

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis Dan Desain Penelitian

1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan sebuah penelitian eksperimental metode *true experimental* dengan *prepost control group design*. Pengambilan sampel dilakukan dengan panduan WHO terkait penggunaan hewan uji coba minimal 5 kelompok masing-masing tiap kelompok terdiri atas 3 ekor mencit jantan.

2. Desain Penelitian

Desain penelitian adalah rancangan eksperimental dengan variasi waktu menggunakan kelompok kontrol untuk menguji hipoglikemik pada mencit jantan. Percobaan ini diberikan ekstrak etanol buah bidara dengan pemberian aloksan terlebih dahulu melalui intraperitoneal. Lima belas ekor mencit jantan dikelompokkan atas 5 kelompok masing- masing tiap kelompok terdiri atas 3 ekor mencit jantan. Masing-masing kelompok diberikan zat uji melalui oral. Kadar glukosa darah mencit jantan diperiksa di hari pertama, ke 3, 6, 9 dan 12.

Mencit kelompok I diberikan suspensi CMC 0,5%. Suspensi 0,5% merupakan kontrol negatif. Kelompok II diberikan glibenclamid 5mg, dalam penelitian ini merupakan kontrol positif. Kelompok III, IV dan V diberikan ekstrak etanol buah bidara melalui oral. Masing- masing kelompok mencit diberikan dosis bervariasi ekstrak etanol buah bidara.

B. Lokasi Dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Farmakologi Jurusan Farmasi Poltekkes Kemenkes Madan.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan dimulai dari bulan Maret sampai Juni 2025.

C. Populasi Dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini mencakup seluruh buah bidara yang ada.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah buah bidara yang diambil dengan teknik *Purposive Sampling* tanpa memperhatikan tempat dan lokasi geografisnya. Sampel berasal dari Desa Batang Kuis, Kecamatan Medan.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah beaker glass 100 ml, batang pengaduk, kertas saring, botol 100 ml, gelas ukur 100 ml, glukometer, gunting, kain flanel, lumpang dan stamper, neraca analitik, oral needle, spuit 1 ml dan 3 ml, strip cek gula darah, stopwatch, timbangan analitik.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi ekstrak buah biadara, etanol 70%, glibenklamid, aloksan dan suspensi CMC-0,5%.

E. Persiapan Hewan Penelitian

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus*) dengan kondisi sehat yang diperoleh dari peternakannya. Jumlah mencit jantan yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 15 ekor dengan berat badan 20-30 gram.

Mencit jantan dewasa dengan berat mulai dari 20 hingga 30 gram, sebanyak 15 ekor digunakan dalam penelitian ini. Hewan dibagi menjadi lima kelompok masing – masing tiga ekor

1. Pembuatan dan Pembersihan Kandang Mencit

Kandang mencit dibuat sebanyak 5 buah yang terbuat dari kayu dengan dinding atasnya dibuat dari kawat kasa, kemudian kandang dibersihkan.

2. Penempatan Mencit

Setelah kandang mencit dibersihkan, selanjutnya diberi penomoran pada ekor mencit kemudian dimasukkan kedalam kandang masing-masing 3 ekor mencit.

3. Pengadaptasian Mencit

Adaptasikan mencit selama 1 minggu, beri makanan dan minuman yang baik dan serta lingkungan yang baik.

4. Sebelum hewan uji digunakan untuk percobaan, puasakan mencit (tidak diberikan makanan) hanya diberikan air minum saja selama 8 jam.

F. Pembuatan Sediaan

1. Pembuatan Simplisia

Persiapan simplisia sebanyak 2 kg buah bidara segar disortasi basah untuk menghindari bahan-bahan asing dan pengotor dari buah bidara. Buah bidara dicuci dengan air bersih hingga benar-benar bersih. buah bidara yang sudah dicuci bersih kemudian dikeringkan menggunakan lampu pijar, lalu kembali dilakukan sortasi kering untuk menghindari bahan-bahan lain serta kotoran yang masih tertinggal. buah yang sudah kering selanjutnya diserbukkan dengan menggunakan blender. Hasil serbuk kemudian ditimbang kemudian dimaserasi dengan etanol 70%.

2. Pembuatan Ekstrak Buah Bidara

Buah bidara di ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% Perhitungan cairan penyari:

Menurut Farmakope Herbal Indonesia Edisi II halaman 531 yaitu:

$$BJ \text{ etanol } 70\% = 0,8860-0,8883 \text{ g/ml.}$$

$$BJ \text{ Rata-rata} = 0,8871 \text{ g/ml}$$

Serbuk simplisia yang di timbang 10 bagian misalkan beratnya 200 gram. Berat untuk 100 bagian simplisia adalah:

$$V = \frac{100}{10} \times 200 \text{ gram} = 2000 \text{ gram}$$

Maka cairan penyari yang digunakan untuk 100 bagian simplisia adalah:

$$V = \frac{m}{bj} = \frac{2000 \text{ gram}}{0,8871 \text{ gram/ml}} = 2.254 \text{ ml}$$

$$\text{Cairan penyari 75 bagian} = \frac{75}{100} \times 2.254 \text{ ml} = 1.690 \text{ ml}$$

$$\text{Cairan penyari 25 bagian} = \frac{25}{100} \times 2.254 \text{ ml} = 563,5 \text{ ml}$$

Timbang 200 gram simplisia buah bidara yang telah dihaluskan. Lalu dimaserasi selama lima hari menggunakan 75 bagian sebanyak 1.690 ml etanol 70%, tutup rapat dan simpan di tempat gelap (terlindung dari cahaya) sambil diaduk minimal tiga kali. Setelah lima hari, serkai meggunakan kain flanel. Ampas serkaian dicampurkan pada etanol lalu direndam kembali selama dua hari dengan meggunakan 25 bagian sebanyak 563,5 ml etanol 70%. Setelah dicampurkan, langkah berikutnya adalah meggunakan Rotary evaporator untuk memekatkan maserasi, yang akan meghasilkan ekstrak kental.

3. Perhitungan Pemberian Ekstrak Etanol Buah Bidara (EEBB)

a. Suspensi ekstrak etanol buah bidara dosis = 100mg/kg BB

$$\text{Ekstrak untuk seekor mencit (25g)} = \frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 25 \text{ g} = 2,5 \text{ mg}$$

Volume yang dibutuhkan = mencit x volume pemberian x lama pemberian

$$= 3 \text{ ekor} \times 0,2 \text{ ml} \times 1 \text{ hari} = 0,6 \text{ ml}$$

Volume yang dibuat = 10 ml

$$\text{Ekstrak yang ditimbang} = \frac{2,5 \text{ mg}}{0,2 \text{ ml}} \times 10 \text{ ml} = 125 \text{ mg}$$

Jadi, EEBB ditimbang sebanyak 125 mg disuspensikan dalam CMC 0,5% hingga 10 ml.

b. Suspensi ekstrak etanol buah bidara dosis = 200mg/kg BB

$$\text{Ekstrak untuk seekor mencit (25g)} = \frac{200 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 25 \text{ g} = 5 \text{ mg}$$

Volume yang dibutuhkan = mencit x volume pemberian x lama pemberian

$$= 3 \text{ ekor} \times 0,2 \text{ ml} \times 1 \text{ hari} = 0,6 \text{ ml}$$

Volume yang dibuat = 10 ml

$$\text{Ekstrak yang ditimbang} = \frac{5 \text{ mg}}{0,2 \text{ ml}} \times 10 \text{ ml} = 250 \text{ mg}$$

Jadi, EEBB ditimbang sebanyak 250 mg disuspensikan dalam CMC 0,5% hingga 10 ml.

c. Suspensi ekstrak etanol buah bidara dosis = 400mg/kg BB

$$\text{Ekstrak untuk seekor mencit (25g)} = \frac{400 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 25 \text{ g} = 10 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume yang dibutuhkan} &= \text{mencit} \times \text{volume mencit} \times \text{lama pemberian} \\ &= 3 \text{ ekor} \times 0,2 \text{ ml} \times 1 \text{ hari} = 0,6 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\text{Volume yang dibuat} = 10 \text{ ml}$$

$$\text{Ekstrak yang ditimbang} = \frac{10 \text{ mg}}{0,2 \text{ ml}} \times 10 \text{ ml} = 500 \text{ mg}$$

Jadi, EEBB ditimbang sebanyak 500 mg disuspensikan dalam CMC 0,5% hingga 10 ml.

4. Ekstrak Etanol Buah Bidara

Masing masing dosis buah bidara diberikan sebanyak 0,2 ml untuk setiap 25g bobot mencit putih.

Untuk mencit yang memiliki bobot berbeda diberikan dengan rumus :

$$\frac{\text{berat mencit (g)}}{25 \text{ g}} \times 0,2 \text{ ml} = x \text{ ml}$$

5. Pembuatan Suspensi CMC 0,5%

Untuk membuat suspense CMC 0,5% yaitu:

$$= \frac{0,5 \text{ gram}}{100 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml} = 0,5 \text{ gram} = 500 \text{ mg}$$

Sebanyak 0,5 g CMC ditaburkan ke dalam lumpang yang telah berisi aquadest panas sebanyak 10 ml, biarkan selama 15 menit, kemudian digerus hingga diperoleh massa yang transparan, lalu diencerkan dengan aquadest. Kemudian dimasukkan kedalam wadah, cukupkan dengan aquadest hingga 100 ml.

6. Pembuatan Larutan Suspensi Aloksan

Aloksan umumnya digunakan dalam penelitian hewan untuk menginduksi diabetes, dengan dosis bervariasi antara 40-200 mg/kg berat badan (Hasim *et al.*, 2020). Dosis Aloksan yang digunakan adalah 200 mg/Kg BB

Diasumsikan berat badan satu ekor mencit adalah 25 g.

Volume pemberian sediaan untuk satu ekor mencit adalah 0,2 ml.

Jumlah mencit yang diinduksi aloksan sebanyak 15 ekor.

$$\text{Aloksan untuk seekor mencit (25g)} = \frac{200 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 25 \text{ g} = 5 \text{ mg}$$

Volume yang dibutuhkan = mencit x volume pemberian tiap ekor mencit
= 15 ekor x 0,2 ml = 3 ml

$$\text{Aloksan yang ditimbang} = \frac{5 \text{ mg}}{0,2 \text{ ml}} \times 3 \text{ ml} = 75 \text{ mg}$$

Jadi, aloksan yang ditimbang sebanyak 75 mg dilarutkan dalam CMC 0,5% hingga 3 ml.

7. Perhitungan Dosis Larutan Suspensi Glibenklamid

Dosis glibenklamid untuk manusia = 5mg/tab

Konversi dari manusia ke mencit 20g = 0,0026

Dosis Glibenklamid untuk mencit 20g = 5mg x 0,0026 = 0,013 mg

Glibenklamid untuk tiap kg BB mencit = $\frac{0,013 \text{ mg}}{25 \text{ g}} \times 1000 \text{ mg} = 0,52 \text{ mg}$

Jadi dosis glibenklamid yang digunakan adalah 0,52 mg

Diasumsikan berat badan satu ekor mencit adalah 25 g

Volume pemberian sediaan untuk satu ekor mencit adalah 0,2 ml.

Jumlah mencit yang diberi glibenklamid adalah 3 ekor mencit

Volume yang dibutuhkan = banyak mencit x volume pemberian

$$= 3 \text{ ekor} \times 0,2 \text{ ml} = 0,6 \text{ ml}$$

$$\text{Volume yang dibuat} = 10 \text{ ml}$$

$$\text{Bobot 20 tablet} = 4291 \text{ mg}$$

$$\text{Bobot 1 tablet} = \frac{4291 \text{ mg}}{20} = 214,5 \text{ mg}$$

$$= \frac{214,5 \text{ mg}}{5 \text{ mg}} \times 0,52 \text{ mg} = 22,30 \text{ mg}$$

Jadi tablet yang ditimbang sebanyak 22,30 mg disuspensikan dalam CMC 0,5% hingga 10 ml.

G. Prosedur Kerja

1. Kelompok Perlakuan

Hewan percobaan dibagi dalam 5 kelompok sesuai dengan perlakuan masing-masing.

Kelompok I (Kontrol Negatif)	: 3 ekor
Kelompok II (Kontrol Positif)	: 3 ekor
Kelompok III (Dosis EEBB 100mg/kgBB)	: 3 ekor
Kelompok IV (Dosis EEBB 200mg/kgBB)	: 3 ekor
Kelompok V (Dosis EEBB 400mg/kgBB)	: 3 ekor

2. Prosedur Kerja

- a. Selama 1 minggu dilakukan adaptasi hewan percobaan.
- b. Hewan percobaan dibagi menjadi 5 kelompok dan masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor mencit jantan.
- c. Masing-masing kelompok mencit jantan ditimbang terlebih dahulu berat badannya.
- d. Puasakan semua mencit selama 8 jam (hanya di beri minum) sebelum dilakukan percobaan dilakukan pengukuran kadar glukosa darah puasa (KGDP).
- e. Kelompok I, II, III, IV, dan V diberikan suspensi aloksan sebagai penginduksi secara intraperitoneal pada hari pertama setelah diukur kadar glukosa puasa.
- f. Tunggu hingga hari ke-3 kemudian lakukan pengukuran kadar glukosa hipergikemik. Sebelum melakukan pengukuran puasakan mencit selama 8 jam (hanya di beri minum).
- g. Jika semua mencit dinyatakan hipergikemik selanjutnya diberikan perlakuan.
- h. Pada kelompok I hanya diberikan CMC 0,5% sebanyak 0,2 ml sebagai kontrol negatif.
- i. Pada kelompok II diberikan suspensi glibenklamid 5mg sebanyak 0,2 ml/mencit secara oral sebagai kontrol positif.
- j. Untuk kelompok III diberikan EEBB Dosis 100 mg/kgBB sebanyak 0,2 ml/mencit secara oral, lakukan pengecekan kembali pada hari ke-6 jika belum dinyatakan hipoglikemik berikan kembali ekstrak 100 mg/kgBB.
- k. Untuk kelompok IV diberikan EEBB Dosis 200 mg/kgBB sebanyak 0,2 ml/mencit secara oral, lakukan pengecekan kembali pada hari ke-6 jika belum dinyatakan hipoglikemik berikan kembali ekstrak 200 mg/kgBB.

- l. untuk kelompok V diberikan EEBB Dosis 400mg/kgBB sebanyak 0,2 ml/mencit secara oral, lakukan pengecekan kembali pada hari ke-6 jika belum dinyatakan hipoglikemik berikan kembali ekstrak 400 mg/kgBB.
- m. Lakukan pengecekan pada setiap kelompok dihari ke 3, 6, 9 dan 12. Jika sudah terjadi penurunan atau sudah mencapai hipoglikemik hentikan perlakuan.

3. Cara Mengukur Kadar Glukosa Mencit

- a. Siapkan alat *glukometer* terlebih dahulu, pastikan alat dalam keadaan On dan menggunakan strip untuk mengukur kadar glukosa.
- b. Bersihkan ekor mencit dengan alkohol swab.
- c. Potong sedikit bagian ujung ekor mencit.
- d. Tetesan darah diaplikasikan ke strip reagen yang terpasang pada alat glukometer.
- e. Tunggu sampai terdengar bunyi “tit” yang menunjukkan bahwa sampel darah sudah cukup dan sedang di proses hingga terlihat angka pada layar glukometer sebagai kadar gula darah tersebut.

H. Analisis Data

Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan grafik dan dianalisis secara statistik dengan menggunakan metode Analisis Varian (ANOVA) untuk melihat apakah terdapat perbedaan aktivitas antihiperglikemia yang signifikan antar kelompok uji. Dasar pengambilan keputusan uji normalitas $\text{sig} > 0,05$ data berdistribusi normal dan jika $\text{sig} < 0,05$ data berdistribusi tidak normal untuk memperlihatkan perubahan kadar glukosa darah sebelum dan sesudah pemberian ekstrak etanol buah bidara (*Ziziphus mauritiana* Lam.).