

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

1. Populasi

Populasi merupakan kumpulan unit dari individu di suatu wilayah studi. Ruang lingkup penelitian ini ditentukan oleh objek, kualitas dan karakteristik tertentu yang sedang diteliti. Subjek penelitian dan kesimpulan yang ditarik darinya. Penelitian ini, populasi yang digunakan yaitu daun kedondong bangkok yang berasal dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar pada tanggal 09 April 2023.

2. Sampel

Sampel merupakan bagian terkecil dari populasi yang diteliti, karena dianggap mewakili populasi. Sampel yang digunakan adalah daun kedondong bangkok dari B2P2TOOT, Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar yang dipisahkan dengan cara diambil daun yang busuk, sehat dan masih layak digunakan.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Ekstrak etanolik daun kedondong bangkok (*Spondias Dilcus*) digunakan sebagai variabel utama pada penelitian ini yang diperoleh dengan cara ekstraksi menggunakan metode maserasi. Aktivitas ekstrak daun kedondong bangkok sebagai antidiabetes menggunakan etanol 70% pada hewan uji aloksan dosis 150 mg/kg tikus.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama ditetapkan dapat dikelompokkan ke berbagai jenis variabel antara lain variabel bebas, variabel tergantung, serta variabel terkontrol.

Variabel bebas merupakan variabel yang dapat disesuaikan atau diatur secara sengaja untuk mempelajari apa pengaruh terhadap variabel tergantung. Variabel bebas penelitian ini menggunakan ekstrak etanol 70% dalam dosis yang bervariasi.

Variabel tergantung yang dipakai adalah angka kadar gula darah pada tikus

yang menurun sesudah mendapatkan perlakuan menggunakan ekstrak etanol 70% dengan dosis yang berbeda-beda dengan melihat

jumlah kadar gula darah yang menurun dari sebelum dan sesudah perlakuan.

Variabel terkontrol merujuk pada faktor-faktor yang memiliki pengaruh terhadap variabel terikat, sehingga perlu diatur atau dikontrol agar hasil penelitian tidak tersebar dan dapat dijadikan pembandingan oleh peneliti lain secara konsisten. Dalam konteks penelitian ini, variabel terkontrol mencakup aspek-aspek tertentu yang mempengaruhi penelitian, seperti berat badan hewan uji, lingkungan hidup, jenis kelamin, usia, kondisi kesehatan, kondisi laboratorium, dan faktor-faktor yang terkait dengan penelitian ini.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun kedondong bangkok merupakan daun yang diperoleh dari tumbuhan kedondong bangkok diperoleh di wilayah Kendari, Sulawesi Tenggara.

Kedua, serbuk daun kedondong bangkok merupakan serbuk yang diperoleh dari hasil serangkaian proses agar terbentuk serbuk dengan derajat kehalusan yang sesuai.

Ketiga, ekstrak etanol daun kedondong bangkok merupakan hasil ekstrak dengan pelarut etanol 70% pada metode maserasi.

Keempat, hewan uji yang digunakan adalah tikus jantan putih dengan berat rata-rata 180-220 g yang diinduksi aloksan sehingga mengalami diabetes.

Kelima, diabetes atau penyakit defisiensi insulin pada organ merupakan salah satu penyakit degeneratif kronis yang berkepanjangan.

Keenam, aloksan merupakan bahan kimia yang digunakan untuk menginduksi agar hewan uji mengalami hiperglikemik.

Ketujuh, glibenklamid digunakan sebagai obat penurun kadar gula darah oral yang diperoleh dari PT. Indofarma.Tbk.

Kedelapan, uji aktivitas anti diabetes merupakan ukuran kemampuan ekstrak etanol daun kedondong bangkok dalam penyembuhan DM.

Kesembilan, kondisi histopatologi jaringan pankreas melibatkan pemulihan sel beta pankreas dan pengurangan persentase nekrosis sel di pulau Langerhans, sehingga menciptakan proporsi sel yang lebih mendekati keadaan normal.

Kesepuluh, dosis efektif adalah jumlah ekstrak daun kedondong Bangkok yang dapat menunjukkan aktivitas penurunan kadar glukosa, serta membantu memulihkan sel beta pankreas, dan mengurangi persentase nekrosis sel islet pulau Langerhan, setara dengan kontrol positif.

Kesebelas, parameter aktivitas antidiabetes yang digunakan adalah penurunan glukosa darah dan histopatologi organ pankreas.

Keduabelas, nekrosis, nekrosis merupakan kondisi cedera pada sel yang mengakibatkan kematian dini sel-sel dan jaringan hidup. Nekrosis disebabkan oleh faktor-faktor eksternal seperti infeksi, racun, atau trauma yang menyebabkan pencernaan komponen-komponen sel menjadi tidak teratur.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Penelitian ini menggunakan alat timbangan analitik, mortar, stamper, batang pengaduk, Erlenmeyer, sonde oral, spuit insulin, gelas ukur, beaker glass, tabung reaksi, corong, ayakan, Glukometer Easy Touch GCU, stik glukosa Easy Touch GCU, oven, waterbath, kandang tikus beserta tempat makan dan minum.

2. Bahan

2.1. Bahan sampel. Bahan sampel menggunakan kedondong bangkok (*Spondias Dilcus*) yang berwarna hijau muda pada penelitian ini.

2.2. Bahan Kimia. Bahan yang digunakan antara lain; aloksan monohidrat, tablet glibenklamid, aquadest, etanol 70%, karboksimetil selulosa sodium, kapas, flanel, kertas saring, pakan standar, serbuk magnesium, etanol 95%, besi klorida, kloroform, asam asetat anhidrat, asam sulfat dan asam klorida (HCl).

2.3. Hewan uji. Hewan uji penelitian kali ini menggunakan tikus putih jantan yang sesuai persyaratan untuk dapat diteliti. Semua tikus dipuasakan selama 8 jam sebelum dilakukan penelitian dengan tidak memberikan makan agar tidak mempengaruhi proses absorpsi obat didalam tubuh.

D. Jalanya penelitian

1. Penyiapan sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun kedondong bangkok (*Spondias Dilcus*) yang diperoleh dari B2P2TOOT, Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar. Bilas daun kedondong bangkok yang terkumpul dalam air bersih yang mengalir, kemudian ditimbang biomassa basahanya, lalu, daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dalam suhu ruangan samapi 7 hari.

2. Determinasi

Adalah penentuan kebenaran identitas sampel mengacu pada karakteristik makroskopis. Hal ini dilakukan dengan menyusun ciri-ciri

morfologi tumbuhan dalam literatur yang dibuktikan dengan identifikasi di B2P2TOOT, Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar.

3. Pembuatan serbuk daun kedondong bangkok (*Spondias Dilucus*)

Universitas Setia Budi Surakarta menjadi laboratorium dalam pembuatan simplisia penelitian ini. Simplisia yang telah kering di blender hingga membentuk biomassa serbuk kering, setelah itu diayak menggunakan ayakan mesh 40. Hasil serbuk daun kedondong bangkok kering disimpan dalam toples kaca yang disediakan sebagai wadah penyimpanan.

4. Susut pengeringan serbuk daun kedondong bangkok

Timbang seksama 1 sampai 2 g simplisia, dimasukkan kedalam oven dan panaskan pada suhu 150° selama 1 jam, setelah itu didinginkan sampai suhu ruang, kemudian dipanaskan lagi sampai mendapatkan bobot konstan.

5. Pembuatan ekstrak daun kedondong bangkok

Dimasukkan 700gr serbuk simplisia daun kedondong bangkok ke dalam maserator, tambah 5 L etanol 70%, rendam selama 6 jam sambil sesekali diaduk, diamkan sampai 24 jam. Saring ekstrak yang didapat dengan kain flannel dan kertas saring. Ulangi maserasi ampas menggunakan 5 L etanol 70%. Dituang maserat dan kumpulkan, kemudian dipekatkan dengan cara evaporasi dengan *rotary evaporator* suhu 60 sampai didapatkan ekstrak kental.

6. Identifikasi kandungan senyawa ekstrak kedondong bangkok

Identifikasi fitokimia dilakukan guna mendapatkan metabolit dan fitokimiapada ekstrak daun kedondong bangkok dengan pereaksi.

6.1. Flavonoid 0,1 mg serbuk magnesium dan 0,4 ml amil alkohol ditambahkan ke sejumlah sampel dan 4 ml alkohol campuran dikocok. Reaksi dengan hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning ataupun jingga yang terdapat pada lapisan amil alkohol (Nova, 2016).

6.2. Saponin Pengujian dilakukan dengan menempatkan sampel serbuk dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml aquades, kemudian dikocok sambil ditambahkan satu tetes larutan asam klorida 2N dan diamkan. Hasil positif dibuktikan dengan adanya buih stabil yang cukup banyak setinggi 1-3 cm selama 30 detik (Novitasari & Putri, 2016).

6.3. Tanin 01 gram perasan atau ekstrak ditimbang dan kemudian dicampurkan dengan 5 mL akuades, lalu direbus selama 5 menit. Setelah itu, larutan disaring dan filtratnya dicampur dengan 5

tetes FeCl 1%. Uji tannin dianggap positif jika terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan (Yuningsih, 2007).

7. Penentuan kadar air ekstrak daun kedondong bangkok

Timbang seksama lebih kurang 10g sampel, masukan kedalam wadah yang telah ditara, keringkan dengan suhu 105^0 selama 5 jam dan timbang, lanjutkan pengeringan dan timbang dalam selang waktu 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0.25%.

8. Pembuatan larutan uji

Ekstrak pekat daun kedondong bangkok ditimbang sesuai dosis yang telah ditetapkan. Semua ekstrak ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam labu takar

10 mL sebagai larutan stok, selanjutnya ditambahkan CMC terlarut hingga terlarut. Larutan yang didapat disonikasi selama 30 menit hingga setiap dosis ekstrak dihomogenkan. Masukan ke dalam botol sampel dan diberi tanda.

9. Pembuatan larutan aloksan

Aloksan monohidrat diencerkan dengan air suling steril hingga larut sempurna. Sebesar 150 mg/kgBB untuk disiapkan induksi aloksan tikus secara intraperitoneal. Untuk berat badan tikus = 200 g, dosisnya 30 mg, buat larutan stok, timbang aloksan 150 mg, larutkan dalam 10 ml akuades steril dan kocok hingga terlarut sempurna. Volume larutan yang diberikan adalah 2 mL untuk pemberian pada konsentrasi 15 mg/mL (Oshadie *et al.*, 2017).

10. Pembuatan kontrol positif dan kontrol negatif

Pembuatan diawali dengan pembuatan larutan stok CMC 1% terlebih dahulu. 5 gram ditimbang kemudian dimasukkan dalam mortar panas. Sebanyak 20 mL aqiadest ditambahkan sampai terbentuk mucilago. Kemudian dimasukkan ke dalam botol kalibrasi dan ditamahkan aquadest ad 100 mL hingga diperoleh konsentrasi CMC 1% kemudian larutan stok kemudian diambil 10 mL untuk setiap kelompok uji (Nugrahani, 2012).

Kedua, pembuatan suspensi glibenklamid 5 mg/kg BB manusia sebagai kontrol positif. Dosis glibenklamid pada mencit dikonversi berdasarkan perhitungan konversi dosis. 1 tablet glibenklamid digerus halus, lalu ditambahkan CMC 1% ad 100ml. Volume larutan yang diberikan adalah 1.8 mL pada konsentrasi 0.005% (Nugrahani, 2012).

11. Pembuatan kelompok perlakuan

Kelompok I : Kelompok kontrol normal (tidak diberi perlakuan)

- Kelompok II : Kelompok kontrol positif (Glibenklamid 0,09 mg/kg BB)
- Kelompok III : Kelompok kontrol negatif (Na-CMC 1%)
- Kelompok IV : Kelompok perlakuan ekstrak etanol daun kedondong bangkok dosis 125mg/kgBB
- Kelompok V : Ekstrak etanol daun kedondong bangkok 250mg/kgBB
- Kelompok VI : Ekstrak etanol daun ke dondong bangkok 500mg/kgBB

12. Uji aktivitas antidiabetes

Tikus diaklimatisasi selama 5 hari dan diambil kadar glukosa darah awal (T_0) diukur setelah 6-12 jam puasa pada hari keenam, dilakukan pengukuran kadar glukosa darah tikus putih jantan sebanyak 30 ekor sebagai kadar glukosa darah awal. Pada hari yang sama, tikus dibuat hiperglikemia dengan injeksi aloksan 150 mg/kg BB secara intraperitoneal di waktu pagi selama 3 hari (Kumalasari *et al* 2019). Pengukuran dilakukan kembali terhadap perubahan kadar glukosa pada hari ke 9 paska injeksi. Penelitian kemudian dibagi menjadi enam kelompok yaitu kelompok kontrol normal, kontrol negatif (Na-CMC 1%), kelompok kontrol positif (glibenclamide 0,09 mg/kg BB), dan pemberian etanol daun Bangkok kedondong dengan dosis ekstrak; 125; 250; 500 mg/kg BB diberikan selama 7 hari setelah dilakukan pengambilan (T_1). Kadar glukosa darah pada tikus diukur kembali pada hari ke 16 setelah perlakuan.

13. Pemberian larutan glibenklamid

Lima (5) ekor tikus sebagai hewan uji dari semua kelompok uji diiberi perlakuan setelah 3 hari induksi. Glibenklamid diberikan secara oral (*gavage*) sesuai dengan dosis volume pemberian di tiap kelompok oral setiap hari selama 5 hari untuk setiap tikus dalam kelompok kontrol positif.

14. Pemberian larutan Na-CMC 1%

Lima (5) ekor tikus sebagai hewan uji dari semua kelompok diberi perlakuan setelah 3 hari induksi. Na-CMC diberikan secara oral (*gavage*) sesuai dengan dosis volume pemberian di tiap kelompok oral setiap hari selama 5 hari untuk setiap tikus dalam kontrol negatif.

15. Pemberian ekstrak daun kedondong bangkok

Semua kelompok pembanding dengan 5 ekor tikus sebagai hewan uji diberi perlakuan setelah 3 hari induksi. Ekstrak daun

kedondong bangkok diberikan secara oral (*gavage*) sesuai dengan dosis volume pemberian di tiap kelompok oral setiap hari selama 5 hari untuk setiap tikus dalam kelompok masing-masing dosis.

16. Pemeriksaan kadar glukosa darah

Ekor tikus terlebih dahulu dibersihkan dengan alkohol 70% sebelum diambil sampel darahnya. Sampel darah diambil dengan auto click dan kadar glukosa darah diukur dengan Autocheck. Petunjuk penggunaan Teteskan setetes darah tikus ke dalam glukometer dan tunggu 10 detik untuk pembacaan glukosa darah pada glukometer.

17. Pembuatan preparat histopatologi

Pertama, dekapitisasi organ pankreas terlebih dahulu kemudian dimasukkan ke dalam pot kecil dari plastik. Fiksasi organ dengan formaldehid 10% PA untuk menjaga stabilitas agar tidak mudah rusak. Kemudian melakukan pemotongan organ untuk dimasukkan ke dalam tisu *cassette*, dicuci pada air mengalir kurang lebih 30 menit.

Kedua, proses dehidrasi adalah langkah untuk mengeluarkan cairan dari dalam jaringan. Setelah jaringan pankreas dimasukkan ke dalam kaset jaringan, proses ini melibatkan perendaman bertahap dalam larutan etanol dengan variasi konsentrasi etanol 70%, etanol 80%, dan etanol 90%. Masing-masing selama sekitar 1 jam. Selanjutnya, diikuti oleh perendaman dalam etanol absolut I, etanol absolut II, dan etanol absolut III, masing-masing selama 1 jam.

Ketiga, proses *clearing* (penjernihan) untuk mentiadakan alkohol (dealkoholisasi) dengan larutan *xylene*. Langkah ini dimulai memasukan jaringan pankreas ke dalam *xylene* I, *xylene* II, *xylene* III secara bertahap selama kurang lebih 20 menit dari masing-masing tahapan *xylene*.

Keempat, adalah infiltrasi paraffin. Parafin dipanaskan kemudian organ diletakkan ke dalamnya sehingga sampel organ akan mengeras dan lebih mudah saat pemotongan menggunakan mikrotom. Tahapan ini dimulai dengan menjadikan parafin I, II, dan III sebagai wadah untuk diletakkan potongan organ selama 60 menit dengan temperature sekitar 60°C.

Kelima, proses *embedding* di mana sampel akan diinhibisi di dalam blok parafin. Lalu jaringan yang telah mengeras dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 mikrometer, lapisan jaringan diletakkan keatas objectglass untuk dilakukan pewarnaan.

Keenam, tahap pemberian warna hematoxylin eosin. Proses ini diawali secara deparafinisasi menggunakan *xylene* ditujukan agar parafin pada jaringan dapat hilang dengan memasukan jaringan ke

dalam *xylene* I dan II selama 3 menit.

Ketujuh, proses rehidrasi dilakukan menggunakan larutan etanol untuk membalikkan cairan ke dalam jaringan. Proses ini dimulai dengan menyiapkan pelarut organik etanol I dan II kemudian diberi jaringan ke dalamnya tiap-tiap 3 menit, setelah itu sampel dipindahkan ke dalam etanol 80% dan 70% secara bergantian selama 3 menit.

Kedelapan, langkah selanjutnya adalah pewarnaan di mana jaringan ditempatkan dalam larutan pewarna. Jaringan bersamaan pewarna hematoxylin direndam kurang lebih 10-20 menit, setelah itu diamati untuk memastikan bahwa jaringan terwarnai ungu. Kemudian, sampel jaringan yang telah terwarnai dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Proses staining diulangi namun kali ini eosin sebagai pewarnanya selama 10 menit.

Kesembilan, proses rehidrasi, agar jaringan mempunyai daya tahan lama dengan cara menarik air dari jaringan tersebut. Larutan etanol konsentrasi 70%, 80%, dan 90% menjadi larutan untuk dicelupkannya jaringan selama 30 detik secara bergantian, sebanyak 4 kali. Selanjutnya, perendaman jaringan dilakukan dan dicelupkan dalam etanol 4 kali celup selama 60 detik.

Kesepuluh, *clearing* atau penjernihan dilakukan dengan menempatkan sampel ke larutan *xylene* I. Setelah itu, proses *mounting* dilakukan dengan cara menutup sediaan dengan gelatin sebagai pengkelat dan dilapisi menggunakan *deg glass* pada bagian atasnya (Lerebulan, 2014).

18. Perlakuan hewan uji paska bedah

Hewan uji dilakukan pembedahan dan diambil organnya, kemudian jasadnya dikubur. Kemudian hewan uji dikubur dengan layak pada lokasi yang sudah disiapkan. Untuk mencegah terbongkarnya tempat kuburan bagi hewan uji, kedalaman lubang juga patut diperhitungkan yaitu minimal 0,5 meter dalam tanah.

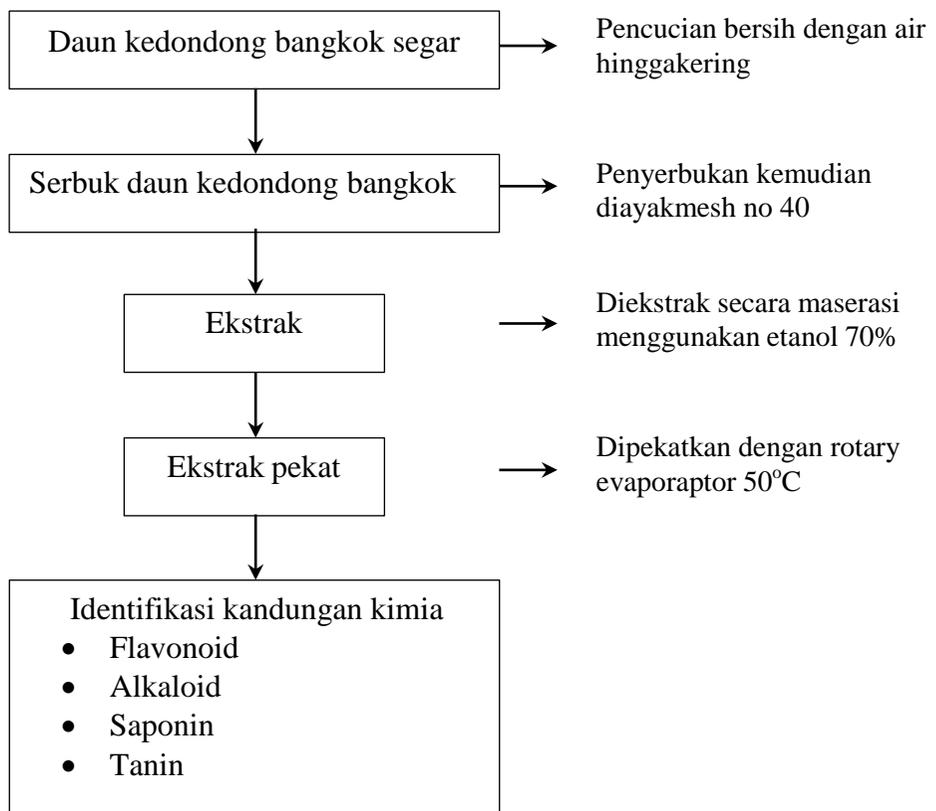
E. Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dilakukan analisis data dan penarikan kesimpulan. Data kuantitatif hasil penelitian diungkapkan sebagai rerata (*mean*) dan standar deviasi (\pm) sementara data kualitatif didapat dari gambaran histo jaringan yang nyata dengan pewarnaan hematosin dan eosin. Analisis statistik, akan dilakukan uji Saphiro-

Wilk untuk menentukan apakah data yang didapat terdistribusi normal atau tidak. Jika terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji ANOVA, namun bila tidak terdistribusi normal dilakukan uji non parametrik. Dalam kriteria uji, apabila nilai signifikansi lebih kecil dari 0,05 data dianggap tidak terdistribusi normal. Jika data memenuhi syarat ANOVA, analisis dilanjutkan dengan Post Hoc Tes untuk mengetahui perbedaan *mean* antara kelompok tersebut signifikasikan atau tidak dengan menggunakan program SPSS *for Windows Release*.

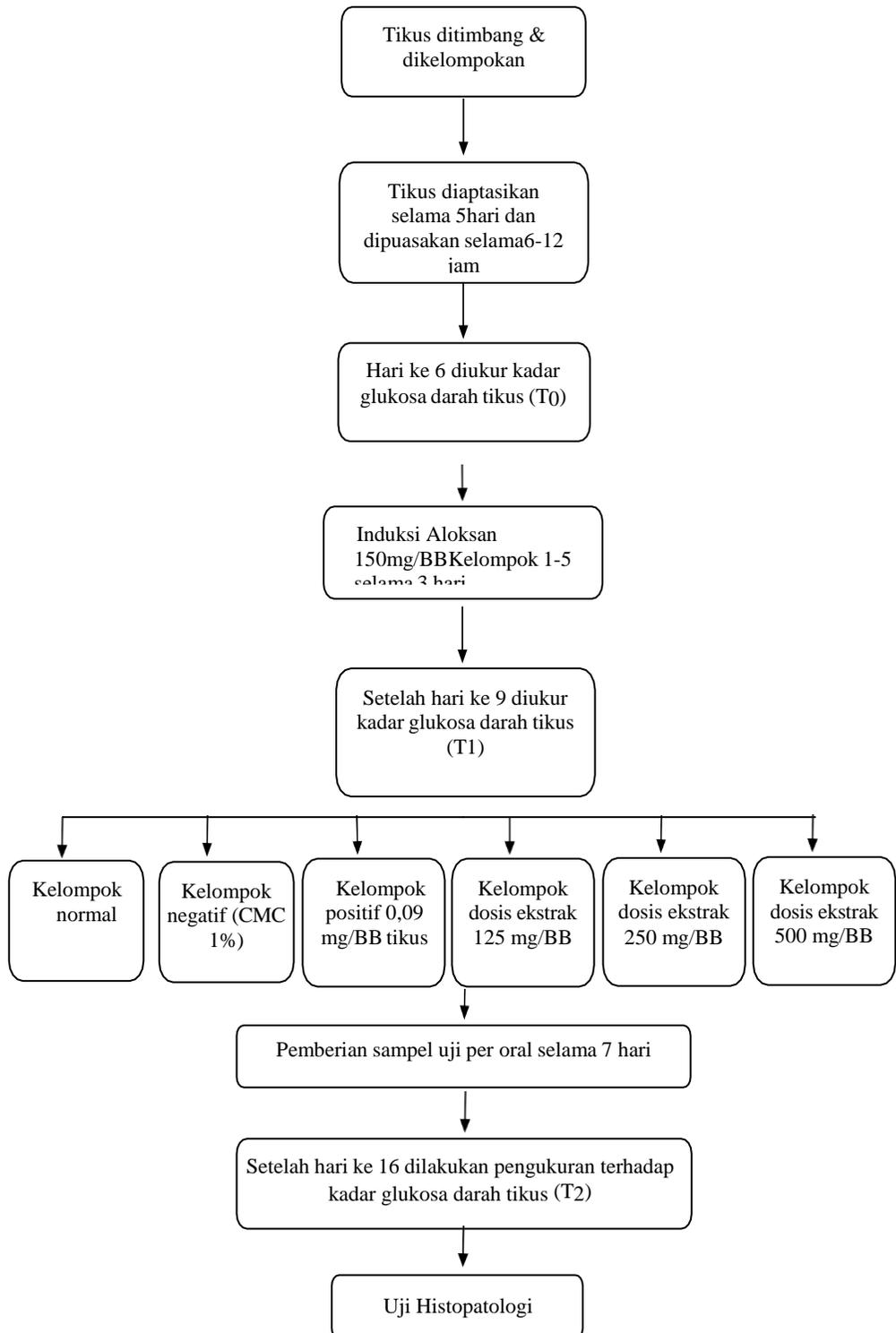
F. Diagram alir

1. Pembuatan ekstrak



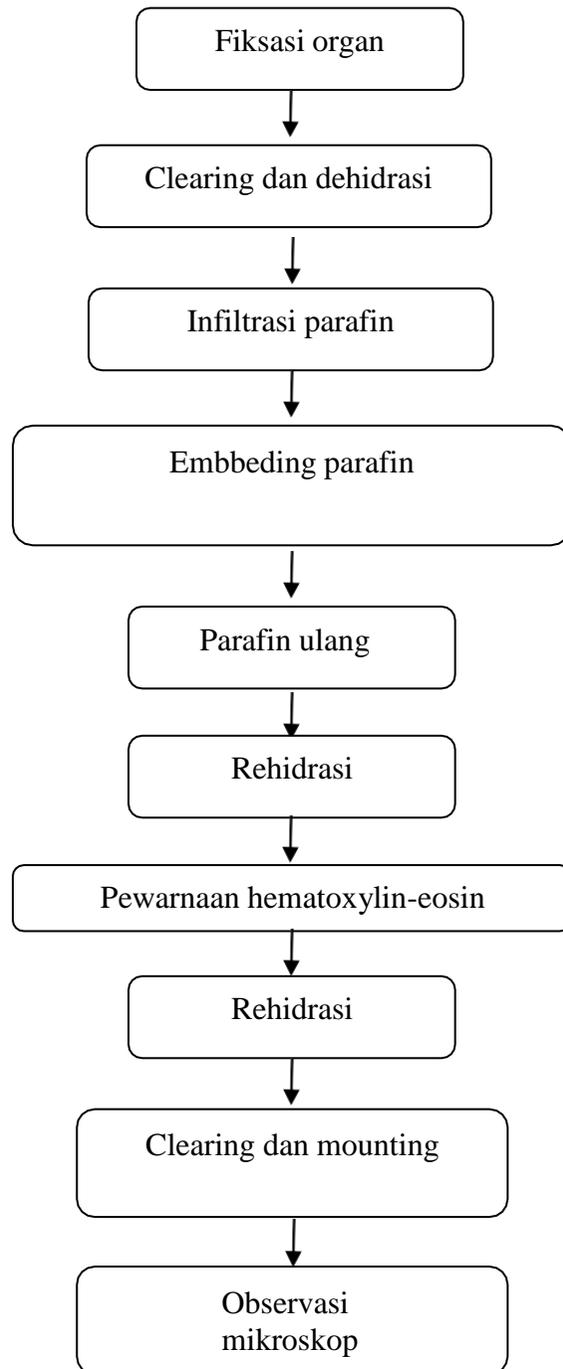
Gambar 5. Diagram alir pembuatan ekstrak daun kedondong bangkok

2. Uji aktivitas antidiabetes



Gambar 6. Diagram alir uji aktivitas antidiabetes

3. Alur pemeriksaan histopatologi



Gambar 7. Diagram alir pemeriksaan histopatologi