

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak batang brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Hook.f. & Thomson) sebagai antihiperqlikemik. Pada penelitian ini, dilakukan beberapa tahapan yang diantaranya pengurusan izin kode etik penelitian, determinasi, pembuatan ekstrak, skrining fitokimia, pengujian antihiperqlikemik dan analisa data.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Februari sampai Mei 2023 di laboratorium Farmakologi dan Toksikologi, Biologi Farmasi, dan Kimia Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Pelita Harapan. Pengambilan sampel batang brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Hook.f. & Thomson) dilakukan di Desa Umas Jaya, Kecamatan Terbanggi Besar, Kabupaten Lampung Tengah, Lampung. Objek penelitian, yaitu mencit jantan (*Mus musculus*) galur Balb/C diambil dari Yogyakarta.

#### **3.3 Sampel Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada sampel batang tumbuhan brotowali yang didapat dari Desa Umas Jaya, Kecamatan Terbanggi Besar, Kabupaten Lampung

Tengah, Lampung. Objek yang digunakan untuk penelitian ini berupa hewan uji mencit jantan (*Mus musculus*) galur Balb/C yang dipesan melalui pihak kedua dari daerah Yogyakarta.

### **3.3.1 Kriteria Inklusi**

Kriteria inklusi objek penelitian yang diinginkan adalah sebagai berikut:

- 1) Mencit jantan (*Mus musculus*) galur Balb/C
- 2) Mencit sehat
- 3) Mencit berumur 2-3 bulan
- 4) Berat badan 20-40 gram

Kriteria inklusi sampel batang brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Hook.f. & Thomson) yang diinginkan adalah sebagai berikut:

- 1) Batang berwarna hijau dan tampak muda

### **3.3.2 Kriteria Eksklusi**

Kriteria eksklusi objek penelitian yang diinginkan adalah sebagai berikut:

- 1) Mencit sakit
- 2) Mencit mati pada saat pengujian
- 3) Mencit obesitas (berat badan berlebih)

Kriteria eksklusi sampel batang brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Hook.f. & Thomson) yang diinginkan adalah sebagai berikut:

- 1) Batang busuk

### **3.3.3 Cara Pengambilan Hewan Uji**

Pengambilan hewan dilakukan dengan cara melakukan pengelompokan mencit yang memiliki rentang berat badan 20 gram dengan umur 2-3 bulan, 30 gram

dengan umur 2-3 bulan dan 40 gram dengan umur 2-3 bulan. Hal ini dilakukan untuk menghindari ketidaksesuaian hewan uji karena faktor variasi umur dan berat badan. Pengambilan hewan uji dapat langsung dilakukan karena sampel telah memenuhi kriteria inklusi dan memenuhi kriteria eksklusi sehingga dianggap cukup homogen.

### 3.3.4 Populasi sampel

Objek yang diteliti aktivitas antihiperghlikemik dalam penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus*) galur Balb/C yang memenuhi kriteria inklusi yang telah ditetapkan oleh peneliti. Besar hewan uji ditentukan dengan rumus *Federer* untuk uji eksperimental sebagai berikut:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

Penentuan besar sampel dengan perhitungan menggunakan rumus *federer* dengan keseluruhan kelompok berjumlah  $\geq 15$  hewan uji. Dimana t merupakan jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah hewan uji tiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampel menjadi:

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \sim 5$$

Jadi, hewan uji yang digunakan tiap kelompok percobaan yaitu sebanyak 5 ekor. Apabila ada kemungkinan terjadi drop out yang besarnya 10% maka besar hewan uji dengan koreksi drop out adalah:

$$n_{do} = \frac{n}{1-d_0} = \frac{5}{1-0,1} = 5,56 \sim 6$$

Hewan uji pada penelitian ini akan dibagi menjadi 5 kelompok yang diantaranya sebagai berikut:

Kelompok I : Kelompok kontrol negatif yang diberikan CMC-Na 1%

Kelompok II : Kelompok kontrol positif yang diberikan Metformin 65 mg/KgBB mencit

Kelompok III : Kelompok mencit yang diberikan ekstrak batang brotowali (*Tinospora crista* (L.) Hook.f. & Thomson) dosis 100 mg/KgBB mencit

Kelompok IV : Kelompok mencit yang diberikan ekstrak batang brotowali (*Tinospora crista* (L.) Hook.f. & Thomson) dosis 300 mg/KgBB mencit

Kelompok V : Kelompok mencit yang diberikan ekstrak batang brotowali (*Tinospora crista* (L.) Hook.f. & Thomson) dosis 500 mg/KgBB mencit

Penentuan dosis ekstraksi ditinjau berdasarkan pada penelitian sebelumnya, bahwa dosis ekstrak batang brotowali (*Tinospora crista* (L.) Hook.f. & Thomson) yang dapat menimbulkan efek penurunan glukosa darah yaitu sebesar 2,6 mg/20 gBB mencit (Krisnawati, 2020). Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah Metformin 1,3 mg/20 gBB mencit yang berfungsi sebagai pembanding yang akan memberikan hasil positif dapat menurunkan kadar glukosa

darah. Metformin dapat digunakan sebagai kontrol positif, seperti penelitian yang telah dilakukan sebelumnya (Syamsul *et al.*, 2011).

### **3.4 Variabel Penelitian**

#### **3.4.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etil asetat Batang Brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Hook.f. & Thomson).

#### **3.4.2 Variabel Tidak Bebas**

Variabel tidak bebas dalam penelitian ini adalah kadar glukosa darah pada mencit jantan (*Mus musculus*) galur Balb/C.

#### **3.4.3 Variabel Terkendali**

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah suhu, pakan, berat badan mencit, umur mencit, dosis induksi, dan pengaturan cahaya.

#### **3.4.4 Variabel Tidak Terkendali**

Variabel tidak terkendali dalam penelitian ini adalah stres akibat adaptasi lingkungan, penyakit pada bagian organ dalam mencit, imunitas mencit, variasi kepekaan mencit terhadap obat dan konsentrasi ekstrak yang diberikan.

### **3.5 Metode Kerja**

#### **3.5.1 Alat dan Bahan**

Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah beaker glass, erlenmeyer, gelas ukur, spatula, cawan penguap, corong, batang pengaduk, pipet tetes, pipet ukur, gunting, kandang pemeliharaan hewan, timbangan analitik, rotary

evaporator, Easy Touch GCU, blender, alat sonde peroral, spuit injeksi, *handscoon*, tissue, serbet, pisau bedah, dan masker

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Batang Brotowali (*Tinospora crispera* (L.) Hook.f. & Thomson), Metformin, Aloksan, Etil Asetat, makanan mencit, sekam, kertas saring, label, aluminium foil, Aquadest, HCl, serbuk magnesium, Pereaksi Mayer, Pereaksi Dragendroff, FeCl<sub>3</sub>, NaOH, dan CMC-Na.

### **3.5.2 Izin Etik Penelitian**

Model penelitian ini menggunakan hewan uji untuk dilakukannya analisa dalam mengetahui aktivitas, dalam hal tersebut hewan uji yang digunakan yaitu mencit jantan (*Mus musculus*) galur Balb/C. Umumnya untuk penelitian dengan model hewan uji membutuhkan izin kode etik. Izin kode etik pada penelitian ini dilakukan oleh Komisi Etik Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Pelita Harapan.

### **3.5.3 Determinasi**

Sampel tumbuhan Batang Brotowali (*Tinospora crispera* (L.) Hook.f. & Thomson) akan dilakukan determinasi untuk mengetahui identifikasinya. Tempat dilakukannya determinasi tumbuhan di Badan Riset BRIN, Cibinong, Bogor.

### **3.5.4 Cara Kerja**

#### **1) Pembuatan Simplisia Batang Brotowali (*Tinospora crispera* (L.) Hook.f. & Thomson)**

Batang brotowali (*Tinospora crispera* (L.) Hook.f. & Thomson) yang diambil di wilayah Desa Umas Jaya, Kecamatan Terbanggi Besar, Kabupaten Lampung Tengah, Lampung kemudian dikirim ke Tangerang melalui ekspedisi

dengan waktu perjalanan selama satu hari. Batang brotowali yang akan digunakan diperkirakan sebanyak  $\pm 5$  kg. Batang brotowali yang telah diambil kemudian dipisahkan dari kulit batangnya dan dilakukan sortasi basah untuk menghindari sisa-sisa kotoran yang masih menempel pada bagian batang.

Batang brotowali yang telah disortasi basah lalu dicuci dengan air bersih yang mengalir dan kemudian ditiriskan untuk menghilangkan sisa air dari proses pencucian. Batang brotowali kemudian dirajang kecil-kecil lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan atau tidak di bawah sinar matahari langsung. Simplisia batang brotowali yang telah kering kemudian di sortasi kering untuk memisahkan kotoran yang masih tertinggal di simplisia kering. Tahap selanjutnya, simplisia kering tersebut diblender hingga menjadi simplisia serbuk.

## **2) Pembuatan Ekstrak etil asetat batang brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Hook.f. & Thomson)**

Ekstrak Etil Asetat batang brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Hook.f. & Thomson) dalam penelitian ini dibuat dengan menggunakan metode maserasi. Batang brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Hook.f. & Thomson), yang telah diperoleh dalam bentuk serbuk simplisia dimaserasi dengan menggunakan pelarut etil asetat, dimasukkan kedalam wadah, ditutup dan didiamkan selama 24 jam tanpa terkena cahaya. Setelah didiamkan selama 24 jam, kemudian disaring menggunakan kertas saring sehingga didapat maserat. Maserat kemudian dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45°C sampai diperoleh ekstrak kental dan disimpan di dalam kulkas dengan suhu 10°C (Ikalinus, Widyastuti, & Setiasih,

2015). Setelah diperoleh ekstrak kental, kemudian dilakukan perhitungan rendemen dari sampel dengan cara berikut (Kuswati & Nurmita, 2017):

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel segar}} \times 100\%$$

### **3) Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Batang Brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Hook.f. & Thomson)**

#### **a) Uji Alkaloid**

Sebanyak 10 mL larutan uji + 5 mL HCl 2N, dibagi menjadi 3 tabung reaksi. Tabung pertama sebagai blanko, tabung kedua ditambah pereaksi Dragendroff, dan tabung ketiga ditambah pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan orange pada tabung kedua dan endapan putih hingga kekuningan pada tabung ketiga menunjukkan adanya alkaloid (Priamsari & Yuniawati, 2019).

#### **b) Uji Fenol**

FeCl<sub>3</sub> 1% ditambahkan dengan Ekstrak etil asetat batang brotowali hingga terjadi perubahan warna, lalu warnanya dibandingkan dengan ekstrak murni, maka akan tampak warna lebih hitam jika positif. Derajat disesuaikan dengan perubahan warna yang terjadi (Ikalinus *et al.*, 2015).

#### **c) Uji Flavonoid**

Sebanyak 2 mL larutan uji + 2 mL etanol + 0,5 g serbuk Mg + 3 tetes HCl (pekat). Terbentuk larutan berwarna merah-jingga menunjukkan adanya flavonoid (Priamsari & Yuniawati, 2019).

#### **d) Uji Saponin**

Sebanyak 0,1 g ekstrak + 10 mL air panas, dinginkan, kocok 15 menit + 2 tetes HCl 2N. Terbentuk buih selama 10 menit menunjukkan adanya saponin (Priamsari & Yuniawati, 2019).

**e) Uji Tanin**

Sebanyak 2 mL larutan uji + 1mL FeCl<sub>3</sub> 10%. Jika terbentuk warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa tannin (Priamsari & Yuniawati, 2019).

**f) Uji Triterpenoid dan Steroid**

Uji triterpenoid dan steroid dilakukan dengan cara larutan ekstrak ditimbang sebanyak 0,1 gram dilarutkan dalam eter selama 2 jam. Kemudian diberi 2 tetes anhidrida asam asetat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Terbentuknya warna biru/hijau menunjukkan adanya steroid sedangkan terbentuknya warna merah/ungu menunjukkan adanya triterpenoid (Nopitasari *et al.*, 2017).

**g) Uji Quinon**

Ekstrak ditimbang sebanyak 0,1 gram dilarutkan dengan Etanol 70% dan ditambahkan NaOH 1 N secukupnya. Sampel positif mengandung senyawa quinon apabila terbentuk warna kuning hingga merah (Susanti, Budiman, & Warditiani, 2014).

**4) Cara Pembuatan Larutan Alokasan**

Sebanyak 437,5 mg Aloksan monohidrat ditimbang dan dilakukan pembuatan larutan menggunakan NaCl 0,9% dengan volume hingga 25 mL dalam labu terukur (Amir *et al.*, 2020).

#### **5) Cara Pembuatan Suspensi Glukosa**

Sebanyak 10.875 mg Glukosa ditimbang dan digerus hingga serbuk menjadi halus. Selanjutnya serbuk dilakukan pembuatan suspensi dengan cara menambahkan cairan CMC Na 1% sedikit demi sedikit sambil diaduk, lalu dicukupkan volumenya sampai 25 mL (Djuwarno & Abdulkadir, 2019).

#### **6) Cara Pembuatan Larutan CMC-Na 1%**

Sebanyak 1 g Na-CMC dimasukkan ke dalam 50 ml air suling panas sambil diaduk dengan menggunakan pengaduk elektrik hingga terbentuk larutan yang homogen, kemudian dicukupkan volumenya hingga 100 ml.

#### **7) Cara Pembuatan Suspensi Metformin**

Tablet metformin digerus dan dilakukan penimbangan sebanyak 26 mg, lalu dilakukan pensuspensian dengan menggunakan CMC Na 1% dan dicukupkan volumenya sebanyak 60 mL (Djuwarno & Abdulkadir, 2019). Pada penelitian (Syamsul, Nugroho, & Pramono, 2011), Metformin yang digunakan yaitu dengan dosis 1,3 mg/20 gBB mencit.

#### **8) Cara Pembuatan Sediaan Ekstrak Batang Brotowali (*Tinospora crispa* L)**

Ekstrak batang brotowali dilakukan pembuatan sediaan dalam bentuk sediaan larutan untuk memudahkan pemberian kepada hewan uji. Pembuatan larutan ekstrak dilakukan dengan cara ekstrak dilakukan penimbangan sesuai perhitungan masing-masing dosis yaitu 100 mg/KgBB mencit, 300 mg/KgBB

mencit, dan 500 mg/KgBB mencit, kemudian dilarutkan dengan Aquadest hingga volumenya mencapai 100 mL.

#### **9) Uji Pendahuluan Aloksan**

Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui dan menetapkan dosis yang efektif dari penginduksian zat aloksan yang digunakan untuk mengakibatkan kenaikan glukosa darah pada hewan uji. Dosis efektif yang akan diambil yaitu dosis yang mampu menyebabkan hiperglikemia tetapi tidak menyebabkan kematian pada hewan uji (Subeki & Muhartono, 2015). Dosis yang akan di uji keefektifannya yaitu 2,5 mg/ 20 gBB mencit.

#### **10) Uji Efek Antihiperglikemik Ekstrak Etil Asetat Batang Brotowali (*Tinospora crispa* L)**

Mencit yang telah ditimbang dan dikelompokkan dipuasakan terlebih dahulu selama 16 jam. Pada hari pertama dilakukan pengukuran kadar glukosa darah awal (T0) dengan menggunakan alat glucometer (easy touch GCU) sebelum kelompok mencit diberi perlakuan. Setelah glukosa darah awal (T0) telah diukur, selanjutnya kelompok mencit diinduksikan aloksan dengan dosis 2,5 mg/ 20 gBB mencit secara intraperitoneal. Setelah di induksi, selanjutnya dilakukan inkubasi pada mencit selama 3 hari dan setiap harinya diberikan suspensi glukosa dengan dosis 60 mg/20 gBB mencit untuk menjaga kadar glukosa darah serta memberikan makan dan minum air putih yang cukup, kemudian kelompok mencit dilakukan pengukuran (Kurniawati *et al.*, 2014). Setelah 72 jam, mencit dipisahkan antara mencit yang memenuhi dan tidak memenuhi kriteria hiperglikemik. Mencit dapat dianggap menderita diabetes apabila kadar glukosa darah setelah induksi >200

mg/dL (Nugrahani & Santika, 2012). Setelah dilakukan pemilihan mencit yang memenuhi kriteria selanjutnya tiap-tiap kelompok diberikan CMC Na 1% sebagai kontrol negatif, Metformin 65 mg/KgBB mencit, ekstrak batang brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Hook.f. & Thomson) dosis 100 mg/KgBB mencit, ekstrak batang brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Hook.f. & Thomson) dosis 300 mg/KgBB mencit, dan ekstrak batang brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Hook.f. & Thomson) dosis 100 mg/KgBB mencit lalu dilakukan pengamatan kadar glukosa darah mencit setiap menit ke-30, 60, dan 90. Kemampuan penurunan kadar glukosa darah setiap indikator dapat dinyatakan dalam parameter persentase penurunan KGDP dengan rumus sebagai berikut.

#### **Persentase kenaikan KGDP**

$$= \frac{\text{KGDP setelah induksi} - \text{KGDP awal (sebelum induksi)}}{\text{KGDP (setelah induksi)}} \times 100\%$$

#### **Persentase penurunan KGDP**

$$= \frac{\text{KGDP setelah induksi} - \text{KGDP setelah perlakuan}}{\text{KGDP setelah induksi}} \text{ setelah induksi} \times 100$$

### **3.6 Analisis Data**

Pengumpulan data menggunakan langkah *Tabulating* yang dimana proses pengerjaannya dilakukan dengan cara pengelompokan data agar lebih mudah dalam menganalisa data (Lapau, 2012). Nantinya, data yang diperoleh melalui penelitian akan dimasukkan pada *software* analisis data basis SPSS 26, untuk di kelompokkan sesuai dengan kelompok pengujian. Setelah data dikelompokkan, selanjutnya dilakukan pengujian normalitas distribusi data dengan menggunakan Shapiro-Wilk

dan pengujian homogenitas varians pada kelompok data dengan menggunakan Levene's Test. Selanjutnya dilakukan analisis menggunakan teknik analisis statistik komparatif. Teknik yang digunakan dalam analisis komparatif tergantung jenis data yang akan diuji. Teknik analisis statistik komparatif yang dapat digunakan beserta data diperlihatkan pada gambar berikut:

JENIS DATA	TIPE KOMPARATIF			
	Dua Kelompok Sampel		k Kelompok Sampel ( k > 2 )	
	Berpasangan	Independen	Berpasangan	Independen
<b>Nominal</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mc Nemar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fisher Exact Probability</li> <li>• <math>\chi^2</math> dua sampel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cochran Q</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\chi^2</math> untuk k sample</li> </ul>
<b>Ordinal</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sign Test</li> <li>• Wilcoxon Matched Pairs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Median Test</li> <li>• Mann Whitney U-test</li> <li>• Kolomogorov Smirnov</li> <li>• Wald Wolfowitz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Friedman Two-Way Anova</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Median Extension</li> <li>• Kruskal-Wallis One Way Anova</li> </ul>
<b>Interval atau Rasio</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uji-t untuk Sampel Berpasangan</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uji-t untuk Sampel Independent</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• One-Way Anova</li> <li>• Two-Way Anova</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• One-Way Anova</li> <li>• Two-Way Anova</li> </ul>

Gambar 2.3 Jenis Data dan Teknik Analisis Komparatif  
Sumber : (Aedi, 2010)

Jika pada saat pengambilan data, diketahui data terdistribusi normal maka penelitian ini akan menggunakan analisa *ANOVA one way* dan homogenitas varians yang sama dilanjutkan dengan *Post Hoc Tamfane's*. Pada data yang homogenitas varians berbeda atau tidak sama dilanjutkan dengan dengan *Post Hoc Bonferroni* tingkat kepercayaan yaitu 0,05. Sedangkan apabila data yang didapat tidak terdistribusi normal dan tidak homogen menggunakan *Kruskal-Wallis* dilanjutkan dengan *Post hoc Mann-whitney*.

### 3.7 Jadwal Penelitian

Tabel 3. 1 Perencanaan Penelitian Karya Tulis Ilmiah

Nama Kegiatan	Bulan															
	Februari (Minggu Ke-)				Maret (Minggu Ke-)				April (Minggu Ke-)				Mei (Minggu Ke-)			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Determinasi Tanaman	■	■														
Pembuatan Simplisia Batang Brotowali			■	■												
Ekstraksi Batang Brotowali					■	■										
Skrining Fitokimia							■	■								
Uji Pendahuluan Antihiperlikemik									■	■	■					
Uji Antihiperlikemik											■	■	■	■		
Analisis Data															■	
Penyusunan Laporan KTI															■	■

