

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga pinang yang diperoleh dari petani bunga pinang di Sorong, Papua.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga pinang yang diambil dari populasi secara acak di petani bunga pinang daerah Sorong, Papua dengan memilih bunga yang segar, bebas dari hama, dan berwarna hijau.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol bunga pinang (*Areca catechu* L). Variabel utama yang kedua adalah aktivitas penurunan kadar glukosa darah dengan metode glukometer. Variabel utama yang ketiga adalah tikus putih jantan galur Wistar dengan berat badan 180-200 gram.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan kedalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi dosis ekstrak etanol bunga pinang (*Areca catechu* L). Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah penurunan kadar glukosa dalam serum darah tikus putih jantan galur wistar setelah diberi perlakuan dengan ekstrak etanol bunga pinang dalam berbagai variasi dosis. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah peneliti, kondisi fisik hewan uji meliputi berat badan, usia, jenis kelamin, galur, lingkungan tempat tinggal, dan laboratorium.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, bunga pinang adalah bunga dari tanaman pinang yang diperoleh dari petani di wilayah Sorong, Papua.

Kedua, serbuk bunga pinang adalah serbuk yang berasal dari bunga pinang yang telah dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C, digiling, dan diayak menggunakan ayakan mesh 40.

Ketiga, ekstrak etanol bunga pinang adalah hasil ekstraksi serbuk bunga pinang dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode maserasi.

Keempat, tikus putih jantan galur Wistar adalah tikus putih jantan galur wistar usia 2-3 bulan dengan berat badan 180-200 gram yang diberi diet tinggi lemak dan glukosa dan diinduksi aloksan yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kelima, peningkatan kadar glukosa darah hewan uji adalah selisih kadar glukosa darah pada hari ke-0 sampai dengan hari ke-20.

Keenam, penurunan kadar glukosa darah hewan uji adalah selisih kadar glukosa darah pada hari ke-13 dengan hari ke-20 setelah perlakuan.

Ketujuh, gambaran histopatologi hati tikus putih jantan galur Wistar yang mengalami hiperglikemia setelah diberikan perlakuan.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak etanol bunga pinang dalam penelitian ini adalah pisau, oven suhu 50°C, alat penggiling, ayakan mesh 40, bejana maserasi, batang pengaduk, corong glass, kain flanel, *rotary evaporator*, *beaker glass*, *Erlenmeyer*, gelas ukur, timbangan elektrik, glukometer *Easy Touch*, *centrifuge*, mortir dan stamfer, spuit injeksi, jarum suntik oral, tabung reaksi, kandang tikus.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan adalah bunga pinang (*Areca catechu* L.) yang diperoleh dari petani pinang di Sorong, Papua .

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan yaitu etanol 96% sebagai cairan penyari. Untuk uji penetapan kadar glukosa darah menggunakan metode glukometer. Bahan untuk pengamatan histopatologi adalah formalin PA, larutan warna *Haematoxylin Eosin*, formaldehid, etanol, toluen dan alkohol. Untuk identifikasi kandungan kimia bunga pinang digunakan serbuk Mg, HCl pekat alkohol, anhidrida asam asetat, kloroform, asam sulfat, HCL 2N, serbuk magnesium, amil alkohol, toluen, asam klorida, besi (III) klorida dan air suling, larutan FeCl_3 1% *n*-heksana. Uji farmakologi digunakan aloksan dan glibenklamid.

3. Hewan percobaan

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian adalah tikus jalan galur Wistar usia 2-3 bulan dengan berat badan 200 gram sebanyak 30 ekor yang diberi makan diet tinggi lemak dan glukosa. Tikus diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta. Hewan uji dipelihara sesuai dengan protokol pemeliharaan dan penanganan hewan uji. Tikus galur Wistar ditempatkan secara individual dalam kandang pemeliharaan dengan pengaturan suhu (22°C), kelembaban udara ruangan ($55\pm10\%$), dan pengukuran cahaya secara otomatis dengan siklus terang-gelap (12:12 jam). Hewan uji diberi akses makanan dan minuman yang sudah ditentukan.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman digunakan untuk menentukan kebenaran tanaman bunga pinang berdasarkan ciri-ciri makroskopis dan morfologis dari tanaman yang akan diteliti dengan kunci determinasi. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

2. Pengambilan bahan

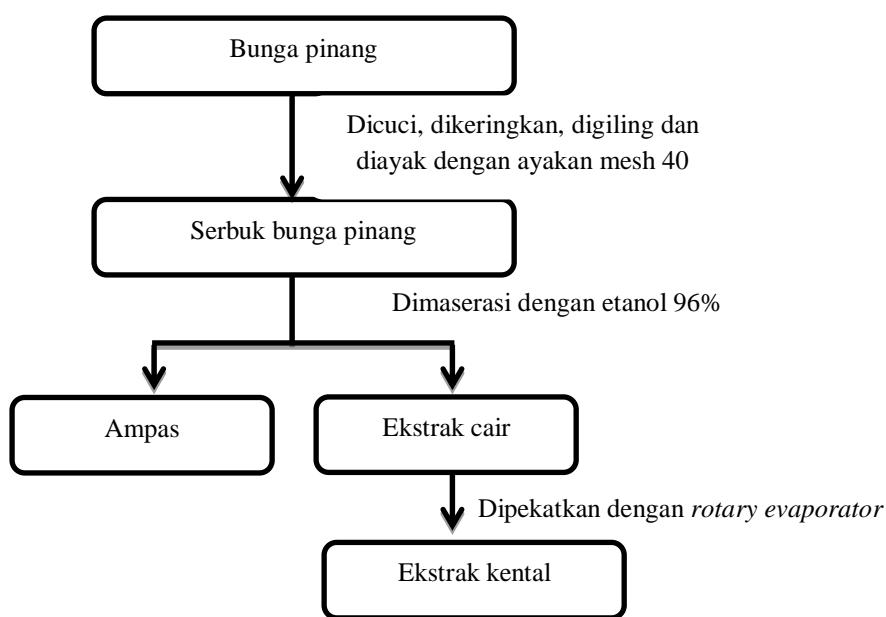
Bunga pinang diambil dari petani bunga pinang di Sorong, Papua pada bulan April 2019 dalam keadaan segar dan tidak terkontaminasi penyakit.

3. Pembuatan serbuk

Bunga pinang segar dicuci untuk menghilangkan kotoran dan debu yang melekat pada daun, kemudian bunga ditiriskan dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C selama beberapa hari sampai kering. Simplisia yang sudah kering dihaluskan dengan menggunakan mesin penggiling, kemudian simplisia diayak menggunakan ayakan mesh 40.

4. Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak etanol bunga pinang dilakukan dengan metode maserasi dengan perbandingan 1:75. Serbuk bunga pinang ditimbang 500 gram, dimasukkan ke dalam botol berwarna coklat kemudian direndam dengan etanol 96% sebanyak 75 bagian yaitu 3750 ml, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya, dengan penggojokan setiap hari. Cairan hasil ekstraksi disaring dengan kain flanel. Ampas kemudian dibilas kembali dengan etanol 96% secukupnya sampai diperoleh filtrat 100 bagian. Kemudian filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 500°C, hasilnya disebut ekstrak kental etanol bunga pinang (Ansel 1989).



Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak kental etanol bunga pinang.

5. Penetapan kadar air serbuk bunga pinang

Tujuan dari penetapan kadar air adalah untuk mengetahui batasan maksimal atau rentang tentang besarnya kandungan air dalam bahan. Hal ini

terkait dengan kemurnian dan adanya kontaminan dalam simplisia tersebut. Simplisia dinilai cukup aman bila mempunyai kadar air kurang dari 10%. Penetapan kadar air serbuk bunga pinang dilakukan dengan alat *Sterling Bidwell*. Pelarut yang digunakan untuk melakukan penetapan kadar air biasanya menggunakan pelarut toluen yang sudah dijenuhkan dengan air. Toluен adalah senyawa anhidrat yang bisa menyerap air yang dikandung dalam simplisia atau ekstrak sehingga dapat mengurangi kadar air palsu. Caranya dengan menyiapkan toluen jenuh air yang akan digunakan dengan cara menggojog sejumlah toluen sebanyak 200 ml dengan 20 ml air, lalu biarkan memisah, dan lapisan airnya dibuang, menimbang serbuk bunga pinang sebanyak 20 gram kemudian dimasukkan ke dalam labu alas bulat pada alat *Sterling Bidwell*, lalu ditambahkan toluen jenuh air ke dalam labu kurang lebih sebanyak 200 ml, kemudian dipasang rangkaian alatnya. Masukkan toluen jenuh air ke dalam tabung penerima melalui kondensor sampai leher alat penampung dan labu dipanaskan dengan hati-hati selama 15 menit sampai tidak ada air yang menetes lagi. Selanjutnya kadar air diukur dengan melihat volume skala pada alat dan dihitung % air dari berat sampel dengan rumus sebagai berikut : volume yang terbaca/bobot simplisia x 100% (Sudarmadji *et al.* 2003; Depkes RI 2008).

6. Identifikasi senyawa kimia aktif ekstrak etanol bunga pinang (*Areca catechu* L.) secara kualitatif

6.1 Identifikasi flavonoid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambah 10 ml air panas, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan sedikit serbuk Mg, 1 ml HCl pekat, dan 1 ml amil alkohol, kemudian dikocok kuat-kuat. Hasil positif akan terbentuk warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Prameswari *et al.* 2014).

6.2 Identifikasi steroid/terpenoid. Sebanyak 2 mL ekstrak etanol ditambahkan 2 mL *n*-heksana, dikocok. Lapisan *n*-heksana ditambahkan pereaksi *Liebermann-Burchard*. Adanya perubahan warna menjadi biru kehijauan menunjukkan adanya steroid (Hidayah *et al.* 2016).

6.3 Identifikasi saponin. Sebanyak 4 ml larutan uji ditambahkan dengan 5 ml aquadest, kocok, lihat adanya busa yang stabil, sedikit ekstrak ditambahkan 5

ml air, kocok dalam tabung reaksi, amati hingga terbentuk busa yang stabil (busa setinggi 1 cm dan stabil selama 30 menit) (Yuda *et al.* 2017).

6.4 Identifikasi tanin. Sebanyak 2 ml larutan uji dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi, tabung 1 sebagai kontrol dan tabung 2 ditambahkan beberapa tetes larutan FeCl_3 5% atau FeCl_3 10%, hasil positif tanin jika terbentuk warna hijau gelap/biru (Yuda *et al.* 2017).

1. Identifikasi senyawa kimia aktif ekstrak etanol bunga pinang (*Areca catechu* L.) secara kuantitatif

7.1 Identifikasi flavonoid. Identifikasi kandungan senyawa flavonoid secara kuantitatif yaitu dengan menggunakan KLT, dimana fase gerak yang digunakan adalah n-butanol-asam asetat-air (4:1:5) menggunakan baku pembanding quersetin/rutin dan dibaca pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis (Yuda *et al.* 2017).

7.2 Identifikasi steroid/terpenoid. Identifikasi kandungan senyawa steroid secara kuantitatif yaitu dengan menggunakan KLT, dimana fase gerak yang digunakan adalah dengan menggunakan pelarut kloroform dan metanol dengan perbandingan (9:1) serta dengan menggunakan baku pembanding stigmasterol dan dianalisis dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Yuda *et al.* 2017).

2. Pembuatan larutan uji

8.1 Larutan aloksan monohidrat. Larutan aloksan monohidrat dengan konsentrasi 1% dibuat dengan cara melarutkan 1 g aloksan monohidrat dalam larutan garam fisiologi pada volume 100 ml. Aloksan digunakan untuk penginduksi diabetes (Amma 2009).

8.2 Larutan CMC Na 0,5%. Larutan CMC Na 0,5% dibuat dengan cara melarutkan 0,5 gram CMC Na dalam aquades panas \pm 30 ml secukupnya sebelumnya aquadest panas tersebut didiamkan selama 15 menit sambil diaduk hingga terbentuk larutan koloidal. Setelah itu ditambahkan aquades hingga 100 ml (Togubu *et al.* 2013).

8.3 Glibenklamid. Dosis glibenklamid ditentukan berdasarkan dosis manusia dengan berat badan 70 kg. Konversi dosis yang digunakan adalah

konversi dosis dari manusia ke tikus dengan berat badan 200 gram dengan nilai konversi yaitu 0,018. Dosis glibenklamid untuk manusia adalah 5 mg/hari, sehingga jika dikonversikan ke tikus yaitu $5 \text{ mg} \times 0,018 = 0,09 \text{ mg}/200 \text{ gram BB}$ tikus = 0,45 mg/Kg BB tikus. Suspensi glibenklamid ini dibuat dengan cara melarutkan glibenklamid yang telah ditimbang seksama ke dalam 1 ml larutan CMC 0,5% yang sudah dibuat sebelumnya, kemudian dihomogenkan (Togubu *et al.* 2013).

8.4 Larutan garam fisiologis. Larutan garam fisiologis 0,9% dibuat dengan cara melarutkan 0,9 g NaCl dalam air suling pada volume 100 ml dibuat untuk melarutkan aloksan monohidrat.

8.5 Penetapan dosis ekstrak. Penetapan dosis sediaan uji dari ekstrak etanol bunga pinang diberikan berdasarkan Ghate *et al.* (2014) yang menyatakan bahwa pada dosis 500 mg/Kg BB tikus dapat mengontrol kadar glukosa darah dan memodulasi metabolisme glukosa dalam darah tikus yang menderita diabetes melitus, namun dalam penelitian ini hanya menggunakan 1 dosis saja, sehingga dalam penelitian ini ditambahkan dosis 125 dan 250 mg/Kg BB tikus. Jadi, dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 125 mg/Kg BB, 250 mg/Kg BB, dan 500 mg/Kg BB. Dosis ini akan diorientasi terlebih dahulu. Banyaknya volume pemberian ekstrak etanol bunga pinang yang digunakan dihitung berdasarkan berat badan dari masing-masing tikus, kemudian dilarutkan dengan larutan suspensi CMC Na konsentrasi 0,5% dan diberikan secara oral pada masing-masing tikus.

8.6 Perlakuan dan pengelompokan hewan uji. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) umur 2-3 bulan dengan berat badan 180-200 gram. Sebanyak 30 ekor tikus diaklimatisasi selama satu minggu.

Sebanyak 25 hewan uji diinduksi diabetes melitus dengan cara diinjeksikan dengan aloksan dosis 150 mg/kg BB tikus secara *intra peritoneal* (*i.p.*) dan diberi pakan tinggi lemak dan glukosa selama 20 hari dan diberikan hanya satu kali, sedangkan 5 hewan hanya diberikan pakan tinggi lemak dan glukosa tanpa induksi aloksan untuk nantinya dijadikan kelompok normal, lalu

pada hari ke-6 semua kelompok baik kelompok normal dan kelompok aloksan monohidrat diukur kadar glukosa darah (T1). Hewan uji dikelompokkan kedalam enam kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor tikus. Pengelompokan dan perlakuan hewan uji sebagai berikut :

Kelompok 1 : Kelompok normal, tikus yang hanya diberikan pakan tinggi lemak dan glukosa tanpa diinduksi aloksan.

Kelompok 2 : Kontrol negatif, tikus diberikan CMC Na 0,5%.

Kelompok 3 : Kontrol positif, tikus diberikan glibenklamid dosis 0,45 mg/kg BB.

Kelompok 4 : Ekstrak etanol bunga pinang dosis 125 mg/kg BB `tikus selama 14 hari.

Kelompok 5 : Ekstrak etanol bunga pinang dosis 250 mg/kg BB tikus selama 14 hari.

Kelompok 6 : Ekstrak etanol bunga pinang dosis 500 mg/kg BB tikus selama 14 hari (Anas *et al.* 2014).

8.7 Pengukuran kadar glukosa darah tikus. Pengukuran kadar glukosa darah tikus dilakukan dengan menggunakan metode glukometer dengan mengambil darah tikus lewat ujung ekor tikus pada hari ke-3, hari ke-6, hari ke-13, dan hari ke-20. Kemudian darah diteteskan pada alat berupa pipa kapiler strip pengukur kadar gula darah yang terpasang langsung pada alat glukometer. Pengukuran kadar glukosa darah pada hari ke-0 bertujuan untuk mengetahui kadar awal glukosa darah, sedangkan pengukuran kadar glukosa darah pada hari ke-3 dan hari ke-6 bertujuan untuk mengetahui kondisi hiperglikemia setelah diberi pakan tinggi lemak dan glukosa. Pengukuran kadar glukosa darah pada hari ke-13 dan hari ke-20 bertujuan untuk mengetahui penurunan kadar glukosa darah yang optimal setelah diberi perlakuan ekstrak etanol bunga pinang dengan variasi dosis dan kontrol pembanding obat. Data kadar glukosa darah pada tikus setelah perlakuan dari ekstrak bunga pinang dan glibenklamid dibandingkan secara statistik.

8.8 Pengambilan organ hati untuk pembuatan preparat histopatologi.

Dua puluh hari setelah dilakukan pengamatan penurunan kadar glukosa darah pada masing-masing tikus, dilakukan pengambilan organ hepar pada hari ke dua puluh satu untuk selanjutnya dibuat preparat histopatologinya. Pengambilan organ diawali dengan menganastesi tikus menggunakan cara dislokasi pada antara os. *Cervicalis I* dan *II*, kemudian tikus dibedah dan diambil organ hatinya. Organ yang diperoleh kemudian difiksasi kedalam formalin 10% sebelum akhirnya dibuat preparat histopatologi dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE), untuk pemeriksaan secara mikroskopis. Cara pembuatan preparat histopatologi hati tikus (*Rattus novergicus*) dapat dilihat pada Gambar 8. Pembuatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

8.9 Pemeriksaan preparat histopatologi. Pemeriksaan preparat

histopatologi dilakukan dengan menilai kerusakan hati tikus yang digambarkan oleh nekrosis dan degenerasi dari masing-masing perlakuan. Pengamatan dilakukan pada lima lapang pandang yang berbeda. Dimulai dari bagian kiri dan kanan, kemudian dilanjutkan ke bagian atas, bagian bawah, dan bagian tengah dari preparat histopatologi hepar dengan menggunakan metode skoring dari Mordue (2001), yang telah dimodifikasi yaitu dengan cara mengamati satu lapang pandang yang dibagi menjadi 4 bagian, jika satu bagian terdapat satu sel yang mengalami nekrosis dan degenerasi, maka bagian yang diamati tersebut diberi skor 1, jika degenerasi atau nekrosis yang terjadi pada dua bagian dari satu lapang pandang tersebut, maka bagian tersebut diberi skor 2, jika degenerasi atau nekrosis terjadi pada ketiga bagian dari satu lapang pandang tersebut, maka bagian tersebut diberi skor 3, jika pada keempat bagian tersebut terdapat degenerasi atau nekrosis, maka satu lapang pandang tersebut diberi skor 4. Penilaian tingkat kerusakan pada hati dalam satu lapang pandang dapat menggunakan metode skoring Mordue (2001), berdasarkan terjadinya degenerasi dan nekrosis pada Tabel 1.

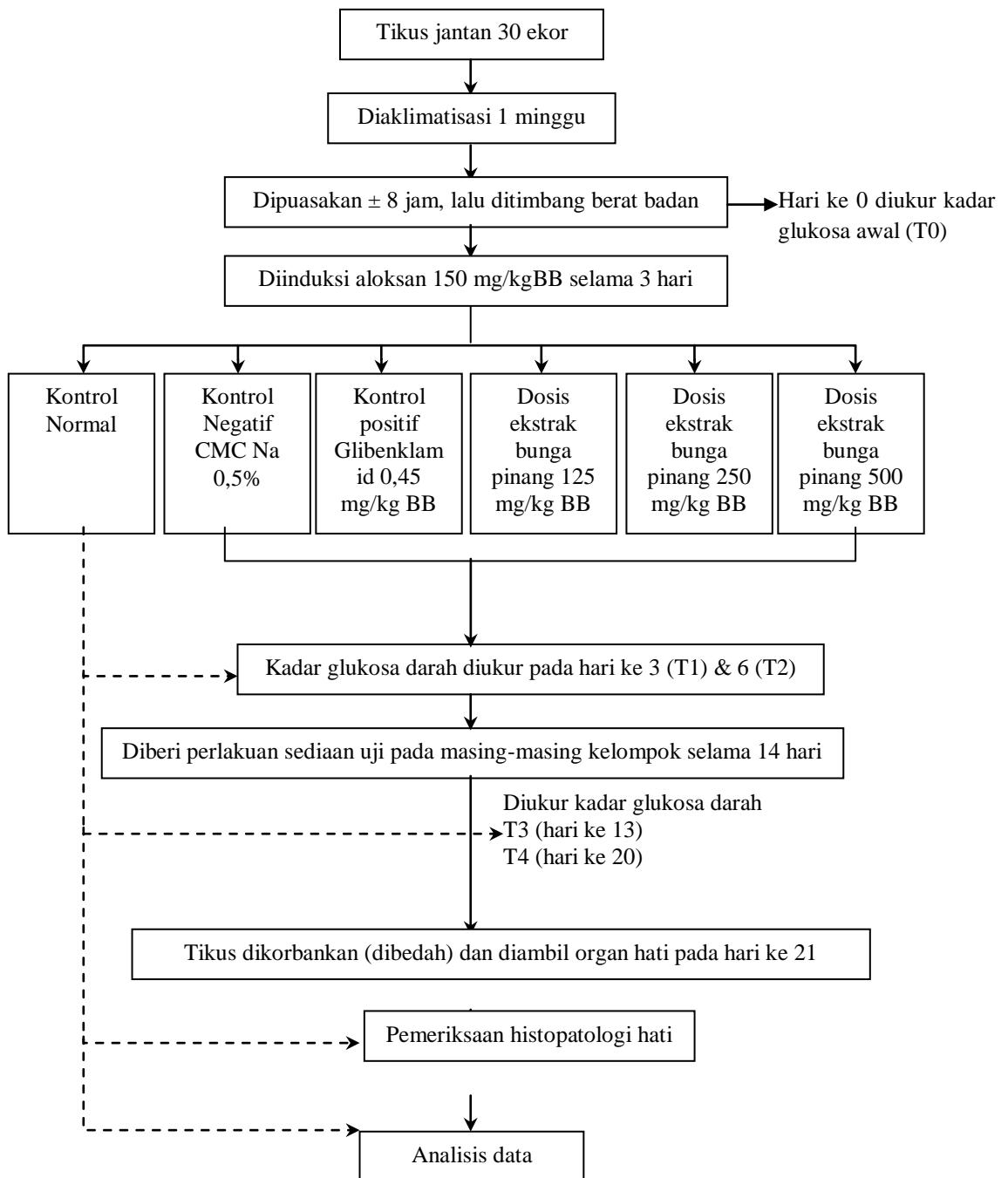
Tabel 1. Skor penilaian derajat histopatologi hepatosit (Mordueet al. 2001).

Skor	Penampakan histopatologi hepatosit
0	Satu lapang pandang tidak dijumpai degenerasi dan nekrosis pada bagian yang diamati
1	Satu lapang pandang dijumpai 1-20% degenerasi dan nekrosis pada bagian yang diamati
2	Satu lapang pandang dijumpai 21-50% degenerasi dan nekrosis pada bagian yang diamati
3	Satu lapang pandang dijumpai 51-75% degenerasi dan nekrosis pada bagian yang diamati
4	Satu lapang pandang dijumpai lebih dari 75% degenerasi dan nekrosis pada bagian yang diamati

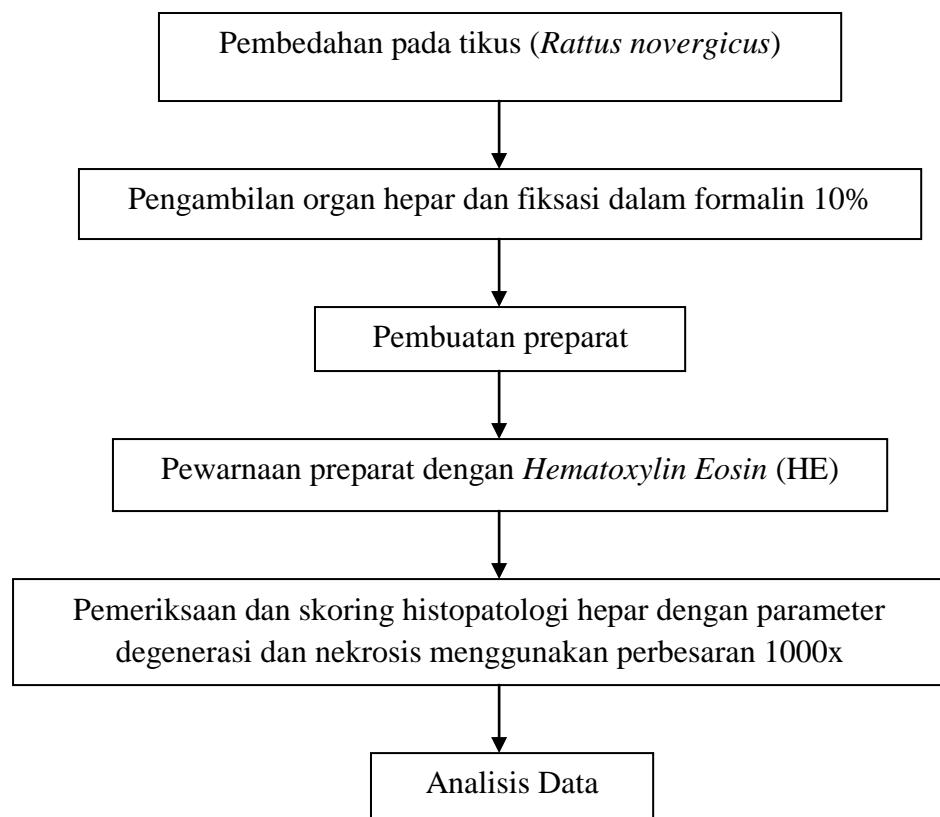
E. Analisis Hasil

Analisis data yang diperoleh dari pada penelitian ini merupakan data yang dianalisa secara statistik untuk mendapatkan dosis yang paling efektif sebagai antihiperglikemia untuk menurunkan kadar glukosa serum darah tikus. Pengolahan data dilakukan dengan melihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji distribusi normal (*Kolmogorov-Smirnov*), jika data terdistribusi normal ($p>0,05$). Jika varian data terbukti homogen, dilanjutkan dengan uji parametrik *one-way ANOVA* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan atau tidak di antara perlakuan. Jika hasil uji terdapat perbedaan yang signifikan ($p<0,05$), maka dilanjutkan dengan uji *Tukey Post Hoc Test* dengan *Multiple Comparison* dan *Homogenous Subsets*. Uji *Post Hoc Test* digunakan untuk melihat apakah ada perbedaan di antara masing-masing kelompok perlakuan. Ekstrak etanol bunga pinang dan glibenklamid dinyatakan memiliki efek antidiabetes, apabila kadar glukosa darah pada tikus setelah mendapatkan perlakuan dengan ekstrak etanol bunga pinang dan glibenklamid pada hari ke-6,13, dan 20 lebih rendah daripada sebelum perlakuan ($p<0,5$).

F. Skema Penelitian



Gambar 2. Skema prosedur pengujian kadar glukosa darah.



Gambar 3. Diagram pemeriksaan dan penilaian histopatologi hati.

