

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada juni – juli 2024 di Animal House Fakultas Sains dan Teknologi UINSU (sebagai tempat pemeliharaan tikus), di Laboratorium kimia organik Fakultas Sains dan Teknologi UINSU (sebagai tempat pembuatan ekstrak etanol daun pacar air), di Laboratorium Kimia FMIPA USU (sebagai tempat uji skrining fitokimia ekstrak daun pacar air akan dilakukan), serta di Labkesda (sebagai tempat pemeriksaan jumlah kadar kreatinin dan ureum).



3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Kandang tikus polipropilen ukuran 40 x 60 cm, wadah pakan, botol air minum, sarung tangan, sonde, syringe, timbangan digital, timbangan analitik, kapas, toples, bak bedah, alat bedah, peniti, cawan petri, label kertas, spektrofotometer, *glucotest Easy Touch*, strip glukometer *Easy Touch*, gelas kimia, gelas ukur, tabung reaksi, batang pengaduk, pipet hematokrit, mikropipet, spatula, corong buchner, blender, kertas saring, rotary evaporator, alu, lumpang, mikrotube, dan lemari es.

3.2.2 Bahan

Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* L.), sekam kayu, makanan standar pellet, CMC Na 1%, aloksan, NaCl fisiologis 0,9%, daun pacar air (*Impatiens balsamina* L.), etanol 96%, glibenklamid, dan aquades.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dirancang secara eksperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari enam macam kelompok perlakuan dan empat kali pengulangan.

KN : Peraturan standar berdasarkan konsumsi pelet dan aquadest.

K- : Pemberian induksi aloksan dengan dosis 150 mg/kg BB.

K+ : Pemberian induksi aloksan dengan dosis 150 mg/kg BB + Glibenklamid 5 mg/kg BB.

P1 : Perlakuan 1 berupa pemberian induksi aloksan dengan dosis 150 mg/kg BB dan ekstrak etanol daun pacar 450 mg/kg BB.

P2 : Perlakuan 2 berupa pemberian induksi aloksan dengan dosis 150 mg/kg BB dan ekstrak etanol daun pacar 500 mg/kg BB.

P3 : Perlakuan 3 berupa pemberian induksi aloksan dengan dosis 150 mg/kg BB dan ekstrak etanol daun pacar 550 mg/kg BB.

Banyaknya jumlah tikus yang diperlukan ditentukan dengan menggunakan rumus Federer, sebagai berikut:

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

$$(6-1)(n-1) \geq 15$$

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

$$n-1 \geq 15/5$$

$$n-1 \geq 3$$

$$n \geq 3 + 1$$

$$n \geq 4$$

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Ekstrak Daun Pacar Air

Daun pacar air terlebih dahulu dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Kemudian, dikeringkan. Sampel yang telah kering dihaluskan dengan menggunakan blender hingga menjadi serbuk yang halus.

Ekstraksi daun pacar air dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Sebanyak 500 g serbuk simplisia daun pacar air dimaserasi atau direndam dengan larutan etanol 96% sebanyak 3.500 mL selama 24 jam dimana dilakukan pengadukan tiap jam pada 6 jam pertama. Setelah 24 jam, sampel disaring

menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan residu. Residu kemudian dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali dengan proses yang sama.

Seluruh filtrat digabungkan menjadi satu, kemudian diuapkan pada suhu tidak lebih dari 50°C menggunakan wajan berisi air yang dipanaskan di atas kompor untuk memperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang dan disimpan dalam wadah gelas tertutup sebelum digunakan untuk pengujian (Lestari, 2020).

3.4.2 Uji Skrining Fitokimia

3.4.2.1 Identifikasi Flavonoid

Sejumlah 1 gram ekstrak etanol herba pacar air dipanaskan dengan air di atas tangas air, kemudian disaring. Kedalam 5 mL filtrat dimasukkan serbuk magnesium dan 1 mL asam klorida 2N. Campuran dipanaskan kembali, lalu disaring. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 mL amil alkohol. Campuran lalu dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah pada lapisan amil alkohol.

3.4.2.2 Identifikasi Kuinon

Sejumlah 1 gram ekstrak etanol herba pacar air dipanaskan dengan air di atas tangas air, kemudian disaring. Filtrat ditambah 2-3 tetes larutan kalium hidroksida 5%. Adanya kuinon ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning hingga merah

3.4.2.3 Identifikasi Tanin

Sebanyak 1 gram ekstrak etanol herba pacar air digerus dengan 15 mL air hingga lumat, dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan dididihkan selama beberapa menit, kemudian saring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian. Filtrat bagian I ditambahkan 2-3 tetes larutan besi (III) klorida 1%. Adanya golongan fenol ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau biru kehitaman. Filtrat bagian II ditetesi (5 tetes) larutan pereaksi gelatin 1 %. Terbentuknya endapan berwarna putih menunjukkan adanya senyawa tanin.

3.4.2.4 Identifikasi Steroid

Sebanyak 1 gram ekstrak etanol herba pacar air digerus dengan 20 mL eter, kemudian disaring. Filtrat yang didapat diuapkan pada cawan penguap hingga

kering. Pada residu ditetaskan pereaksi Liebermann-Burchard sebanyak 2-3 tetes. Terbentuknya warna hijau violet atau biru menunjukkan adanya steroid (Ih, 2017).

3.4.3 Persiapan Hewan Coba

Hewan uji Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* L.) dengan berat sekitar 150-170 gram umur 2-3 bulan sebanyak 24 ekor yang dipelihara dalam kandang berukuran 40 cm x 60 cm. Setiap kandang berisi empat ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* L.). Pemberian pakan dan air minum dilakukan secara *ad libitum*. Tikus putih diaklimatisasi terlebih dahulu di kandang barunya selama 1 minggu untuk mengurangi stres pada tikus putih yang dapat mempengaruhi metabolisme tubuh. Penelitian ini sudah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Hewan FMIPA USU dengan No. 0390/KEPH-FMIPA/2024.

3.4.4 Penginjeksian Aloksan

Induksi aloksan dilakukan pada semua kelompok tikus kecuali kelompok normal. Kadar glukosa darah diukur sebelum induksi. Aloksan dilarutkan terlebih dahulu dalam larutan NaCl fisiologis 0,9% secepatnya sebelum diinduksikan. Induksi aloksan dilakukan secara intraperitoneal dengan dosis 150 mg/kg bb. Kadar glukosa darah diukur kembali setelah 72 jam (hari ke-3) untuk penetapan kondisi hiperglikemia. Pemberian pakan dan minum tetap dilakukan selama induksi. Induksi diberikan hingga terjadi hiperglikemia yang ditandai dengan peningkatan kadar gula darah ≥ 150 mg/dl (Hasim, 2020).

Misal BB tikus 200 g

$$\begin{aligned} 200 \text{ g} &= \frac{150 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 200 \text{ g} = 30 \text{ mg} \\ &= \frac{30 \text{ mg}}{50 \text{ mg/ml}} = 0,6 \text{ ml} \end{aligned}$$

Jadi, untuk tikus dengan berat badan 200 maka dosis yang digunakan adalah 0,6 ml.

3.4.5 Penentuan Dosis Glibenklamid

Glibenklamid 5 mg sebagai kontrol positif yang diberikan secara oral ke hewan uji. Dosis pemberian glibenklamid pada tikus dikonversikan berdasarkan perhitungan konversi dosis: $0,018 \times 5 \text{ mg} = 0,09 \text{ mg}/200 \text{ gr BB}$ (Pongoh, 2020).

Misal BB tikus 200 g

$$200 \text{ g} = \frac{200 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 0,09 \text{ mg} = 0,09 \text{ mg}$$

$$= \frac{0,09 \text{ mg}}{10 \text{ mg/ml}} \times 100 = 0,9 \text{ ml}$$

Jadi, untuk tikus dengan berat badan 200 maka dosis yang digunakan adalah 0,9 ml.

3.4.6 Penginduksian Ekstrak Daun Pacar Air (*Impatiens balsamina* L.)

Hewan coba diberikan ekstrak daun pacar air secara oral, dengan jumlah yang bervariasi pada setiap perlakuan. Ekstrak dosis 450 mg/kg BB, 500 mg/kg BB, 550 mg/kg BB diberikan masing-masing pada perlakuan 1, 2, dan 3 pada hari ke 15 hingga 28 berturut-turut. Sepanjang pemberian ekstrak, kadar glukosa darah dinilai pada interval mingguan di semua kelompok pengobatan.

Misal BB rata-rata tikus 130 g

$200 \text{ g} = \frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 450 \text{ mg} = 90 \text{ mg} \times 6 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 3.780/1000 = 3,78 \text{ g}$ yang dilarutkan dengan CMC 1% sebanyak 2 ml.

3.4.7 Pemeriksaan Kadar Gula Darah

Pengukuran kadar glukosa darah tikus dilakukan pada hari ke-0 (setelah induksi aloksan), 3, 7, dan 14. Sebelum diukur tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 8 jam. Metode pengukuran secara enzimatik dengan memindahkan *glucotest* dengan cara sampel darah yang telah diambil pada vena lateralis ekor, diteteskan pada strip yang telah dipasang pada alat, ditunggu 10 detik, kemudian kadar glukosa darah akan muncul pada layar monitor alat.

3.4.8 Tahap Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan sampel darah diambil pada hari terakhir perlakuan atau hari ke-15. Darah diambil dari mata (*sinus orbitalis*) menggunakan mikrohematokrit sebanyak 5 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan didiamkan selama 30 menit sampai membeku. Selanjutnya proses pemeriksaan ureum dan kreatinin dilakukan menggunakan *chemistry analyzer*.

3.4.9 Metode Pemeriksaan Morfologi Ginjal dan Indeks Organ Ginjal

Pengamatan makroskopis ginjal tikus meliputi warna, bentuk, dan konsistensi. Kriteria ginjal normal ginjal yaitu:

- a. Warna ginjal normal berwarna merah kecoklatan

- b. Ginjal normal berbentuk seperti kacang
- c. Ginjal normal memiliki konsistensi yang kenyal (Ichsan, 2022)

Pengamatan indeks organ dilakukan terhadap organ ginjal. Organ yang sudah bersih dari bagian-bagian lain yang tidak diperlukan selanjutnya ditimbang untuk mendapatkan bobot organ absolutnya. Kemudian dihitung indeks organ yang merupakan rasio antara bobot organ absolut dan bobot badan pada hari terakhir pengujian. Rumus indeks organ dapat dilihat sebagai berikut:

$$\text{Indeks organ (\%)} = \frac{\text{bobot organ absolut (gram)}}{\text{bobot badan (gram)}} \times 100\%$$

3.4.10 Metode Pengukuran Kadar Ureum dan Kreatinin

3.4.10.1 Pengukuran Ureum

Adapun alat yang digunakan dalam pemeriksaan kar adalah spektrofoumetus UV-VIS. Bahan yang digunakan yaitu serum, reagen Phospate Buffer dan Natrium Hipoklorit.

Prosedur kerja

1. Dipisahkan antara darah dan serum dengan menggunakan *centrifuge* selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm.
2. Ditambahkan phosphate buffer sebanyak 1000 ul kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu 25°C kemudian ditambahkan natrium hipoklorit 1000 ul.
3. Didiamkan selama 10 menit pada suhu 25°C kemudian diukur menggunakan Spektofotometri UV-VIS pada panjang gelombang 578 nm.
4. Dicatat hasilnya.

3.4.10.2 Pengukuran Kreatinin

Adapun alat yang digunakan dalam pemeriksaan kadar kreatinin adalah spektrofotometer UV-VIS. Bahan yang digunakan yaitu serum, reagen asam pikrit dan Buffer Alkaline.

Prosedur Kerja:

1. Dipisahkan antara darah dan serum dengan menggunakan *centrifuge* selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm.

2. Ditambahkan asam pikrit sebanyak 1000 ul kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu 25°C kemudian ditambahkan Buffer Alkaline 1000 ul.
3. Didiamkan selama 10 menit pada suhu 25°C kemudian diukur menggunakan Spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang 510 nm.
4. Dicatat hasilnya.

3.5 Analisis Data

Pada penelitian ini, data hasil pengukuran kadar ureum dan kreatinin yang diperoleh dihitung dan dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji *one way* ANOVA dengan signifikan 5%. Apabila terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji Duncan.



UNIVERSITAS ISLAM SUMATERA UTARA
SUMATERA UTARA MEDAN

3.6 Alur Penelitian

