

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan rancangan eksperimen sebenarnya (*True Experimental Design*) menggunakan jenis *post test* dengan kelompok kontrol (*Post Test, Control Group*). Rancangan penelitian yang dipakai adalah rancangan acak kelompok (RAK). Induksi diet HFD dan STZ mengacu pada penelitian Srinivasan *et al.* (2005), induksi ini mampu membuat tikus model DM tipe 2. Dosis ekstrak mengacu pada penelitian Andaloussi *et al.* (2011) dengan pemberian ekstrak biji jintan hitam 48 mg/kg BB didapatkan kadar glukosa darah yang hampir mirip dengan kontrol normal non-DM pada akhir terapi.

#### 4.2 Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah tikus *Sprague dawley* jantan model DM tipe 2 dengan induksi diet HFD dan STZ. Digunakan tikus *Sprague dawley* karena memiliki kemampuan metabolik yang relatif cepat sehingga lebih sensitif jika digunakan dalam penelitian yang berhubungan dengan metabolik tubuh.

##### 4.2.1 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria inklusi dan eksklusi ditentukan agar karakteristik sampel tidak menyimpang jauh dari populasi. Penentuan kriteria inklusi dan eksklusi ini juga



dilakukan agar anggota populasi memenuhi syarat untuk dijadikan sampel. Berikut adalah kriteria inklusi dan eksklusi yang ditentukan.

#### 4.2.1.1 Kriteria Inklusi

Tikus yang digunakan sebagai subjek penelitian harus memiliki ciri-ciri:

- Tikus jenis *Sprague dawley*
- Jenis kelamin jantan
- Umur 18 bulan (setara dengan manusia umur 45 tahun)
- Berat badan 180-400 gram
- Tikus sehat dan aktif

#### 4.2.1.2 Kriteria Eksklusi

Tikus yang digunakan sebagai subjek penelitian tidak boleh memiliki ciri-ciri:

- Tikus DM sebelum dilakukan induksi DM tipe 2
- Tikus cacat
- Tikus dengan kondisi patologis yang mempengaruhi katalase seperti kanker, sepsis, dan hipertensi

#### 4.2.2 Sampel

Teknik randomisasi sampel yang digunakan untuk menentukan kelompok perlakuan yaitu dengan cara pengundian pada 24 ekor tikus. Kelompok perlakuan berjumlah 4 kelompok dengan ketentuan sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol negatif (PN): tikus model DM tipe 2, diberikan HFD (*High Fat Diet*) selama 40 hari dan akuades selama 26 hari.

- b) Kelompok kontrol positif (PP): tikus model DM tipe 2, diberikan HFD selama 40 hari dan glibenklamid 0,45 mg/kg BB/hari selama 26 hari.
- c) Kelompok perlakuan (P1): tikus model DM tipe 2, diberikan HFD selama 40 hari dan non-nanopartikel ekstrak biji jintan hitam 48 mg/kg BB/hari selama 26 hari.
- d) Kelompok perlakuan (P2): tikus model DM tipe 2, diberikan HFD selama 40 hari dan nanopartikel PLGA ekstrak biji jintan hitam 48 mg/kg BB/hari selama 26 hari.

#### 4.2.3 Estimasi Besar Sampel Penelitian

Penelitian menggunakan empat macam perlakuan dengan dua kelompok sebagai kontrol, jumlah hewan coba untuk masing-masing perlakuan dapat dihitung dengan rumus Federer (1991):

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

Keterangan :

n = besar sampel tiap kelompok

t = jumlah kelompok

15 = nilai deviasi

Dari rumus tersebut, berikut penghitungan besar sampel penelitian

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

$$(n-1) (4-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

$$n = 6$$



Berdasarkan hasil perhitungan, setiap kelompok uji membutuhkan 6 tikus jantan sebagai sampel sehingga total tikus yang dibutuhkan adalah 24 ekor.

#### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas yang terdapat pada penelitian ini adalah terapi non-nanopartikel dan nanopartikel PLGA ekstrak biji jintan hitam yang diberikan dalam dosis 48 mg/kg BB setiap hari selama 30 hari dengan sonde. Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar glukosa darah puasa rata-rata tiap kelompok yang diambil sebelum perlakuan, setiap bulan selama diet HFD, tiga hari setelah diinduksi STZ, dan setiap bulan selama diberikan terapi selama 1 bulan, dan kadar katalase pankreas. Terdapat korelasi positif yang signifikan antara katalase dan GDP pada DM tipe 2 yang tidak terkontrol dan terkontrol (Likidilid *et al.*, 2010).

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakokinetik Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk perawatan dan perlakuan hewan coba. Pembuatan ekstrak biji jintan hitam dilakukan di Balai Materia Media Kota Batu. Pembuatan nanopartikel PLGA ekstrak biji jintan hitam dilakukan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya. Karakterisasi nanopartikel dilakukan di Laboratorium FMIPA Universitas Negeri Malang. Pemeriksaan kadar katalase pankreas dilakukan di Laboratorium FAAL Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu penelitian dimulai pada Januari 2015 setelah mendapatkan persetujuan etik dan berakhir pada Mei 2015.

## 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

### 4.5.1 Bahan Penelitian

Berikut merupakan bahan-bahan yang digunakan selama penelitian:

**Tabel 4.1 Bahan Penelitian**

No.	Perlakuan	Bahan
1.	Diet HFD (25 gram/ekor/hari)	Konsentrat PARS 50%, tepung terigu 25% kolesterol 1%, asam cholat 0,1%, minyak babi 2,5% dan air 21,4%
2.	Induksi STZ	STZ 35 mg/kg BB, bufer sitrat pH 4,5 10 mL
3.	Pembuatan ekstrak biji jintan hitam	Serbuk biji jintan hitam 21,6 g, etanol 95% 3000 mL Perhitungan: <ul style="list-style-type: none"> <li>Berat ekstrak untuk 1 sediaan non-nanopartikel PLGA : 48 mg/kg BB/tikus/hari x 0,4 kg x 6 tikus x 30 hari = 3456 mg (ekstrak) → 34560 mg (serbuk biji jintan hitam)</li> <li>Bobot ekstrak untuk 1 sediaan nanopartikel PLGA: 48 mg/kg BB/tikus/hari x 0,4 kg x 6 tikus x 30 hari = 3456 mg (ekstrak) → 34560 mg (serbuk biji jintan hitam)</li> </ul> Total bobot serbuk biji jintan hitam: 34,56 g + 34,56 g = 69,12 g
4.	Uji fitokimia ekstrak biji jintan hitam	Identifikasi minyak atsiri: 500 mg ekstrak, 50 mL etanol, sudan III Identifikasi senyawa golongan alkaloid: 100 mg ekstrak, 2 mL HCl 2N, 0,1 g NaCl, 2 mL HCl 2 N, Mayer, Wagner, Dragendroff Identifikasi senyawa golongan saponin: 100 mg ekstrak, 10 mL air panas, <i>olive oil</i> Identifikasi senyawa golongan flavonoid: 100 mg ekstrak, 6 mL ammonia encer, 1 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1% larutan Al, 10 mL etil asetat Identifikasi senyawa golongan tanin: 100 mg ekstrak, 10 mL larutan NaCl 0,9% panas, larutan NaCl, 1% larutan gelatin Identifikasi senyawa golongan terpenoid: 100 mg ekstrak, 2 mL kloroform, 3 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat Pengujian <i>thymoquinone</i> dengan KLT: ekstrak biji jintan hitam, standar <i>thymoquinone</i> , 90 mL n-heksan, 10 mL etil asetat
5.	Pembuatan nanopartikel PLGA ekstrak biji Jintan hitam	Ekstrak biji jintan hitam 3456 mg, PLGA 17,28 g, larutan <i>prophylene carbonate</i> (PC) 1036,8 mL, pluronic F68 69,12 g, aquabidestilata 6,912 L
6.	Uji karakteristik nanopartikel PLGA ekstrak biji Jintan hitam	Karakterisasi morfologi nanopartikel: suspensi nanopartikel
7.	Pembuatan suspensi glibenklamid	Glibenklamid 5 mg, PBS 21 mL, propilen glikol 4 mL
8.	Pengukuran kadar glukosa darah	Serum tikus
9.	Pemeriksaan kadar katalase pankreas	Jaringan pankreas <i>StressXpress® Catalase Activity Kit</i> yang berisi <i>Catalase Standard, Assay Buffer Concentrate, Hydrogen Peroxide Reagent, Colorimetric Detection Reagent</i> , dan <i>Horseradish Peroxidase Concentrate</i> ,



#### 4.5.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan sesuai standar peralatan laboratorium. Berikut alat-alat yang digunakan selama proses penelitian:

**Tabel 4.2 Peralatan Penelitian**

Tahap Penelitian	Alat
Pemeliharaan hewan coba	Kandang + tutup anyaman kawat, botol air, rak tempat kandang, sekam, timbangan digital
Induksi DM dengan STZ	<i>Disposable</i> spuit 1 mL, <i>disposable</i> spuit 3 mL, labu ukur 50 mL, neraca analitik, pipet tetes, pipet ukur, pipet volume, beaker glass, aluminium foil, tabung mikrosentrifus, alat inhalasi, pH meter, vial kosong steril, <i>glucose check test</i>
Pembuatan ekstrak biji jintan hitam	<i>Soxhlet apparatus</i> , <i>rotary evaporator</i> , aluminium foil, timbangan digital, cawan porselen
Uji fitokimia ekstrak biji jintan hitam	Tabung reaksi, pipet tetes, plat porselin, gelas ukur, <i>water bath</i> , batang pengaduk, kertas saring, tissue, plat KLT silica gel, chamber KLT, mikropipet, UV lamp
Pembuatan nanopartikel ekstrak biji jintan hitam	Timbangan digital, gelas ukur, mikropipet, gelas beaker, <i>magnetic stirrer</i> , sentrifugator, vortex
Uji karakterisasi nanopartikel PLGA ekstrak biji jintan hitam	Karakterisasi morfologi nanopartikel: <i>Scanning Electron Microscope (SEM) FEI Inspect-S50</i>
Alat pemberian glibenklamid, non-nanopartikel dan nanopartikel PLGA ekstrak biji jintan hitam pada tikus	Timbangan digital, gelas ukur, pengaduk, sonde lambung tikus
Pemeriksaan kadar glukosa darah tikus	Glukometer
Pemeriksaan kadar katalase pankreas	Alat gelas, sentrifugator, <i>microtube</i> , micropipette, <i>microplate reader</i> 570 nm

## 4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.3 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala Data	Keterangan
DM tipe 2	Penyakit yang disebabkan oleh resistensi insulin dominan dengan defisiensi insulin relatif hingga gangguan sekresi insulin dominan dengan resistensi insulin.	-	GDP $\geq$ 126 mg/dL pada tikus menunjukkan DM tipe 2
Hewan coba	Tikus <i>Sprague Dawley</i> berusia 18 bulan	-	Tikus yang digunakan memiliki berat badan antara 200-250 gram
Serbuk biji jantan hitam	Biji jantan hitam yang dikeringkan lalu dihaluskan	-	Bobot serbuk yang digunakan adalah 50 g
Diet HFD	Pakan tinggi kolesterol yang dimodifikasi dengan formulasi tertentu untuk menghasilkan keadaan obesitas pada hewan coba tikus dan menghasilkan tikus DM tipe 2	-	Konsentrat PARS 50%, tepung terigu 25% kolesterol 1%, asam cholat 0,1%, minyak babi 2,5% dan air 21,4%
STZ	Obat yang bekerja pada sel beta pankreas dengan cara merusak DNA (DNA <i>Alkylating</i> ) yang mana ditandai dengan perubahan pada insulin darah dan konsentrasi glukosa	-	STZ 35 mg/kg BB, bufer sitrat pH 4,5 10 mL
Katalase	Enzim antioksidan endogen yang berperan dalam mendegradasi ROS yaitu hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen	-	Kadar katalase menurun pada kondisi DM
<i>StressXpress® Catalase Activity Kit</i>	Kit untuk pengujian kadar katalase dengan metode kolorimetri	-	Hasil absorbansi yang semakin tinggi menunjukkan kadar katalase yang semakin rendah

## 4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

### 4.7.1 Prosedur Penelitian

#### 4.7.1.1 Persiapan Kandang

1. Menyiapkan rak besi sebagai tempat kandang tikus
2. Menyiapkan kandang dari kotak plastik dengan tutup terbuat dari kawat dan di dalamnya diberi sekam
3. Menyiapkan tempat minum tikus

#### 4.7.1.2 Persiapan Hewan Coba

1. Seleksi hewan yang digunakan sebagai model sesuai dengan kriteria yang telah ditetapkan yaitu tikus putih strain *Sprague dawley*
2. Sebelum dilakukan perlakuan hewan coba, tikus diadaptasikan selama 7 hari
3. Menempatkan tikus pada kandang hewan coba ukuran 40 cm x 25 cm yang terbuat dari kotak plastik dengan tutup terbuat dari kawat. Setiap kandang berisi 2 ekor tikus
4. Menyediakan makanan tikus berupa pakan cornfeed PARS dan tepung terigu dengan perbandingan 3:1 selama 7 hari pengkondisian hewan coba
5. Menyediakan makanan tikus berupa diet HFD selama 2 bulan
6. Menyediakan botol minum pada kandang hewan coba yang rutin diganti setiap hari
7. Dalam kandang tikus diberi sekam yang rutin diganti setiap 2 hari sekali
8. Suhu kandang tikus adalah suhu kamar (20-25°C)



#### 4.7.1.3 Penimbangan Berat Badan Tikus

Sebelum pemberian diet HFD, tikus ditimbang terlebih dahulu untuk menentukan diet yang akan diberikan. Penimbangan berat badan dengan menggunakan timbangan digital. Sebelum dilakukan penimbangan terhadap tikus, timbangan dinyalakan dahulu, kemudian diposisikan pada angka nol, kemudian wadah tikus diletakkan pada timbangan dan dikalibrasi. Setelah timbangan menunjukkan angka nol, maka tikus dimasukkan dalam wadah dan dibaca angka yang terdapat pada layar dengan satuan gram (g).

#### 4.7.1.4 Pembuatan dan Pemberian Diet Tinggi Lemak (Pranata, 2010)

1. Jumlah makanan rata-rata 25 g/hari untuk setiap tikus
2. Sebanyak 25 gram makanan mengandung PARS 50%, tepung terigu 25%, kolesterol 1%, asam cholat 0,1%, minyak babi 2,5%, dan air sebesar 21,4% (Pranata, 2010). Jumlah bahan yang digunakan yaitu PARS 12,5 gram/hari, tepung terigu 6,25 gram/hari, kolesterol 0,25 gram/hari, asam cholat 0,025 gram/hari, dan minyak babi 0,625 gram/hari
3. Diet HFD diberikan selama 60 hari

#### 4.7.1.5 Pembuatan Larutan STZ

Berdasarkan Dewi (2010) cara pembuatan larutan STZ yaitu:

1. Sebanyak 500 gram STZ dilarutkan ke dalam 10 mL bufer sitrat pH 4,5, selanjutnya divortex hingga homogen, sehingga dihasilkan larutan stok STZ

2. Larutan stok STZ disimpan pada suhu 4°C
3. Terbentuk sediaan larutan STZ 50 mg/1 mL (tiap 1 mL larutan mengandung 50 mg STZ)

#### 4.7.1.6 Induksi Larutan STZ pada Tikus *Sprague dawley*

- a. Berat badan tikus ditimbang untuk menentukan STZ yang diperlukan.
- b. Setelah pemberian diet, tikus dipuasakan semalam, hewan kemudian diinjeksi dengan larutan STZ dosis rendah (35 mg/kg BB) di bagian *intraperitoneal* (Srinivasan *et al.*, 2005)
- c. Larutan STZ dimasukkan ke dalam spuit dengan volume sesuai perhitungan dosis
- d. Tikus dipegang erat, diposisikan dengan bagian perut menghadap ke arah atas dan kepala sedikit menghadap ke bawah
- e. Permukaan perut tikus diusap dengan kapas yang mengandung etanol 70%
- f. Larutan STZ diinjeksi secara perlahan, selanjutnya bagian perut yang diinjeksi diusap kembali dengan kapas yang mengandung etanol 70%

#### 4.7.1.7 Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah Puasa Tikus

1. Tikus didefinisikan Diabetes Melitus tipe 2 jika kadar Glukosa Darah Puasa > 126 mg/dL (Jung *et al.*, 2011)
2. Sebelum dilakukan pemeriksaan GDP, tikus dipuasakan 10-12 jam (mulai malam hari) (Oguanobi *et al.*, 2012)
3. Tikus dipegang dengan serbet

4. Ujung ekor diberi alkohol dan ditusuk jarum. Ekor diurut ke distal sehingga darah keluar melalui ujung luka
5. Darah ditempelkan di stik yang ditempelkan pada alat ukur digital, kemudian dilihat hasilnya
6. Pemeriksaan glukosa darah puasa dilakukan pada (Oguanobi *et al.*, 2012, Maheswari *et al.*, 2014):
  - a. Sebelum perlakuan
  - b. Setiap bulan selama diet HFD
  - c. Tiga hari setelah diinduksi STZ
  - d. Setiap bulan selama diberikan terapi selama 1 bulan

#### 4.7.1.8 Pembuatan Ekstrak Biji Jintan Hitam

1. Dimasukkan serbuk biji jintan hitam 150 g ke dalam wadah
2. Dimasukkan etanol 95% 900 mL secara perlahan ke gelas soxhlet
3. Dilakukan ekstraksi soxhlet selama 3 jam dengan suhu heater 90%
4. Hasil ekstrak didiamkan selama 30 menit
5. Ekstrak dipisahkan dari pelarutnya dengan dievaporasi pada suhu maksimal 60°C menggunakan *water bath rotary evaporator* sampai berbentuk semisolid ekstrak
6. Ekstrak disimpan dalam wadah kaca gelap atau wadah porselein tertutup rapat aluminium foil.



#### 4.7.1.9 Uji Fitokimia Ekstrak Biji Jintan Hitam

1. Identifikasi Minyak Atsiri
  - a. Dilakukan pembuatan larutan uji dengan cara melarutkan sebanyak 500 mg ekstrak biji jintan hitam dilarutkan dengan 50 mL etanol
  - b. Larutan uji diambil beberapa tetes lalu ditambah satu tetes pereaksi sudan III. Warna merah menandakan adanya kandungan minyak atsiri (Stahl, 1985)
2. Identifikasi senyawa golongan alkaloid (Depkes RI, 1989)
  - a. Ekstrak ditimbang sebanyak 100 mg
  - b. Ditambahkan dengan 2 mL HCl 2N dan dipanaskan di atas water bath selama 2-3 menit sambil diaduk
  - c. Campuran didinginkan dan ditambah 0,1 g NaCl
  - d. Campuran diaduk dan disaring
  - e. Filtrat ditambah 2 mL HCl 2 N dan dibagi menjadi empat bagian
  - f. Bagian pertama ditambahkan dengan reagen Mayer sebanyak 1-2 tetes, reaksi positif akan membentuk krim
  - g. Bagian kedua ditambahkan reagen Wagner sebanyak 1-2 tetes, reaksi positif akan membentuk endapan cokelat kemerahan
  - h. Bagian ketiga ditambahkan reagen Dragendroff sebanyak 1-2 tetes, reaksi positif akan menunjukkan endapan kuning atau jingga
3. Identifikasi senyawa golongan saponin (Depkes RI, 1989)
  - a. Ekstrak ditimbang sebanyak 100 mg

- b. Dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL air panas, lalu didinginkan
  - c. Larutan dikocok kuat-kuat selama 10 detik
  - d. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm dan dapat membentuk emulsi saat ditambahkan *olive oil*
4. Identifikasi senyawa golongan flavonoid (Depkes RI, 1989)
- a. Ekstrak ditimbang sebanyak 100 mg
  - b. Ekstrak dibagi menjadi dua bagian (masing-masing 50 mg)
  - c. Ekstrak bagian pertama dibentuk menjadi filtrat ekstrak dan dibagi menjadi dua bagian
  - d. Bagian pertama ditambah 5 mL amonia encer dan 1 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Reaksi positif menunjukkan terbentuknya warna kuning
  - e. Bagian kedua ditambah 1% larutan aluminium (Al), reaksi positif menunjukkan warna kuning
  - f. Ekstrak bagian kedua ditambah 10 mL etil asetat dan dipanaskan di atas *water bath*, lalu disaring
  - g. Filtrat ditambahkan amonia encer 1 mL. Reaksi positif menunjukkan warna kuning
5. Identifikasi senyawa golongan tanin (Depkes RI, 1989)
- a. Ekstrak ditimbang sebanyak 100 mg
  - b. Dilarutkan dalam 10 mL larutan NaCl 0,9% panas
  - c. Disaring dan dibagi menjadi tiga bagian sama banyak (A, B, dan C)
  - d. Ditambahkan larutan NaCl pada bagian pertama (A)

- e. Ditambahkan 1% larutan gelatin pada bagian kedua (B)
  - f. Ditambahkan reagen gelatin-NaCl pada bagian ketiga (C)
  - g. Endapan yang terbentuk oleh reagen terakhir atau reagen kedua dan ketiga mengindikasikan keberadaan tanin
  - h. Hasil positif dikonfirmasi dengan penambahan larutan  $\text{FeCl}_3$  ke dalam ekstrak dan harus dihasilkan karakter endapan berwarna biru, biru kehitaman, hijau, atau biru kehijauan
6. Identifikasi senyawa golongan terpenoid (Depkes RI, 1989)
- a. Ekstrak ditimbang sebanyak 100 mg
  - b. Ditambah 2 mL kloroform dan 3 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat secara hati-hati untuk membentuk lapisan
  - c. Warna coklat kemerahan pada permukaan menandakan adanya terpenoid
7. Pemeriksaan *Thymoquinone*
- a. Disiapkan plat KLT silica gel dengan ukuran 20 cm x 4 cm
  - b. Ditentukan batas bawah 2 cm dan batas atas 1 cm pada plat KLT
  - c. Diukur eluen yang terdiri dari n-heksan:etil asetat = 9:1 yaitu n-heksan sebanyak 90 mL dan etil asetat sebanyak 10 mL (Sousa *et al.*, 2012)
  - d. Dimasukkan eluen ke dalam *chamber*
  - e. Ditimbang 10 mg serbuk standar *thymoquinone* dan dilarutkan dalam 100  $\mu\text{L}$  n-heksan
  - f. Ditotolkan 2  $\mu\text{L}$  ekstrak biji jintan hitam dan 2  $\mu\text{L}$  standar *thymoquinone* pada plat KLT dengan mikropipet, dengan jarak 2 cm antar totolan



- g. Dimasukkan plat KLT ke dalam *chamber* berisi eluen
- h. Diamati hingga eluen mencapai batas atas plat KLT
- i. Dikeluarkan plat KLT dari *chamber*
- j. Diamati noda pada UV *lamp* pada panjang gelombang 254 nm

#### 4.7.1.10 Pembuatan Nanopartikel PLGA Ekstrak Biji Jintan Hitam

1. Preparasi bahan pembuatan nanopartikel
2. Ditimbang ekstrak biji jintan hitam 3456 mg dengan neraca analitis
3. Ditimbang PLGA 17,28 g dengan neraca analitis
4. Diambil propilen karbonat (PC) 1036,8 mL dengan gelas ukur
5. Ekstrak biji jintan hitam dan PLGA dilarutkan dalam PC menggunakan magnetik stirer 500 rpm selama 30 menit hingga tercampur
6. Ditimbang pluronic F68 69,12 g dengan neraca analitis
7. Diambil aquabidestilata 6,912 L dengan gelas ukur
8. Pluronic F68 dilarutkan dalam aquabidestilata menggunakan magnetic stirer 1250 rpm selama 30 menit hingga larut
9. Campuran ekstrak, PLGA, dan PC dipipet kemudian ditambahkan ke dalam campuran pluronic F68 dan aquabidestilata dengan laju 0,5 mL/menit menggunakan mikropipet
10. Campuran tersebut dilakukan sentrifugasi 10000 g selama 30 menit
11. Pellet yang terbentuk dipisahkan dan ditimbang menggunakan neraca analitis
12. Pellet dibilas menggunakan aquabidestilata dengan cara divortex dan disentrifugasi 10000 g dengan suhu 4°C selama 1 jam

13. Pellet yang sudah didiamkan, diresuspensi ke dalam 360 mL aquabidestilata, dan dibagi untuk terapi 6 tikus selama 30 hari

#### 4.7.1.11 Karakterisasi Morfologi Nanopartikel PLGA Ekstrak Biji Jintan Hitam

1. Dibuang cairan dalam sediaan nanopartikel
2. Dipipet pellet lalu diletakkan pada carbon tip
3. Diberi etanol absolut agar cairan cepat menguap
4. Dikonduktifkan
5. Diamati ukuran nanopartikel pada *Scanning Electron Microscope* (SEM) FEI Inspect-S50 pada perbesaran 5.000x, 10.000x, dan 50.000x

#### 4.7.1.12 Pemberian Nanopartikel PLGA Ekstrak Biji Jintan Hitam, Non-Nanopartikel Ekstrak Biji Jintan Hitam dan Glibenklamid pada Tikus

Pemberian nanopartikel PLGA ekstrak biji jintan hitam, non-nanopartikel ekstrak biji jintan hitam dan glibenklamid dilakukan menggunakan sonde setiap hari selama 30 hari. Terapi diberikan 30 menit setelah pemberian pakan. Glibenklamid diberikan dalam bentuk suspensi.

- a. Pembuatan Suspensi Glibenklamid (Can *et al.*, 2004)
  1. Tablet glibenklamid 5 mg digerus halus kemudian disuspensikan dalam 21 mL PBS dan ditambahkan 4 mL propilen glikol
  2. Campuran dihomogenkan menggunakan *ultrasonic water bath* dengan kecepatan 47,6 kHz selama 45 menit hingga terbentuk suspensi yang homogen

3. Tiap 1 mL suspensi ini mengandung 0,2 mg glibenklamid
- b. Metode Sonde (Shimizu, 2004; SOP Laboratory Animal Medicine, 2010)
  1. Mengendalikan tikus dengan menggenggam kulit di atas bahu dengan ibu jari dan jari tengah. Menahan ekor di antara jari manis dan kelingking, kemudian memegang kuat
  2. Memegang tikus dalam posisi tegak (vertikal)
  3. Memperpanjang kepala belakang dengan jari telunjuk di atas kepala untuk menaikkan kepala sehingga membentuk garis lurus dengan kerongkongan
  4. Memasukkan sonde ke sisi kanan mulut tikus lalu mendorong ujung sonde perlahan melewati belakang lidah. Sonde akan melewati kerongkongan dengan mudah jika ditempatkan dengan benar. Jangan dipaksa apabila ada hambatan, sonde dikeluarkan dahulu dan memasukkan kembali. Maksimum volume yang direkomendasikan untuk tikus adalah 1-2 mL/100 gramBB
  5. Setelah pemberian, perlahan-lahan mengeluarkan sonde dari kerongkongan
  6. Mengamati tikus selama 15-30 menit untuk setiap tanda-tanda rasa nyeri atau tertekan

#### 4.7.1.13 Penanganan Tikus Sakit dan Mati

Apabila saat perlakuan ada tikus yang mati dan jumlah yang hidup per kelompok perlakuan kurang dari syarat perhitungan data statistik maka harus dilakukan pengulangan. Tikus yang sakit saat perlakuan segera diterminasi dan dibedah lalu dianalisa kadar katalase. Tikus yang mati saat perlakuan segera



dibedah untuk menganalisa penyebab kematiannya. Induksi STZ dilakukan pada 1 tikus terlebih dahulu untuk mengetahui dosis yang diberikan menyebabkan kematian pada tikus atau tidak. Jika tidak mati dilanjutkan induksi pada semua kelompok perlakuan.

#### 4.7.1.14 Pembedahan

Setelah 30 hari, binatang diterminasi dengan serbuk kloroform. Tikus yang telah diterminasi berdasarkan protokol dalam prosedur tetap pembedahan hewan coba, selanjutnya dilakukan insisi pada daerah perut sampai diafragma dan pankreas diambil.

#### 4.7.1.15 Pemeriksaan Kadar Katalase

*Catalase StressXpress® Colorimetric Activity Kit* digunakan untuk mengukur secara kuantitatif aktivitas katalase pada berbagai macam sampel. Pada kit ini disediakan *bovine catalase standard* untuk pembuatan kurva standar. Perhitungan hasil pada sampel harus berdasarkan kurva standar yang dibuat. Sampel diencerkan dengan bufer uji dan ditambahkan ke dalam sumuran. Hidrogen peroksida ditambahkan pada tiap sumuran dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Kemudian ditambahkan *Colorimetric Detection Reagent*, lalu diikuti dengan penambahan *horseradish peroxidase* (HRP) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. HRP bereaksi dengan substrat (*Colorimetric Detection Reagent*) dengan adanya hidrogen peroksida untuk merubah substrat tidak berwarna menjadi produk yang berwarna merah muda. Produk tersebut dibaca pada panjang gelombang 560 nm. Peningkatan kadar katalase pada

sampel menyebabkan penurunan kadar hidrogen peroksida dan penurunan intensitas warna merah muda. Aktivitas katalase pada sampel dihitung setelah membuat perhitungan yang sesuai untuk tiap pengenceran. Hasil yang diperoleh dalam bentuk unit aktivitas katalase per mL.

#### Preparasi Sampel Jaringan

1. Jaringan dicuci dengan PBS untuk menghilangkan sel darah merah atau gumpalan darah
2. Jaringan dihomogenkan dengan 0,5 mL bufer uji per 100 mg jaringan dan kemudian disentrifugasi 10.000 x g selama 15 menit pada suhu 4°C
3. Supernatan diambil dan segera diuji, atau disimpan pada suhu  $\leq -70^{\circ}\text{C}$

#### Preparasi Standar

Reagen pada kit dikondisikan pada suhu ruang selama 30-60 menit.

##### a. Bufer Uji

Konsentrat bufer uji diencerkan dengan aquades perbandingan 1:5. Setelah dilakukan pengenceran, larutan bufer uji stabil pada suhu 4°C selama 3 bulan.

##### b. Preparasi Standar

Standar disiapkan dengan memberi label 1 sampai 6 pada 6 *microtube*.

Dipipet 190  $\mu\text{L}$  bufer uji ke dalam *microtube* nomor 1 dan 100  $\mu\text{L}$  bufer uji pada *microtube* nomor 2 sampai 6. Ditambahkan 10  $\mu\text{L}$  stok katalase dari vial ke dalam *microtube* nomor 1 dan divortex. Diambil 100  $\mu\text{L}$  larutan katalase pada *microtube* nomor 1 dan ditambahkan ke *microtube* nomor 2 lalu divortex. Ulangi pengenceran untuk *microtube* nomor 3 sampai 6.

Aktivitas katalase pada *microtube* nomor 1 sampai 6 adalah 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,313 dan 0,156 U/mL.

Gunakan standar dalam waktu 2 jam selama preparasi.

**Tabel 4.4 Preparasi Standar**

	Standar 1	Standar 2	Standar 3	Standar 4	Standar 5	Standar 6
Volume bufer uji ( $\mu\text{L}$ )	190	100	100	100	100	100
Penambahan	Stok	Standar 1	Standar 2	Standar 3	Standar 4	Standar 5
Volume penambahan ( $\mu\text{L}$ )	10	100	100	100	100	100
Aktivitas katalase (U/mL)	5,0	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156

#### Preparasi Reagen HRP

Suspensi HRP divortex sebelum dipipet dan pipet dari dasar *tube*.

**Tabel 4.5 Preparasi Reagen HRP**

	$\frac{1}{2}$ plate	1 plate	1,5 plate	2 plate
<i>Horseradish peroxidase</i> (HRP)	27 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	76 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
Bufer Uji	1,323 mL	2,45 mL	3,724 mL	4,9 mL
Campuran akhir	1,35 mL	2,5 mL	3,8 mL	5 mL

#### Protokol Pengukuran

1. Dipipet 25  $\mu\text{L}$  sampel atau standar pada sumuran
2. Dipipet 25  $\mu\text{L}$  bufer uji pada sumuran sebagai blanko
3. Ditambahkan 25  $\mu\text{L}$  hydrogen peroksida pada tiap sumuran
4. Diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit
5. Ditambahkan *Colorimetric Detection Reagent* pada tiap sumuran
6. Reaksi diinisiasi dengan penambahan reagen HRP pada tiap sumuran
7. Diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit
8. Diukur absorbansi pada rentang panjang gelombang 540-580 nm



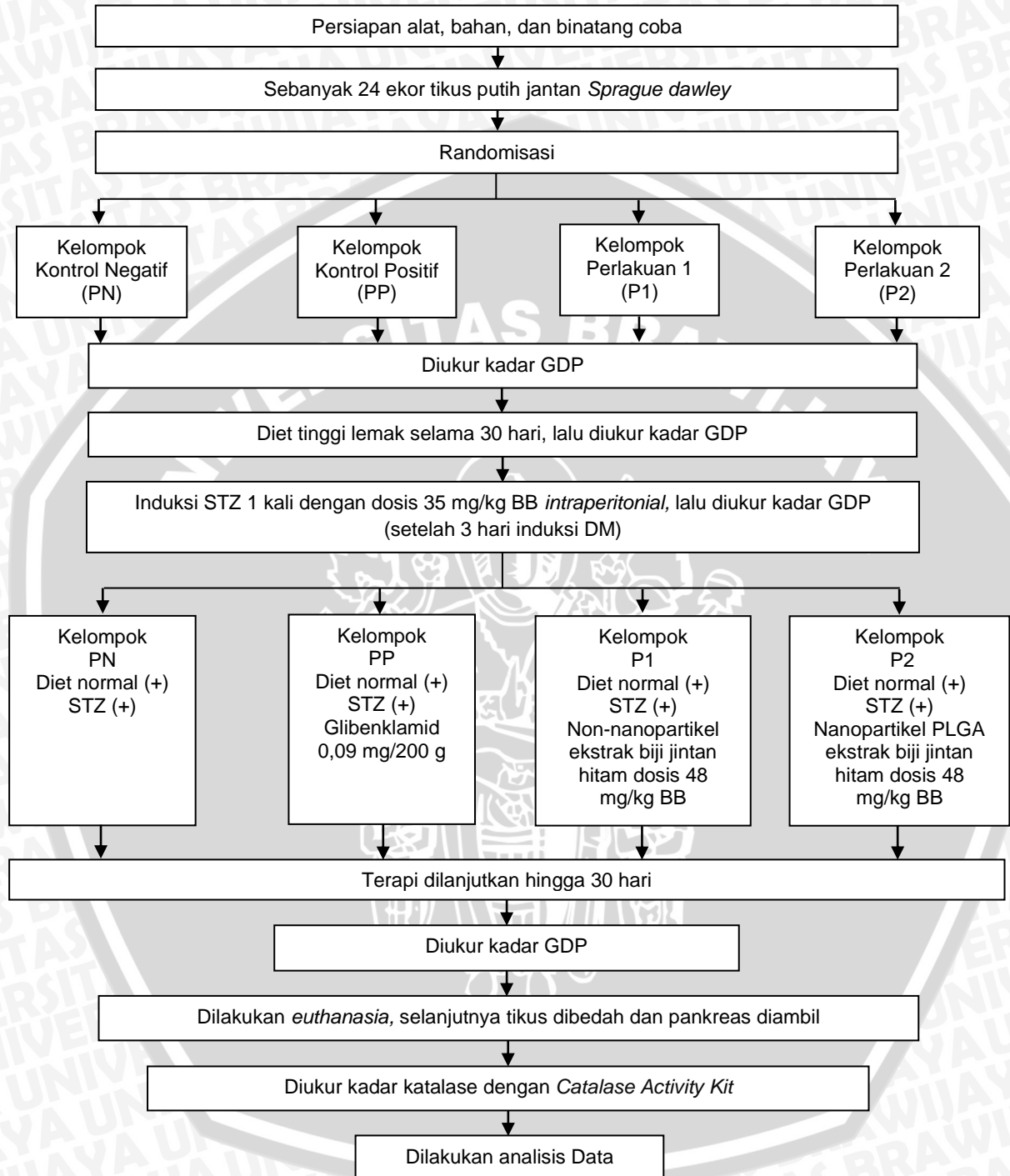
Definisi Unit Katalase: 1 unit katalase mendekomposisi 1 mikromol  $\text{H}_2\text{O}_2$  per menit pada suhu  $25^\circ\text{C}$  dan pH 7

#### 4.7.2 Pengumpulan Data

Tabel 4.6 Tabel Rekaan

Populasi	Berat Badan	Glukosa darah Puasa	Katalase

#### 4.8 Alur Penelitian



#### 4.9 Pengolahan dan Analisa Data

Hasil pengukuran kelompok kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik. Langkah-langkah uji hipotesis komparatif adalah sebagai berikut: Uji normalitas data, Uji homogenitas varian, Uji *One-way* ANOVA, Uji *Post hoc* (*Least Significant Difference*). Prosedur analisis data yang pertama dilakukan adalah uji normalitas dan homogenitas data sebagai syarat uji parametrik selanjutnya. Uji normalitas dilakukan dengan uji Shapiro-Wilk karena besar sampel di bawah 50.

**Tabel 4.7 Uji Normalitas**

Variabel dependen	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
						*

Variabel yang akan dianalisis menggunakan uji statistik parametrik dituliskan di kolom variabel yang diuji normalitas sebarannya. Faktor yang akan menunjukkan normalitas sebaran data adalah bagian kolom yang diberi tanda bintang. Jika signifikansi > 0,05 maka sebaran data dianggap normal.

Setelah melakukan uji normalitas data, selanjutnya dilakukan uji homogenitas. Variabel yang diuji homogenitas variannya dituliskan di kolom variabel, sedangkan hasil homogenitas varian ditunjukkan pada kolom dengan tanda bintang. Jika hasil signifikansi menunjukkan nilai > 0,05 maka varian data dianggap homogen.

**Tabel 4.8 Uji Homogenitas**

Variabel dependen			
Levene Statistic	Df1	Df2	Sig.
			*





Jika dari hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan data yang dianggap normal dan varian data homogen, selanjutnya dilakukan uji *One-way ANOVA*. Dari hasil uji ANOVA dapat diketahui beda antar kelompok dengan melihat signifikansi pada kolom dengan tanda bintang, jika  $p > 0,05$  maka  $H_0$  diterima artinya tidak ada beda yang signifikan antar kelompok. Jika  $p < 0,05$  maka terdapat perbedaan signifikan antar kelompok sehingga perlu dilakukan uji *Post hoc* berupa LSD untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang memiliki beda signifikan.

Jika dari uji normalitas didapatkan signifikansi  $< 0,05$  maka distribusi data tidak normal. Uji untuk data yang tidak memenuhi uji normalitas adalah uji *Kruskal-wallis*. Uji *Kruskal-wallis* adalah uji dengan menggunakan ranking. Hipotesis uji ini adalah bahwa sampel berasal dari populasi yang sama. Analisis yang digunakan berdasarkan  $R_{ij}$  yaitu ranking data, bukan data itu sendiri.