penyari. Uji penetapan KGD menggunakan metode glukometer. Bahan histopatologi pankreas menggunakan NaCL fisiologis 0,9%, *buffer neutral formalin*, *hematoxylin*, alkohol. Identifikasi kandungan kimia daun cabai jawa digunakan HCl pekat, amil alkohol, FeCl₃ diabetogen digunakan aloksan, CMC-Na 1% dan obat pembanding kontrol glibenklamid.

3. Hewan percobaan

Peneliti menggunakan 30 ekor mencit jantan umur 2-3 bulan. Mencit-mencit tersebut diadaptasikan dalam kandang mencit selama 7 hari dengan berat badan ± 20 gram. Hewan uji dipuaskan selama 12 jam. Puasa dilakukan untuk mencapai kadar glukosa darah puasa yang konsisten. Pada proses pengelompokan, mencit diambil secara acak sebanyak 5 ekor untuk perbagian kelompok.

D. Jalannya Penelitian

1. Uji etik penelitian

Pengajuan uji kelayakan etis (Persetujuan Etis) merupakan langkah pertama dalam proses penelitian ini. Tikus putih jantan, *Mus musculus L.*, digunakan dalam penelitian ini. Dengan tujuan melakukan percobaan terhadap tikus tersebut, Rumah Sakit Daerah Dr. Moewardi Jebres Surakarta Jawa Tengah.

2. Determinasi tanaman

Tahapan selanjutnya yaitu melakukan determinasi daun cabe jawa. Tujuan dilakukannya determinasi guna memastikan kebenaran dari sampel uji pada studi. Determinasi tanaman dijalankan di balai besar penelitian dan pengembangan tanaman obat dan obat tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu.

3. Pengumpulan bahan dan pemrosesan daun cabe jawa

Daun cabe jawa segar dikumpulkan untuk proses pengumpulan bahan. Daun cabai jawa diperoleh dari daerah Plaosan, Magetan, Jawa Timur. Daun cabai jawa dipetik menggunakan gunting. Untuk membersihkannya, daun cabai jawa dicuci dengan air keran yang mengalir. Setelah daun cabai jawa dijemur, langkah selanjutnya adalah

menimbangnya untuk mengetahui perbandingan berat kering dan berat basah. Simplisia yang telah kering diblender hingga menjadi serbuk, kemudian disaring dengan penyaring 40 mesh.

4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun cabe jawa

Penetapan susut pengeringan menggunakan alat *moisture balance* yaitu dengan memasukan 2 gr serbuk dalam pinggan berlapis aluminium foil yang telah ditara terlebih dahulu kemudian diukur kadar susut pengeringannya pada suhu 105°C hingga alat berbunyi dan muncul angka % MC pada display, maka akan didapat persen susut pengeringan (Utami *et al.* 2016).

5. Pembuatan ekstrak daun cabe jawa

Ekstraksi dilakukan dengan maserasi menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Setelah 900 gram bubuk daun cabai jawa kering dimaserasi dalam 6.750 mililiter etanol 70% selama lima hari, lalu disaring. Maserasi ulang selama dua hari pada suhu kamar dengan 2.250 mL etanol 70%, lalu dilakukan proses penyaringan dan filtrat dikumpulkan. Filtrat yang telah terkumpul dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak, dengan sedikit pelarut yang tersisa. Pelarut ekstraksi dipanaskan dalam oven pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental melalui penguapan (Azizah *et al.*, 2019).

6. Penetapan kadar air ekstrak daun cabe jawa

Penentuan kadar air ekstrak ditentukan menggunakan *Sterling Bidwell*. Pelarut yang digunakan yaitu toluen. Jenuhkan toluen 200 mL dengan aquadest 20 mL dan dibiarkan memisah kemudian buang lapisan air. Takar 20 gram ekstrak dan pindahkan ke dalam labu alas bulat. Selanjutnya, masukkan toluen jenuh ke dalam labu dan lanjutkan memanaskan campuran selama 15 menit. Setelah toluena mencapai titik didihnya, laju destilasi diatur sekitar 2 tetes per detik hingga sebagian air telah disuling. Kecepatan distilasi dapat mencapai maksimal 4 tetesan per detik. Proses destilasi dilakukan dengan durasi 5 menit. Kemudian catat volume air yang didapatkan setelah penyulingan. Kandungan udara dalam bubuk berkualitas tinggi tidak boleh melebihi 10% (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017). Kandungan air dalam ekstrak berkualitas tinggi tidak boleh melebihi 10%. Kadar air dalam satuan persen dengan rumus:

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume terbaca}}{\text{Berat bahan}} \times 100\%$$

7. Pemeriksaan organoleptis ekstrak daun cabe jawa

Pemeriksaan organoleptis dijalankan untuk mengamati bau, tekstur, dan warna dari ekstrak daun cabai jawa.

8. Skrining fitokimia ekstrak daun cabe jawa

Skrining fitokimia berguna dalam menentukan senyawa yang terkandung pada ekstrak daun cabai jawa. Skrining fitokimia yang dilakukan merujuk pada metode yang digunakan oleh (Lutfiyati *et al.*, 2017)

8.1 Identifikasi flavonoid. Dalam tabung reaksi, 0,5 gram ekstrak daun cabai jawa dicampur dengan sedikit bubuk magnesium, diaduk hingga tercampur rata, kemudian ditambahkan asam klorida pekat. Jika larutan berubah menjadi jingga, kuning, atau merah, berarti zat kimia flavonoid sedang bekerja (Lutfiyati *et al.*, 2017).

8.2 Identifikasi alkaloid. Setelah menambahkan HCl 2% ke dalam satu tabung reaksi, ekstrak daun cabai Jawa diteteskan ke tabung reaksi lainnya. Dua atau tiga tetes reagen Dragendroff diteteskan ke tabung reaksi pertama. Reagen Dragendroff menyebabkan terbentuknya endapan merah bata, merah tua, atau jingga (Lutfiyati *et al.*, 2017). Tabung kedua ditambahkan 10 tetes H₂SO₄ 2N dikocok kuat, dan ditambahkan reagen wagner. Terbentuknya endapan kecoklatan (pereaksi Wagner) (Mailuhu *et al.*, 2017). Hasil positif menandakan ekstrak daun cabai jawa positif alkaloid

8.3 Identifikasi tannin. Setelah melarutkan ekstrak daun cabai Jawa dalam 20 ml air, dipanaskan hingga mendidih lalu didinginkan. Setelah disaring, tiga hingga lima tetes FeCl₃ 1% ditambahkan ke dalam larutan yang telah didinginkan. Menurut Lutfiyati *et al.* (2017), ketika senyawa tanin hadir, warna coklat kehijauan atau biru kehitaman terbentuk dalam larutan.

8.4 Identifikasi saponin. Kocok 0,5 ml air mendidih dengan 0,5 g ekstrak daun cabai jawa selama sekitar 10 detik hingga muncul busa. Setelah ditunggu 10 menit, larutan dicampur dengan HCl 1%. Jika busa yang muncul tidak hilang, maka positif saponin. (Lutfiyati *et al.*, 2017).

8.5 Identifikasi steroid dan terpenoid. Ekstrak daun cabai jawa pada tabung reaksi kemudian ditambah dietil eter dan didiamkan selama 10 menit. Ekstrak lalu dipisahkan filtratnya dan ditambahkan dengan (CH₃CO)₂O dan H₂SO₄ pekat. Terbentuknya warna ungu menandakan ekstrak daun cabai jawa positif mengandung triterpenoid

dan warna hijau kebiruan menandakan ekstrak daun cabai jawa positif mengandung steroid (Lutfiyati *et al.*, 2017).

9. Pembuatan larutan uji

9.1 Pembuatan larutan aloksan monohidrat. Untuk membuat larutan stok aloksan monohidrat 1%, larutkan 1 gram senyawa tersebut dalam 100 mililiter larutan natrium klorida. Aloksan digunakan untuk penginduksi diabetes (Utami, 2019).

9.2 Pembuatan larutan Na CMC 0,5%. Sebanyak 20 mililiter air suling panas dituang ke dalam mortir bersama dengan 0,5 gram natrium klorida. Setelah natrium klorida mengembang, campuran digerus hingga halus. Setelah itu, dengan menggunakan labu ukur 100 ml, tambahkan air sedikit demi sedikit ke dalam Na CMC yang halus (Juliana, 2018).

9.3 Pembuatan suspensi glibenklamid. Sebanyak 5 mg (1 tablet glibenklamid) disuspensikan ke dalam Na CMC 0,5% hingga 100 ml lalu dikocok hingga homogen.

9.4 Pembuatan larutan uji ekstrak daun cabai jawa. Sebesar 2 gram ekstrak daun cabai jawa dilarutkan dengan Na CMC 0,5% sampai 100 ml.

9.5 Pembuatan larutan NaCl fisiologis. Campuran garam fisiologis 0,9% dibuat dengan mencampurkan 0,9% NaCl pada aquades dalam 100 ml dibentuk agar dapat melarutkan aloksan.

10. Penentuan dosis

10.1 Dosis Na CMC. Sebagai kelompok kontrol, mencit jantan diberi larutan Na CMC 0,5%.

10.2 Dosis glibenklamid. Dosis glibenklamid pada manusia dewasa yang memiliki berat badan 70 kg ialah 5 mg per hari dengan faktor konversi pada mencit yang memiliki bobot 20 g yaitu 0,0026 sehingga dosis glibenklamid yang akan dimanfaatkan yaitu 0,013 mg/20 gram BB mencit.

10.3 Dosis ekstrak daun cabe jawa. Perhitungan dosis ekstrak daun cabai jawa merujuk pada penelitian (Nabi *et al.*, 2013). Pada penelitian tersebut 200 mg/ kg BB tikus dengan faktor konversi pada mencit didapatkan dosis 5,6 mg/20 gram BB mencit. Dosis ekstrak yang dimanfaatkan pada studi ini sebagai berikut:

Dosis I : 1,4 mg/kg BB mencit

Dosis II : 2,8 mg/kg BB mencit

Dosis III : 5,6 mg/kg BB mencit

11. Perlakuan dan pengelompokan hewan uji

Studi ini memanfaatkan 30 mencit jantan berusia 2-3 bulan. Hewan uji diadaptasikan selama tujuh hari, kemudian dipuasakan selama 12 jam dengan hanya diberikan air, setelah dipuasakan lalu diukur dan didapatkan KGD awal (T₀). Pada hari yang sama semua mencit diinduksi aloksan (kecuali kelompok normal). Kadar gula darah diperiksa kembali setelah 3 hari diinduksi aloksan untuk mengetahui pengaruh aloksan terhadap KGD diabetes (T₁).

Mencit diabetes adalah mencit yang diinduksi aloksan dengan dinyatakan diabetes bila KGD melebihi 126 mg/dl. Setelah didapatkan kadar gula darah yang naik maka mencit diberikan perlakuan secara oral dibawah ini:

Kelompok I : Kelompok kontrol normal tidak diberikan perlakuan

Kelompok II : Kelompok kontrol negatif mencit diabetes yang diberikan Na CMC 0,5%

Kelompok III : Kelompok kontrol positif mencit diabetes yang diberikan glibenklamid

Kelompok IV : Kelompok kontrol mencit diabetes yang diberikan ekstrak daun cabai jawa dengan 1,4 mg/kg BB mencit

Kelompok V : Kelompok kontrol mencit diabetes yang diberikan ekstrak daun cabai jawa dengan 2,8 mg/kg BB mencit

Kelompok VI : Kelompok kontrol mencit diabetes yang diberikan ekstrak daun cabai jawa dengan 5,6 mg/kg BB mencit

Kadar gula darah diukur sebelum perlakuan dan setelah perlakuan pada hari ke 7

dan 14. Mencit yang telah di ukur KGD dikorbankan 3 mencit dari semua kelompok

dengan metode fraktur leher. Hewan uji yang dikorbankan diambil pankreasnya dan

dibawa ke laboratorium untuk uji histopatologi pankreas.

12. Pengukuran KGD mencit.

Pengukuran KGD dilakukan sehabis mencit puasa 12 jam (T₀), setelah diberikan aloksan (T₁), setelah mencit diabetes diberikan perlakuan hari ke-7 (T₂), dan hari ke-14 (T₃) memakai alat *glucometer easy touch*. Lakukan kalibrasi sebelum menggunakan alat *glucometer easy touch*. Pengukur glukosa darah ini otomatis menyala saat memasukkan strip dan mati saat melepas strip. Ketika darah bersentuhan dengan strip, reaksi dari wadah strip menyebabkan darah secara otomatis

diserap ke dalam strip melalui aksi kapiler. Setelah wadah terisi penuh dengan darah, alat glukosa mulai mengukur kadar gula darah. Hasil pengukuran tersedia dalam 10 detik. Pada dasarnya, sampel darah memasuki strip tes melalui aksi kapiler.

13. Pembuatan preparat histopatologi

Pengambilan organ pankreas dilakukan dengan semua mencit dianestesi general dengan kloroform. Selanjutnya mencit dibedah untuk mengeluarkan organ pankreasnya. Persiapan hematologi memerlukan pencucian organ pankreas dengan NaCl fisiologis 0,9% dan fiksasi dengan formalin netral buffer (BNF) 10%. Untuk menyiapkan jaringan untuk diproses dalam prosesor jaringan, langkah pertama adalah memfiksasinya dengan merendamnya dalam formalin buffer fosfat 10% selama 24 jam. Setelah itu, jaringan harus diiris (trimming) dengan ketebalan ± 3 mm. Untuk mendehidrasi jaringan, prosesor jaringan digunakan dengan kaset. Gradien alkohol 70%, 80%, dan 96% digunakan masing-masing selama 2 jam untuk melakukan prosedur dehidrasi. Selain itu, xylol I, xylol II, dan xylol III dimasukkan ke dalam kaset untuk membersihkannya. Jaringan dipanaskan hingga 56°C selama 2 jam dua kali dalam parafin cair. Pinset digunakan untuk mengeluarkan jaringan, dan kemudian blok parafin digunakan untuk pemblokiran. Mikrotom, yang memiliki ketebalan 4-5 μm , digunakan untuk memotong. Bak air digunakan untuk menumbuhkan jaringan yang diiris di atas air, dan kemudian kaca objek digunakan untuk menangkapnya. Preparat disiapkan untuk pewarnaan dengan Hematoxylin Eosin (HE) setelah prosedur pengeringan selesai pada suhu kamar. Kaca objek diwarnai dengan merendamnya dalam xylol I, II, dan III masing-masing selama 5 menit, dalam urutan tersebut. Setelah direndam selama 5 menit dalam alkohol 96%, 80%, dan 70%, preparat dibilas dengan air suling dan direndam selama 7 menit dalam Hematoxilin Meyer. Letakkan di bawah air mengalir selama lima menit untuk mencuci. Langkah berikutnya adalah pencelupan 10 detik dalam Eosin untuk preparat. Setelah itu, campuran dimurnikan dalam xylol I, II, dan III, dan direndam selama 5 menit dalam masing-masing kadar alkohol berikut: 70%, 80%, dan 96%. Entelan digunakan untuk memasang preparat yang dikeringkan. Perubahan histopatologi dipelajari dengan memeriksa sampel secara mikroskopis (Nuralifah *et al.*, 2022).

14. Pemeriksaan histopatologi.

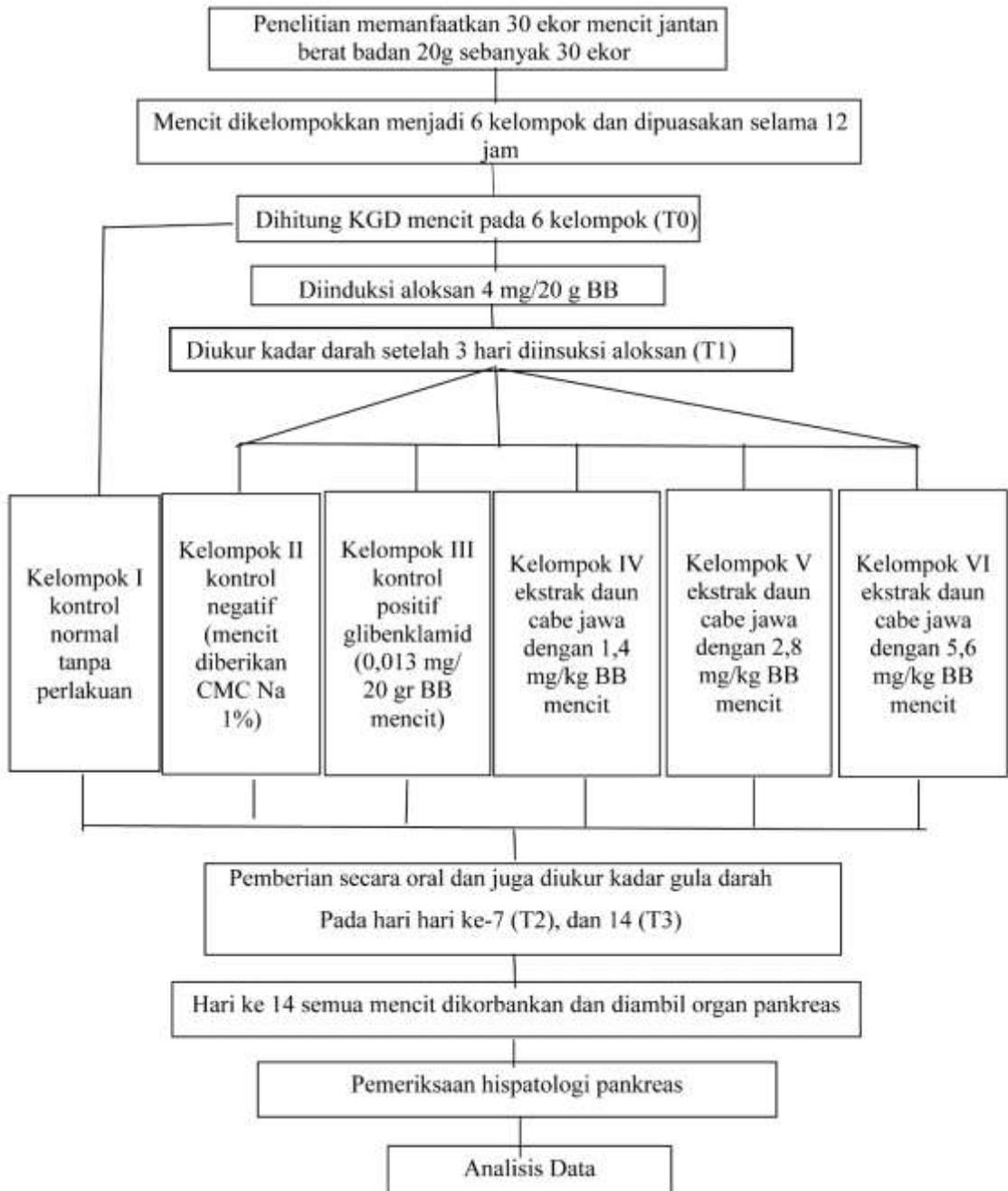
Preparat histopatologi diperiksa di bawah mikroskop masing-masing pada 5 lapang pandang mikroskopik. Pembesaran awal 100x digunakan untuk analisis mikroskopis, diikuti dengan pembesaran 400x. Dengan mengamati seluruh bidang pandang, untuk dapat melihat preparat. Prosesnya melibatkan pengamatan piknosis, karioreksis, dan kariolisis. Piknosis yaitu adanya penyusutan inti sel menjadi lebih kecil. Karioreksis yaitu adanya kerusakan inti menjadi bentuk fragmen. Kariolisis yaitu hilangnya inti sel. Rumus penelitian (Januar et al., 2014) digunakan untuk mengukur proporsi kerusakan nekrotik:

$$\text{Persentase kerusakan sel (\%)} = \frac{\text{Jumlah sel rusak}}{\text{Jumlah sel keseluruhan}} \times 100\%$$

E. Analisis Data

Data yang didapat dalam studi ini di analisis secara statistik untuk mengetahui dosis yang efisien dalam penurunan kadar glukosa darah, persentase kerusakan pankreas yang didapatkan meliputi jumlah sel yang mengalami piknosis, karioreksis dan kariolisis. Data T0–T1 di uji dengan *Paired T Test* (untuk melihat ada tidaknya perbedaan yang signifikan) jika terdapat perbedaan mengindikasi induksi aloksan berhasil, sedangkan uji pada data delta T1-T2 dan T1-T3 digunakan untuk mengetahui adanya signifikansi aktivitas penurunan kadar glukosa. Apabila data yang terdistribusi normal ($p > 0,05$) maka diteruskan pengujian dengan menggunakan *One Way Anova*, jika ada perbedaan hasil yang signifikan ($p > 0,05$) maka pengujian diteruskan dengan menggunakan uji *Post Hoc* untuk mengetahui perbedaan antar sampel.

F. Skema penelitian



Gambar 5. Skema penelitian