

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan menggunakan hewan uji mencit diabetes yang diinduksi dengan aloksan. Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Program Studi Farmasi Universitas Sahid Surakarta pada bulan Februari hingga Maret 2023.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun salam (*Syzygium polyanthum*) yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar.

3.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu infusa daun salam (*Syzygium polyanthum*).

3.3 Instrumen Penelitian

3.3.1 Alat

Timbangan analitik (*ACIS*), glukometer (*easy touch*), panci infusa, kompor listrik, alat ukur suhu air, stopwatch, seperangkat alat gelas (*pyrex*), cawan porselin, blender, spuit 26G, sonde oral.

3.3.2 Bahan

Simplisia kering daun salam (B2P2TOOT), aloksan (*Sigma Aldrich*), Glibenklamid (*Indofarma*), CMC-Na, Lidokain krim (*Top Sy Cream*), aquabidestilasi steril for injection, aqua destilia, strip glukotest (*Easy Touch*), pakan mencit (*BR 1 Comfeed*).

3.3.3 Hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mencit jantan galur *swiss webster* sebanyak 30 mencit dengan berat 20-40 gram umur 8-12 minggu.

3.4 Variabel penelitian

3.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau menjadi sebab perubahan atau timbulnya variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah infusa daun salam (*Syzygium polyanthum*).

3.4.2 Variabel terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar gula darah mencit.

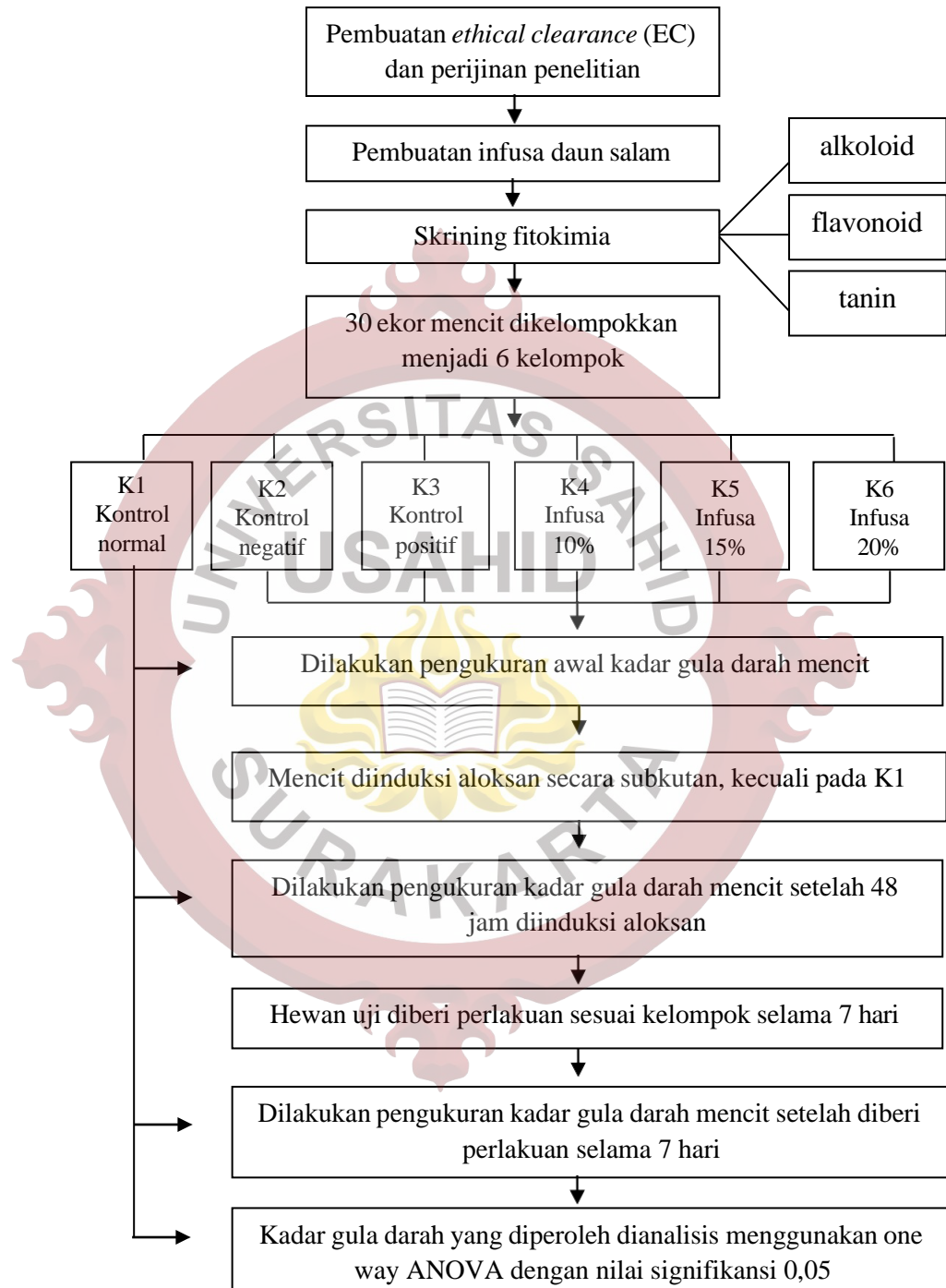
3.4.3 Variabel terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini yaitu efek antidiabetes dari infusa daun salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap kadar gula darah pada mencit yang diinduksi aloksan.

3.5 Definisi operasional

- a. Hiperglikemia adalah suatu kondisi dimana kadar gula darah melebihi normal, yaitu kadar gula darah sesaat ≥ 200 mg/dL dan kadar gula darah puasa ≥ 126 mg/dl.
- b. Infusa daun salam adalah sediaan cair yang dibuat dengan cara melarutkan simplisia kering daun salam (*Syzygium polyanthum*) dengan aquades lalu dipanaskan menggunakan panci infusa selama 15 menit terhitung pada saat suhu mencapai 90°C .
- c. Induksi aloksan adalah pemberian bahan kimia aloksan dengan cara subkutan dengan tujuan meningkatkan kadar gula darah pada hewan uji.
- d. Mencit diabetes melitus adalah mencit yang memiliki kadar gula darah puasa ≥ 126 mg/dL
- e. Mencit normal adalah mencit yang memiliki kadar gula darah puasa < 126 mg/dL
- f. Aktivitas antidiabetes adalah kemampuan senyawa yang terkandung dalam infusa daun salam (*Syzygium polyanthum*) dalam mengobati penyakit diabetes yang ditunjukkan dengan penurunan kadar gula darah.

3.6 Rencana Jalannya Penelitian



Gambar 3.1
Rencana jalannya penelitian

3.6.1 Pembuatan EC (*Ethical Clearance*)

Ethical clearance merupakan keterangan tertulis yang diberikan Komisi Etik Penelitian untuk penelitian yang menggunakan makhluk hidup. Pengajuan *ethical clearance* dilakukan di RSUD Dr. Moewardi Surakarta.

3.6.2 Determinasi Daun Salam

Determinasi dilakukan dengan cara mencocokkan tanaman daun salam dan dilakukan determinasi di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu.

3.6.3 Tahap persiapan

a. Pengambilan simplisia

Daun salam yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar.

b. Persiapan hewan uji

Sebelum diberikan perlakuan, 30 ekor mencit dilakukan adaptasi selama 7 hari di Laboratorium Farmakologi Program Studi Farmasi Universitas Sahid Surakarta. Mencit dikandangkan dalam wadah plastik berukuran 28 x 30 x 10 cm yang ditutup kawat dan dialasi dengan sekam yang diganti setiap 3 hari sekali, setiap kandang berisi 5 ekor mencit.

Kandang mencit dilatakkan pada ruangan yang bebas dari kebisingan, kebersihan terjaga, suhu 25°C, dan sirkulasi udara cukup (Rudy Agung, 2018). Mencit diberikan pakan 5 gram/ekor dan minum berupa air matang dengan cara *ad libitium*. Setelah melewati masa adaptasi mencit ditimbang berat badannya dan dipuaskan selama 12-16 jam sebelum dilakukan pengukuran kadar gula darah puasa (GDP).

3.6.4 Pembuatan infusa daun salam (*Syzygium polyanthum*)

Pembuatan infusa daun salam menggunakan daun salam berbentuk simplisia kering. Simplisia kering kemudian diserbuk, dihaluskan dan diayak dengan menggunakan ayakan no. 30.

Berat serbuk daun salam yang digunakan dalam pembuatan infusa 10% yaitu 10 gram, infusa 15% yaitu 15 gram, dan infusa 20% yaitu 20 gram. Serbuk kemudian dibasahi dengan aquades sebanyak 2× berat serbuk, selanjutnya dilarutkan dengan 90 ml aquades pada infusa 10%, 85 ml aquades pada infusa 15%, dan 80 ml aquades pada infusa 20%. Larutan selanjutnya dipanaskan dengan panci infusa selama 15 menit terhitung saat suhu telah mencapai 90°C sambil diaduk secara berkala dengan batang pengaduk. Setelah 15 menit, infusa disaring menggunakan kain flanel kemudian ditambahkan aquades panas hingga 100 ml melalui ampas.

3.6.5 Skrining fitokimia infusa daun salam

Skrining fitokimia bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa yang terkandung dalam infusa daun salam. Infusa daun salam diduga mengandung senyawa flavonoid, tanin, dan saponin, untuk membuktikan hal tersebut maka dilakukan skrining fitokimia sebagai berikut:

a. Pemeriksaan flavonoid

Infusa daun salam sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan dengan serbuk magnesium sebanyak 1 gram dan larutan asam klorida sebanyak 1 ml. Perubahan warna pada larutan menjadi warna kuning menandakan adanya senyawa flavonoid (Oktavia dkk., 2020).

b. Pemeriksaan tanin

Infusa daun salam sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan dengan 3 tetes besi (III) klorida 5%. Perubahan warna pada larutan menjadi warna biru tua menandakan adanya senyawa tanin (Oktavia dkk., 2020).

c. Pemeriksaan saponin

Infusa daun salam sebanyak 2 ml dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan air sebanyak 10 ml. Larutan kemudian dikocok dengan kuat selama 10 menit lalu didiamkan selama 10 menit. Buih atau busa yang terbentuk dan bertahan lebih dari 10 menit menunjukkan adanya saponin (Oktavia dkk., 2020).

3.6.6 Pengkondisian mencit diabetes

Mencit diinduksi dengan aloksan monohidrat dengan dosis 170 mg/kg BB yang dilarutkan dengan *aquabidestilasi steril for injection* diinjeksikan secara *subkutan*. Dosis aloksan yang diberikan pada mencit standar (20 g) yaitu $20 \text{ g} / 1000 \times 170 \text{ mg/kg BB} = 3,4 \text{ mg}$. Volume maksimal injeksi subkutan pada mencit yaitu 0,5ml (Rudy Agung, 2018). Volume penyuntikan untuk mencit standar (20 g) yaitu 0,25 ml sehingga diperoleh dosis 3,4 mg/0,25ml.

Aloksan memiliki waktu paruh sekitar 1,5 menit pada pH netral dan suhu 37°C, sehingga sangat tidak stabil. Aloksan apabila dilarutkan dengan aquades akan mudah berubah menjadi asam aloksanat yang bersifat nondiabetogenik (Oshkondali dkk., 2019). Larutan aloksan dibuat secara bertahap dengan cara melarutkan 30 mg aloksan dengan 2,5 ml *aquabidestilasi steril for injection* untuk 5 ekor mencit dan diulangi hingga semua mencit terinduksi aloksan.

Pengukuran kadar gula darah puasa (GDP) dilakukan sebelum mencit diinduksi aloksan, 48 jam setelah diinduksi aloksan mencit kembali diukur kadar gula darah puasa (GDP). Kadar gula darah mencit apabila sudah mengalami kenaikan $\geq 126 \text{ mg/dL}$ maka mencit dinyatakan mengalami diabetes dan segera

diberi perlakuan pemberian infusa daun salam secara oral selama 7 hari.

3.6.7 Prosedur pelaksanaan penelitian

Tiga puluh ekor mencit jantan dikelompokkan secara acak menjadi 6 kelompok. Semua kelompok diinduksi dengan aloksan kecuali pada kelompok I. Kelompok I merupakan kontrol normal tanpa perlakuan, Kelompok II merupakan kontrol negatif diberikan perlakuan berupa aquadest, kelompok III merupakan kontrol positif diberikan glibenklamid dengan dosis 0,013 mg/20gram BB, kelompok IV merupakan kontrol uji diberikan infusa daun salam dengan konsentrasi 10% sebanyak 0,5 ml/20gram BB, kelompok V merupakan kontrol uji diberikan infusa daun salam dengan konsentrasi 15% sebanyak 0,5 ml/20 gram BB, dan kelompok VI merupakan kontrol uji diberikan infusa daun salam dengan konsentrasi 20% sebanyak 0,5 ml/20 gram BB. Pemberian terapi dilaksanakan selama 7 hari.

3.6.8 Pengukuran kadar gula darah setelah perlakuan

Pengukuran kadar gula darah mencit dilakukan sebanyak 3 kali yaitu sebelum mencit diinduksi aloksan, 48 jam setelah mencit diinduksi aloksan, dan setelah mencit diberi perlakuan selama 7 hari. Mencit dipuasakan selama 12-16 jam (tetap diberi minum) sebelum dilakukan pengukuran kadar gula darah puasa (GDP) (Nugrahani, 2012). Pengambilan darah pada mencit dilakukan di

vena lateralis ekor, sebelum dilakukan prosedur ini mencit di beri anestesi lokal lidokain krim pada ekor (Pusat penelitian dan Pengembangan Peternakan, 2016).

Pengukuran kadar gula darah dilakukan dengan menggunakan glukometer. Strip glukotest dipersiapkan untuk mengukur. Sampel darah mencit diambil dengan cara mencit diletakkan pada sungkup, kemudian ujung ekor dilukai dan diambil darahnya lalu ditetaskan pada strip glukotest. Hasil perhitungan kadar gula darah yang terbaca pada glukometer dicatat sebagai data.

3.6.9 Pengumpulan data

Data diperoleh dari pengukuran kadar gula darah puasa (GDP) pada mencit. Pengukuran kadar gula darah dilakukan sebanyak 3 kali, yaitu pada saat mencit belum diinduksi aloksan, 48 jam setelah mencit diinduksi aloksan, dan setelah mencit diberi perlakuan selama 7 hari.

3.6.10 Pengolahan data

Pengolahan data dalam penelitian ini yaitu data yang diperoleh dimasukkan ke bagian form yang sudah dibuat. Data kadar gula darah sebelum perlakuan dan sesudah perlakuan kemudian dibandingkan untuk mengetahui pengaruh pemberian perlakuan selama 7 hari.

3.7 Analisis data

Setelah data diperoleh selanjutnya dilakukan analisis data secara komputerisasi yaitu dengan SPSS. Penelitian ini merupakan analitik numerik dan terdapat lebih dari 2 kelompok maka dilakukan uji *oneway annova*. Sebelum dilakukan uji *oneway annova* terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Jika hasil terdistribusi normal dan homogen selanjutnya dilakukan uji *oneway annova* dengan nilai signifikansi 0,05.

