

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan *True Experimental Design* menggunakan jenis post test dengan kelompok kontrol (*Post Test, Control Group*) yang digunakan dalam pengambilan data profil pankreas. Subjek dipilih secara acak untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan karena hewan coba, tempat percobaan, dan bahan yang digunakan dianggap sama. Kelompok yang diberi perlakuan kemudian dilakukan pengukuran, dan hasil pengukuran tersebut dibandingkan dengan hasil pengukuran kelompok kontrol yang tidak menerima perlakuan. Metode pemilihan sampel dilakukan secara acak sederhana (*Simple Random Sampling*), karena setiap populasi memiliki kesempatan yang sama untuk dijadikan sampel.

#### 4.2 Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur Wistar yang diinduksi diabetes mellitus tipe 2 dengan diet tinggi lemak dan streptozotocin dosis rendah.



#### 4.2.1 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria inklusi dan eksklusi ditentukan agar karakteristik sampel tidak menyimpang jauh dari populasi. Tujuan karakteristik sampel memenuhi kriteria populasi yang diinginkan sehingga menurunkan bias pada hasil penelitian. Berikut adalah kriteria inklusi dan eksklusi yang ditentukan:

##### 4.2.1.1 Kriteria Inklusi

Kondisi tikus yang digunakan sebagai subjek penelitian harus memiliki ciri-ciri :

- Tikus yang sehat dan aktif
- Jenis kelamin jantan
- Memiliki berat badan 200-250 gram
- Berusia 75-90 hari
- Tikus (*Rattus novergicus*) galur wistar

##### 4.2.1.2 Kriteria Eksklusi

Kondisi tikus yang tidak termasuk dalam penelitian ini adalah :

- Tikus dengan kondisi cacat atau kelainan anatomi
- Tikus yang menunjukkan tanda-tanda sakit

#### 4.2.2 Sampel

Sampel dalam penelitian dibagi menjadi enam kelompok yaitu kelompok kontrol dan perlakuan. Pengambilan sampel akan dilakukan dengan teknik randomisasi. Berikut adalah rinciannya:

- a) Kelompok I : tikus yang diberi pakan normal (kelompok kontrol negatif).
- b) Kelompok II : tikus yang diinduksi diabetes mellitus tipe 2 dengan diet tinggi lemak dan STZ 35 mg/kg/bb (kelompok kontrol positif).
- c) Kelompok III : tikus yang diinduksi diabetes mellitus tipe 2 dengan diet tinggi lemak dan STZ 35 mg/kg/bb dan diberi ekstrak daun binahong 70 mg/kgbb setiap hari selama 2 minggu.
- d) Kelompok IV : tikus yang diinduksi diabetes mellitus tipe 2 dengan diet tinggi lemak dan STZ 35 mg/kg/bb dan diberi mikrogel nanokapsul enzimatik tanpa binahong (plasebo) setiap hari selama 2 minggu.
- e) Kelompok V : tikus yang diinduksi diabetes mellitus tipe 2 dengan diet tinggi lemak dan STZ 35 mg/kg/bb dan diberi mikrogel nanokapsul enzimatik mengandung ekstrak binahong dengan dosis 70 mg/kgbb setiap hari selama 2 minggu.

#### 4.2.3 Perkiraan Jumlah Sampel

Pada penelitian ini dilakukan pembagian dua kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan sehingga total terdapat 5 kelompok, maka jumlah sampel dalam tiap kelompok dapat dihitung dengan rumus Federer ( Federer, 1991):

$$(n - 1)(t - 1) \geq 15 \dots\dots\dots(4.1)$$

Dengan :

$n$  = jumlah sampel dalam kelompok

$t$  = jumlah kelompok

15 = nilai deviasi

Bila  $t = 5$ , maka :

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Hasil perhitungan menunjukkan jumlah sampel minimum dalam tiap kelompok setelah pembulatan adalah 5 ekor tikus. Jadi dibutuhkan total 25 ekor tikus dalam penelitian ini. Setiap kelompok perlakuan ini ditambahkan 1 ekor tikus. Jadi setiap kelompok ada 6 ekor tikus dalam 5 kelompok, sehingga untuk 5 kelompok diperlukan 30 ekor tikus. Karena pada penelitian sebelumnya terjadi kematian tikus, tikus yang diinduksi oleh diet tinggi lemak selama 5 minggu dan streptozotocin (STZ) 35 mg/kgBB terdapat 2 ekor tikus mati dari 25 ekor tikus pada kelompok pemberian induksi diabetes mellitus tipe 2 (Pranata, 2010). Selain itu, dalam penelitian yang dilakukan oleh Rochma, 2013 tentang efek ekstrak daun binahong terhadap kadar glukosa darah dan profil lipid pada tikus DM tipe 2 dengan injeksi streptozotocin dan diet tinggi lemak mengatakan bahwa ada 5 ekor tikus yang mati pada kelompok perlakuan 3,4, dan 5 dari 6 kelompok perlakuan. Penambahan 1 ekor tikus pada 5 kelompok penelitian pada setiap kelompok penelitian. Setiap kelompok penelitian akan bertambah menjadi 6 ekor tikus, sehingga dibutuhkan 30 ekor tikus. Hal ini dilakukan agar tidak terjadi *loss of sample* pada penelitian ini.

### 4.3 Variabel Penelitian

- Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu dosis ekstrak binahong yang terintegrasi dalam sistem hantaran close-loop mikrogel nanokapsul enzimatik yaitu sebesar 70 mg/kgbb.
- Variabel terikat atau yang diperiksa dalam penelitian ini adalah kerusakan sel beta pulau Langerhans pankreas, jumlah sel beta pankreas dan berat pankreas yang mendapat perlakuan.

### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret 2015 sampai bulan Juli 2015 setelah mendapat persetujuan etik. Penelitian ini dilakukan di berbagai Fakultas Universitas Brawijaya. Berikut ini merupakan tempat yang digunakan untuk penelitian:

- a. Pembuatan ekstrak binahong bertempat di Laboratorium Farmakognosi Prodi Farmasi FKUB dan Laboratorium Bioindustri Fakultas Teknologi Pangan Universitas Brawijaya.
- b. Pembuatan formulasi sediaan mikrogel nanokapsul enzimatik sistem *close loop* bertempat di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya.
- c. Penggunaan kandang tikus ada di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya.
- d. Penggunaan gas nitrogen dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya.

- e. Uji urin secara kualitatif dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- f. Pembuatan preparat pankreas di Laboratorium KESSIMA MEDICA.

## 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

### 4.5.1 Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini tercantum dalam tabel sebagai berikut :

**Tabel 4.1: Rincian bahan yang diperlukan dalam penelitian**

No	Keperluan	Bahan
1.	Pembuatan ekstrak daun binahong	400 gram serbuk simplisia daun binahong dan etanol 70%
2.	Pembuatan nanokapsul enzim	12 mg enzim Glukosa Oksidase (GOx) (TCI), 12 mg enzim katalase (CAT) (TCI), buffer sodium carbonate 50 mM pH 8,5, 6 mg N-acryloxysuccinimide (SigmaAldrich), 40 $\mu$ L dimethyl sulfoxide (DMSO), buffer PBS, buffer sodium carbonate 10 mM pH 8,5, 2,4 gram monomer acrylamide (AAm) (Sigma Aldrich), 3 gram N-(3-aminopropyl)-methacrylamide (APMAAm) (TCI), 1 gram cross-linker N,N'-methylenebisacrylamide (TCI), 4 mg ammonium persulfate (Sigma Aldrich), 40 $\mu$ l deoxygenated water, 40 $\mu$ l deionized water, 4 $\mu$ l N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (BioWorld), buffer PBS
3.	Pembuatan Mikrogel	50 gram <i>chitosan</i> dengan BM 200 kDa, 50 gram sodium tripolyphosphate (STPP), larutan asam asetat 1%, buffer PBS
4.	Pakan normal tikus	Pakan tikus dewasa per tikus per hari adalah 25 gram. Komposisinya adalah : PARS 58,3% (pakan ternak yang mengandung 63,8% karbohidrat, 5% lemak, 19% protein), tepung terigu 26%, dan air sebesar 19,8 %.
5.	Diet tinggi lemak tikus	Pakan tikus dewasa per tikus per hari adalah 25 gram. Komposisinya adalah : PARS 50%, tepung terigu 25%, kolesterol

		1%, asam cholat 0,1%, minyak babi 2,5%, dan air sebesar 21,4%.
6.	Induksi streptozotocin	100 g streptozotocin (BioWorld), buffer sitrat 0,1M dan etanol 70%
7.	Uji toleransi glukosa	6,6 gram glukosa dan 33 ml aquades destilasi konsentrasi 20%
8.	Pembuatan pankreas preparat	Larutan PFA (Para Formalin Aldehid) 4%, parafin, larutan xylol, alkohol, Hometoxylin-Eosin, enelan, air

#### 4.5.2 Alat

Peralatan yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain :

**Tabel 4.2: Rincian alat yang dibutuhkan**

No	Perlakuan	Alat
1.	Pembuatan ekstrak daun binahong	2 buah toples kaca, stirrer, kain flannel, corong, <i>rotary evaporator</i> , timbangan digital, batang pengaduk, cawan porselen, sendok penyusut, gelas ukur, kertas saring.
2.	Pembuatan enzim nanokapsul	tabung erlenmeyer, gelas ukur, pipet tetes, tip, batang pengaduk, aluminium foil, gelas beaker, selang gas nitrogen, lemari es, timbangan digital, mikropipet, stirer, magnetic stirer, seloform.
3.	Pembuatan mikrogel	Gelas beaker, batang pengaduk, pipet tetes, alat sentrifuge, lemari es, valcon 50 ml, mikropipet, stirer, magnetic stirer, vortex, syringe 27 gauge, orbital shaker, alat sentrifuge, mortir, timbangan analitik.
4.	Pembuatan preparat mikrogel	Mikroskop <i>Olympus DP72</i>
5.	Pemeliharaan hewan coba	Kandang individu, rak tempat kandang, botol air, sekam.
6.	Penimbangan berat badan tikus	Timbangan digital, wadah plastik.
7.	Pemberian ekstrak daun binahong, placebo, mikrogel ekstrak binahong pada tikus	Timbangan digital, batang pengaduk, mikropipet, pot kecil, alat sonde, coolbox.
8.	Pemeriksaan glukosa darah tikus	Glucometer dan strip <i>Accu-Check</i>
9.	Pembedahan tikus	Pisau bedah, gunting bedah, papan bedah, pinset, pot organ, label, besi.

10.	Penimbangan pankreas	Timbangan analitik
11	Pembuatan preparat histopatologi organ pankreas dan mengamati preparat yang sudah jadi.	Gelas objek, mikrotom, mikroskop cahaya

#### 4.6 Definisi Operasional

- a) Nanokapsul enzimatik memiliki bentuk sferik dan diameter yang berukuran sekitar ~ 12 nm.
- b) Glukosa oksidase (GOx) merupakan enzim glukosa spesifik yang mengkatalisis glukosa menjadi asam gluconik. Pada penelitian ini enzim GOx dibuat dari *Aspergillus niger*.
- c) *Catalase* (CAT) digunakan untuk mengubah hidrogen peroksida menjadi oksigen yang dapat digunakan kembali untuk mengkatalisis glukosa.
- d) Mikrogel adalah sebuah partikel polimer *cross linker* berpori yang memiliki kemampuan untuk mengembang dalam air. Disesuaikan dengan dimensi, massa jenis, dan sifat lain berdasarkan kondisi lingkungan.
- e) Sistem hantaran *close loop* seperti pankreas buatan yang berkelanjutan dan dapat merespon pelepasan insulin untuk mengubah kadar glukosa darah dan memperbaiki kualitas hidup pasien diabetes.
- f) Serbuk simplisia daun binahong digunakan sebagai zat aktif yang diperoleh dari *Materia Medika Batu*.
- g) Streptozotocin digunakan untuk induksi terjadinya DM tipe 2 dengan cara merusak sel beta pankreas melalui gugus nitrosourea.
- h) Diet tinggi lemak merupakan pakan yang tinggi kolesterol dimodifikasi dengan formulasi tertentu agar menghasilkan keadaan obesitas pada hewan coba tikus.

- i) Profil pankreas yang diukur dari sel beta kerusakan pulau langerhans pankreas secara histologi, jumlah sel beta pankreas dan berat pankreas. Pankreas dapat memproduksi insulin untuk menurunkan kadar glukosa darah.
- j) Proses pewarnaan Hematoxylen-Eosin (HE) merupakan proses pewarnaan yang digunakan untuk mewarnai jaringan. Prinsipnya yaitu inti yang bersifat asam akan menarik zat/ larutan yang bersifat basa sehingga akan berwarna biru. Sitoplasma bersifat basa akan menarik zat /larutan yang bersifat asam sehingga berwarna merah. Pada Hematoxylen-Eosin akan muncul bagian yang bernoda. Untuk asam nukleat (DNA dan RNA) akan memunculkan noda berwarna biru sedangkan pada protein dan karbohidrat akan memunculkan noda berwarna merah mudah hingga merah.

## 4.7 Formulasi

### 4.7.1 Formulasi Nanokapsul Enzimatik

Berikut ini merupakan formulasi enzim nanokapsul yang akan digunakan pada penelitian ini.

**Tabel 4.3: Formulasi Nanokapsul Enzimatik**

No	Bahan	Fungsi	Jumlah
1.	Glukosa oksidase (GOx) atau <i>Catalase</i>	Biosensor glukosa darah	12 mg
2.	Natrium Karbonat pH 8,5 50 mM	Buffer	4 mL
3.	N-acryloxysuccinimide		6 mL
4.	DMSO	Pelarut	4 mikroliter
5.	PBS pH 7,4	Buffer pembilas	qs
6.	Sodium Bicarbonat 10 mM pH 8.5	Buffer	qs
7.	Larutan aquoes Acrylamide (AAM) monomer 200 mg/ml	Polimerisasi	40 mikroliter

8.	Larutan enzim termodifikasi (GOx atau CAT, N-acryloxysuccinimide, DMSO, Sodium Bicarbonat 10 mM pH 8.5)		6 mL
9.	Acrylamide (AAM) monomer/ N-(3-Aminopropyl) methacrylamide (APMAAM)/ crosslinker N,N'-methylene bisacrylamide	Membentuk polimer berikatan silang	8/4/1
10.	Amonium persulfate (APS)	Inisiator polimerisasi	4 mg
11.	Air Deoxygenated (aquabides) dan air deionisasi (aquades)	Pelarut	40 mikroliter
12.	N,N,N',N'-tetramethylenediamine	Monomer (katalis reaksi polimerisasi acrylamide)	4 mikroliter

#### 4.7.2 Formulasi Mikrogel

Tabel 4.4: Formulasi Matrix Mikrogel

No	Bahan	Fungsi	Jumlah
1	<i>Chitosan</i>	Matrix mikrogel	2% b/v
2.	Larutan asam asetat	Pelarut <i>chitosan</i>	1%
3	PBS pH 7.4	Buffer pembilas	qs
4	Sodium TPP 5%	Membentuk ikatan silang dengan <i>chitosan</i> ( <i>cross-linker</i> )	50 ml

Tabel 4.5: Formulasi Mikrogel

No	Bahan	Fungsi	Jumlah
1.	<i>Chitosan</i> /ekstrak enzim nanokapsul	binahong/ Bahan mikrogel	inti 50/50/4.8

#### 4.7.3 Formulasi Ekstrak Binahong

Ekstrak binahong merupakan bahan aktif yang digunakan sebagai antidiabetes. Kebutuhan dosis ekstrak binahong pada kelompok perlakuan 3 dan

5 yaitu 70 mg/kgBB ekstrak binahong. Adapun perhitungan dosis ekstrak binahong tiap tikus sebagai berikut:

a. Perhitungan ekstrak binahong untuk tikus

Apabila diketahui berat badan tikus 200-250 gram, maka :

$$\text{Berat badan tikus} = (200 - 250) \text{ gram} \times 10^{-3} = 0,2 - 0,25 \text{ kg}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis ekstrak binahong} &= 70 \text{ mg/kg} \times \text{BB tikus} \\ &= 70 \times (0,2 - 0,25) \\ &= 14 - 17,5 \text{ mg} \end{aligned}$$

Jadi, ekstrak binahong yang dibutuhkan untuk 12 ekor tikus selama 2 minggu yaitu 2352 – 2940 mg

b. Perhitungan perbandingan komposisi mikrogel

Perbandingan komposisi mikrogel dalam sistem penghantaran *close-loop* terdiri dari *chitosan*/ekstrak binahong/enzim nanokapsul yaitu 50/50/4,8. Apabila sudah diketahui kebutuhan ekstrak binahong yang diperlukan pada formulasi ini untuk kelompok perlakuan ke-5 dengan berat badan tikus 200 gram yaitu 14 mg, maka:

- Berat *Chitosan*  $= \frac{50}{50} \times 14 \text{ mg} = 14 \text{ mg}$
- Berat enzim nanokapsul  $= \frac{4,8}{50} \times 14 \text{ mg} = 1,344 \text{ mg}$

Jadi, komposisi mikrogel yang dibutuhkan pada perlakuan 4 dan 5 untuk 12 ekor tikus selama 2 minggu yaitu 2352 mg untuk *chitosan* dan 225,792 mg untuk enzim nanokapsul

c. Perhitungan rasio monomer

Perbandingan rasio monomer AAm/APMAAm/N,N'-methylene bisacrylamide sebesar 8/4/1. Apabila diketahui larutan aqueous monomer AAm sebesar 40 mikroliter, maka:

- Berat APMAAm  $= \frac{4}{8} \times 40 \text{ mikroliter} = 20 \text{ mikroliter}$
- Berat N,N'-methylene bisacrylamide  $= \frac{1}{8} \times 40 \text{ mikroliter} = 5 \text{ mikroliter}$

#### 4.8 Rasionalisasi Formulasi

- a) Glukosa oksidase merupakan komponen dalam pembuatan nanokapsul enzimatik. Dapat digunakan sebagai sensor glukosa yang dapat mendeteksi kenaikan glukosa dalam darah.
- b) *Catalase* merupakan komponen yang ditambahkan dalam pembuatan nanokapsul enzimatik. Digunakan untuk merubah hidrogen peroksida yang bersifat toksik bagi tubuh menjadi oksigen yang digunakan dalam metabolisme glukosa menjadi asam glukonat. Dapat melindungi enzim dari denaturasi, meningkatkan stabilitas enzim.
- c) N-acryloxysuccinimid merupakan ester aktif. Monomer yang dapat bertautan silang pada basis amina. Adanya golongan amina digunakan untuk preparasi nanogel (Chintanippula & bigala, 2013).
- d) Monomer *acrylamide* digunakan untuk membentuk polimer berikatan silang. Monomer *acrylamide* merupakan monomer yang harus dilarutkan pada pelarut untuk terjadi kondisi polimerisasi (Baker *et al.*, 1993). Pada pembuatan nanokapsul enzimatik menggunakan pelarut air karena dapat terjadi polimerisasi.
- e) N-(3-Aminopropyl) methacrylamide digunakan untuk membentuk polimer yang berikatan silang karena biasanya digunakan untuk menyiapkan polimer-polimer secara amina sehingga dapat membantu dalam meningkatkan muatan dari gel matrik.

- f) N-N'-methylene bisacrylamide digunakan untuk membentuk polimer bertautan silang. Karena merupakan agen yang bertautan silang.
- g) N,N,N',N'-tetramethylenediamine merupakan monomer yang mengkatalisis reaksi polimerasi acrylamide.
- h) *Chitosan* merupakan basis dari mikrogel yang berhasil digunakan dalam pengobatan, memiliki sifat biokompaktibel dan mudah mengalami protonasi (pKa: 6,2-6,8).
- i) Sodium TPP 5% digunakan untuk membuat *cross-link* pada matrik *chitosan* dengan melewati interaksi elektrostatik untuk menangkap nanokapsul enzimatik yang berisi insulin. Insulin yang akan diganti dengan ekstrak binahong.

#### 4.9 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

##### 4.9.1 Prosedur Penelitian

###### 4.9.1.1 Pembuatan Ekstrak Daun Binahong

Proses ekstraksi daun binahong ini merujuk pada penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya. Serbuk simplisia daun binahong yang digunakan diproses dengan teknik cara dingin, yaitu maserasi. Serbuk simplisia daun binahong diperoleh dari *Materia Medica* di Kota Batu yang sertifikat terstandar. Proses pertama yang dilakukan yaitu serbuk simplisia daun binahong ditimbang sebanyak 400 gram kemudian dimasukkan dalam toples kaca pertama. Tambahkan 2 liter etanol 70% ke dalamnya, lalu distirer selama 1 jam dengan kecepatan 450 rpm (dimatikan setiap 30 menit). Toples ditutup dengan rapat dan didiamkan selama 1x24 jam. Setelah itu maserat disaring dengan kain flanel dan hasil maserasi ditampung dalam toples kaca yang kedua. Simpan hasil maserasi pertama pada suhu ruang dan tertutup rapat. Selanjutnya dilakukan proses remaserasi pertama

dengan cara mencampur ampas hasil maserasi pertama tadi dengan 2 liter etanol 70% ke dalam toples 1 dan diaduk dengan batang pengaduk sampai tercampur rata. Campuran ini didiamkan selama 1x24 jam untuk membentuk maserat kedua. Maserat kedua kemudian disaring dengan kain flanel. Hasil maserasi kedua ini dimasukkan ke dalam hasil maserasi pertama di toples 2. Setelah itu dilakukan proses remaserasi yang ketiga menggunakan ampas hasil maserasi yang kedua dengan prosedur yang sama (seperti proses remaserasi pertama). Pada akhirnya diperoleh ekstrak binahong yang berwarna hitam dari hasil tiga kali proses maserasi yang kemudian di rotary evaporator selama 1 jam dengan suhu 40°C dan kecepatan 30 rpm untuk menguapkan sisa pelarut. Proses tersebut menghasilkan ekstrak kental binahong yang selanjutnya disimpan dalam wadah tertutup rapat di lemari es.

#### 4.9.1.2 Pembuatan Nanokapsul Enzimatik

Proses nanoenkapsulasi enzim glukosa oksidase dan katalase melibatkan proses polimerisasi dan proses konjugasi kedua enzim tersebut dengan polimer yang terbentuk. Enzim nanokapsul tersebut diidentifikasi dengan menggunakan SEM (*scanning electron microscopy*) yang memiliki karakteristik berbentuk *spheric* dan berukuran 12 nm. Berikut adalah tahapan proses pembuatan enzim nanokapsul berdasarkan penelitian Gu *et al*, 2013 dengan terdapat sedikit perubahan yang disesuaikan dalam penelitian ini :

1. Ditimbang 12 mg glukosa oksidase (GOx) atau 12 mg *catalase* (CAT) lalu dilarutkan ke dalam 4 ml buffer natrium karbonat dengan pH 8.5, 50 mM
2. Ditimbang 6 mg N-acryloxysuccinimide lalu dicampur dengan 40  $\mu$ L dimethyl sulphoxide (DMSO)

3. Direaksikan campuran (1) ke dalam campuran (2) selama 2 jam dalam suhu ruang
4. Dilakukan pembilasan pada campuran tersebut (3) dengan buffer PBS sebanyak tiga kali
5. Enzim yang telah termodifikasi dilarutkan ke dalam 10 mM buffer natrium bikarbonat pH 5,8 hingga didapatkan konsentrasi 1 mg/ml
6. Dibuat larutan *aqueous* monomer acrylamide (AAm) 200 mg/ml
7. Diambil larutan (6) sebanyak 40  $\mu$ L lalu tambahkan ke dalam 6 ml larutan enzim termodifikasi (5) sambil diaduk selama 10 menit pada suhu 4°C.
8. Selanjutnya secara berurutan ditambahkan N-(3-aminopropyl)-methacrylamide (APMAAm) dan cross-linker N,N'-methylenebisacrylamide ke dalam campuran (7). Rasio molar AAm/APMAAm/cross-linker adalah 8/4/1.
9. Ditimbang 4 mg ammonium persulfate (APS) lalu dilarutkan ke dalam 40  $\mu$ L deoxygenated water, 40  $\mu$ L deionized water, dan 4  $\mu$ L N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
10. Ditambahkan larutan (9) ke dalam campuran (8) agar terjadi proses polimerisasi
11. Polimerisasi dibiarkan berlangsung selama 90 menit dalam medium nitrogen (menggunakan selang nitrogen yang dialirkan ke wadah berisi campuran 10) dan pada suhu ruang
12. Dilakukan pembilasan dengan buffer PBS untuk menghilangkan inisiator (APS) dan monomer yang tidak terpolimerisasi. Simpan enzim GOx nanokapsul dalam wadah tertutup rapat di lemari es

13. Selanjutnya ditimbang 12 mg enzim *catalase* (CAT) lalu dilakukan proses enkapsulasi seperti langkah 1-12.

#### 4.9.1.3 Pembuatan Mikrogel

Matriks mikrogel dibuat untuk menangkap enzim nanokapsul dan ekstrak binahong menjadi suatu partikel mikrogel monodisperse yang digunakan dalam sistem hantaran close-loop. Matriks mikrogel dibentuk dari polimer *chitosan* yang sifatnya biokompatibel dan mudah mengalami protonasi (pKa 6,2 – 7,0). *Chitosan* lebih mudah mengembang pada pH rendah karena gugus amina terionisasi pada pH asam. Efisiensi penangkapan obat dan pelepasan obat bergantung pada jumlah *cross-linker* yang digunakan dan rasio *chitosan* dalam polimer. Metode pembuatan mikrogel berbasis polimer *chitosan* ini adalah menggunakan sistem *electrospraying* yang bertegangan tinggi agar dihasilkan partikel mikrogel monodisperse. Berikut ini tahapan proses pembuatannya (Gu *et al.*, 2013) :

1. Dibuat larutan *chitosan* 2% b/v dengan cara melarutkan *chitosan* dengan BM 200 kDa ke dalam larutan asam asetat 1%
2. Larutan (1) disentrifugasi 10.000 rpm untuk menghilangkan partikel tidak terlarut
3. kemudian ditambahkan ekstrak binahong dan enzim nanokapsul dan diaduk sampai homogen dengan rasio *chitosan*/ekstrak/enzim nanokapsul adalah 50/50/4,8
4. Disiapkan alat *electrosprayer*. Pada receiving container diisi larutan TPP 5% sebanyak 50 ml.

5. Campuran (3) yang sudah homogen kemudian dipindah ke dalam *syringe* dan dibentuk menjadi partikel mikrogel menggunakan metode *electrospraying*.
6. Mikrogel yang terbentuk dibilas dengan PBS sebanyak dua kali.
7. Disentrifugasi 2000 rpm agar mikrogel menjadi konsentrat.
8. Disimpan dalam suhu 4°C dan wadah tertutup rapat.

#### 4.9.1.4 Uji Ukuran Mikrogel

Pengujian ukuran mikrogel menggunakan mikroskop *Olympus DP72* yang disambung ke komputer. Kemudian mengukur ukuran mikrogel dengan software yang ada. Mikroskop ini memiliki resolusi yang baik, kesensitifan yang tinggi, dan kualitas gambarnya baik. Menyiapkan mikrogel yang akan dilihat ukurannya di *slide glass* dan diratakan hingga menjadi lapisan yang tipis. Setelah ditutup dengan *cover glass*. Kemudian mikroskop dinyalakan dan dibuka software yang telah ada.

#### 4.9.1.5 Persiapan Kandang

- Menyiapkan rak besi sebagai tempat kandang tikus
- Menyiapkan kandang individu yang dialiri udara didalam rak tersebut dan di dalamnya diberi sekam.
- Menyiapkan tempat minum tikus.

#### 4.9.1.6 Persiapan Hewan Coba

- Seleksi hewan yang digunakan sebagai model sesuai dengan kriteria yang telah ditetapkan yaitu tikus putih strain wistar, berat 200-250 gram, usia 70 - 90 hari, berjenis kelamin jantan dan sehat serta aktif.
- Tikus yang telah diseleksi, diadaptasikan, dengan cara tikus dimasukkan dalam kandang yang sudah disiapkan dengan diberikan pakan normal dan minum selama 1 minggu
- Tiga kelompok tikus terdiri dari kelompok I dan kelompok II sebagai kontrol dan kelompok III, IV, dan V mendapatkan perlakuan.

#### 4.9.1.7 Penimbangan Berat Badan Tikus

Penimbangan berat badan tikus ini menggunakan timbangan digital. Sebelumnya dilakukan penimbangan terhadap tikus, timbangan dinyalakan dahulu, dan skala 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).

#### 4.9.1.8 Pembuatan dan Pemberian Diet Tinggi Lemak

Pada penelitian yang dilakukan ini diberikan pakan dengan jumlah rata-rata 25 g/hari pada setiap tikus. Jumlah pakan kira-kira 25 gram yang mengandung konsentrasi PARS 12,5 g/hari, tepung terigu 6,25 gram/hari, asam kolat 0,025 % gram/hari dan minyak babi 0,625 g/hari. Pakan tersebut nantinya dicampur dengan

air sebesar 21,4%. Setelah itu, pakan tersebut diaduk dan dijadikan bola-bola sedang dan siap diberikan pada tikus tersebut.

#### 4.9.1.9 Pembuatan Larutan Streptozotocin

Pembuatan larutan streptozotocin dilakukan sesuai dengan prosedur yang ada di laboratorium farmakologi FKUB, yaitu: menimbang streptozotocin sebanyak 312 mg, lalu ditambahkan aquabidest steril dan dilarutkan hingga homogen (sediaan larutan streptozotocin 11 mg/0,5mL). Kemudian melakukan pengecekan pH larutan menggunakan kertas pH, jika pH larutan sudah 4,5, dapat langsung disimpan, namun jika pH lebih dari 4,5 digunakan asam sitrat 0,1 M untuk menurunkan pH. Setelah itu larutan streptozotocin disimpan didalam kulkas sebelum dilakukan injeksi ke tikus.

#### 4.9.1.10 Induksi Larutan Streptozotocin pada Tikus

Penginduksian larutan streptozotocin pada tikus yaitu dengan cara terlebih dahulu menimbang berat badan tikus, melakukan injeksi sekali secara intraperitoneal (i.p) dengan larutan streptozotocin 35 mg/kgBB dan dicek darah GDA setelah 5 minggu diberikan diet tinggi lemak, kemudian larutan streptozotocin tadi dimasukkan ke dalam syringe yang telah disiapkan sebelumnya. Memposisikan tikus ke arah frontal hingga terlihat bagian abdomennya. Setelah itu, pada bagian atas abdomen tikus diusap dengan kapas yang terbasahi dengan etanol 70% dan syringe dimasukkan pada bagian abdomen di daerah intraperitoneal tikus tersebut. Larutan streptozotocin diinjeksi secara perlahan, selanjutnya abdomen tikus diusap kembali dengan kapas yang telah dibasahi

dengan etanol 70%. Setelah induksi larutan streptozotocin ditunggu selama 2 hari dan selanjutnya dilakukan pengukuran kadar glukosa darah.

#### 4.9.1.11 Induksi Glukosa pada tikus

Induksi glukosa yang pertama kali dilakukan adalah tikus dipuasakan selama 12 jam (H0) setelah mendapatkan induksi diet tinggi lemak selama 12 jam dan streptozotocin selama dua hari. Induksi glukosa ini diberikan dengan cara menggunakan sonde dengan larutan glukosa 20 % pada dosis 1 gram/kgBB tikus

Cara pembuatan larutan glukosa 20% untuk tes toleransi glukosa yaitu dengan menyiapkan glukosa sebanyak 6,6 gram setelah itu glukosa dilarutkan dalam *water for injection* (WFI) sebanyak 33 ml lalu divortex hingga homogen.

#### 4.9.1.12 Pemeriksaan Glukosa Darah Tikus

Pertama yang dilakukan adalah memegang tikus dengan serbet setelah itu ujung ekor tikus diberi alkohol dan ditusuk jarum, ekor tikus diurut ke arah distal sehingga darah keluar melalui ujung luka yang sudah dibuat. Setelah itu darah ditempelkan di stik yang ditempelkan pada alat ukur glukosa darah digital, yang kemudian dilihat hasilnya, pemeriksaan glukosa darah puasa (GDP) yang dilakukan pada H0 (sebelum diberikan terapi hari pertama), H1, H7 dan H14. Pemeriksaan glukosa darah pada H0 dilakukan agar dapat memastikan tikus tersebut sudah dalam kondisi DM dengan kadar glukosa >200 mg/dl. Pemeriksaan selanjutnya dilakukan untuk mengetahui efek dari terapi yang diberikan. Lalu pemeriksaan profil glukosa darah pada H1, H7, dan H14 yaitu pemeriksaan profil glukosa darah yang bertujuan untuk mengetahui toleransi glukosa pada tikus dan

mengetahui efek dari ekstrak daun binahong setelah pemberian terhadap kadar glukosa darah tiap 2 jam selama 12 jam, tikus dipuasakan selama 12 jam (mulai malam hari), setelah dipuasakan 12 jam dilakukan pemeriksaan GDP kemudian diberikan induksi glukosa oral (semua kelompok), setelah 30 menit dilakukan pemeriksaan glukosa darah kembali, dan selanjutnya diberikan formulasi ekstrak binahong ( kelompok III, IV, V) dengan sonde, lalu dilakukan pengukuran glukosa darah setiap 2 jam setelah pemberian terapi dalam 12 jam.

#### **4.9.1.13 Pemberian Ekstrak Daun Binahong Tanpa Formulasi dan Ekstrak Daun Binahong dengan Formulasi pada Tikus yang Telah Diinduksi**

Ekstrak daun binahong diberikan pada kelompok III (ekstrak binahong 70 mg/kgBB), IV (plasebo formulasi), dan V (ekstrak binahong 70 mg/kgBB dengan formulasi). Pemberian ekstrak daun binahong yang diformulasi dilakukan dengan menggunakan sonde setiap hari selama dua minggu. Terapi diberikan 30 menit setelah pemberian pakan. Pemberian ekstrak binahong, plasebo, dan ekstrak binahong yang diformulasi dengan metode tersebut.

#### **4.9.1.14 Uji Urin Kualitatif**

Menggunakan kandang *metabolic cage* untuk menampung urin tikus pada setiap kelompok. Mengambil beberapa mili urin di pot untuk dijadikan sampel. Menggunakan reagen benedict sebanyak 2 ml dan ditambahkan urin sebanyak 1 ml. Dimasukan kedalam tabung reaksi. Dipanaskan diselah-selah api hingga mendidih dan mengalami perubahan warna. Dianalisis perubahan tersebut.

#### 4.9.1.15 Pembedahan

Setelah dua minggu perlakuan, tikus dimatikan dengan *euthanasia* sesuai prosedur Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya. Kondisi tikus yang sudah mati akan dilakukan insisi pada daerah dada dan perut lalu dilakukan pengambilan darah jantung sebanyak 10 ml (untuk penelitian kadar serum insulin). Kemudian diambil pankreas, jaringan adiposa, liver, jaringan otot, dimasukkan wadah dan disimpan dalam freezer.

#### 4.9.1.16 Penimbangan pankreas

Penderita diabetes akan mengalami perubahan morfologi pada sel beta, baik dalam ukuran maupun jumlahnya sehingga mengakibatkan penurunan masa pankreas (Guz *et al.*, 2001; Butler *et al.*, 2001). Untuk mengetahui kenaikan berat pankreas. Kenaikan ini ditandai dengan rasio berat dari pankreas dengan berat badan tikus, maka dilakukan penimbangan langsung dengan menggunakan timbangan digital.

#### 4.9.1.17 Pembuatan Preparat Histopatologi Pankreas

Organ difiksasi dengan PFA 4 % selama 18-24 jam, dimasukkan ke dalam aquades selama 1 jam, kemudian didehidrasi dengan alkohol bertingkat 70%, 80%, 90% dan 95% dan dimasukkan ke larutan xylol selama 1 jam. Tahap selanjutnya adalah proses infiltrasi yang dilakukan dalam paraffin cair dan dilembedding ke dalam blok. Jaringan pada blok paraffin dipotong dengan mikrotom setebal 4-5 mikron. Irisan diletakkan pada *object glass* yang sebelumnya direndam dalam poly-L-lysin. Setelah itu, dilakukan inkubasi 24 jam. Selanjutnya

dilakukan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol (5 menit), dilanjutkan dengan proses rehidrasi menggunakan alkohol absolut 95%, 90%, 80% dan 70% secara berurutan masing-masing selama 5 menit. Jaringan kemudian dicuci dengan aquades sekali dilanjutkan dengan PBS pH 7,4 sebanyak 15 menit. Jaringan kemudian diwarnai dengan Mayer's Hematoxylin-Eosin selama 10 menit pada suhu ruang dan dicuci dengan aquades 15 menit. Preparat dikeringkan dan dilakukan mounting menggunakan entellan kemudian ditutup dengan *cover glass*. Preparat yang telah jadi selanjutnya diamati di mikroskop dengan perbesaran 400x (Sholikhatin dkk, 2013).

#### 4.9.2 Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan selama penelitian adalah sebagai berikut:

- Berat badan masing-masing tikus diukur berdasarkan tabel 4.4. Berat badan tikus ditimbang dengan timbangan merk *Sartorius melter* (ketelitian 0,1 kg).

**Tabel 4.6 Pengukuran Berat Badan Tikus**

waktu	Fase Adaptasi (1 minggu)	Fase Induksi Diet Tinggi Lemak (5 minggu)	Fase Induksi Streptozotocin	Fase Terapi (2 minggu)
kelompok				
I			-	
II	1 kali (awal penelitian)	Seminggu sekali	Sebelum diinjeksi	Setiap 2 hari
III				
IV				
V				

Penimbangan ini dilakukan pada awal penelitian pada semua kelompok.

Saat pemberian diet tinggi lemak dilakukan penimbangan setiap minggunya.

Penimbangan selanjutnya dilakukan sebelum diinjeksi STZ untuk menentukan dosis dari STZ, dan setiap dua hari sekali setelah injeksi hingga akhir terapi.

Penimbangan pada fase terapi ditujukan untuk menentukan dosis ekstrak daun

binahong (kelompok III), plasebo formulasi (kelompok IV) dan ekstrak binahong yang diformulasi (kelompok V) yang akan diberikan.

- Pengukuran kadar glukosa darah tikus berdasarkan tabel 4.5. Pengukuran glukosa darah pada bagian ekor dengan menggunakan *glucose check test* untuk memastikan tikus telah mengalami diabetes mellitus tipe 2.

**Tabel 4.7 Jadwal Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah Tikus**

waktu Kelompok	Fase Induksi DM tipe 2: diet tinggi lemak dan injeksi streptozotocin dosis rendah ( 5 minggu 2 hari)	Fase Terapi (2 minggu)			
	I				
II	Sebelum injeksi STZ dan 2 hari setelah dilakukan injeksi STZ (H0)	H1 (diukur setiap 2 jam selama 12 jam)	H7 (diukur setiap 2 jam selama 12 jam )	H14 (diukur setiap 2 jam selama 12 jam )	H15
III					
IV					
V					

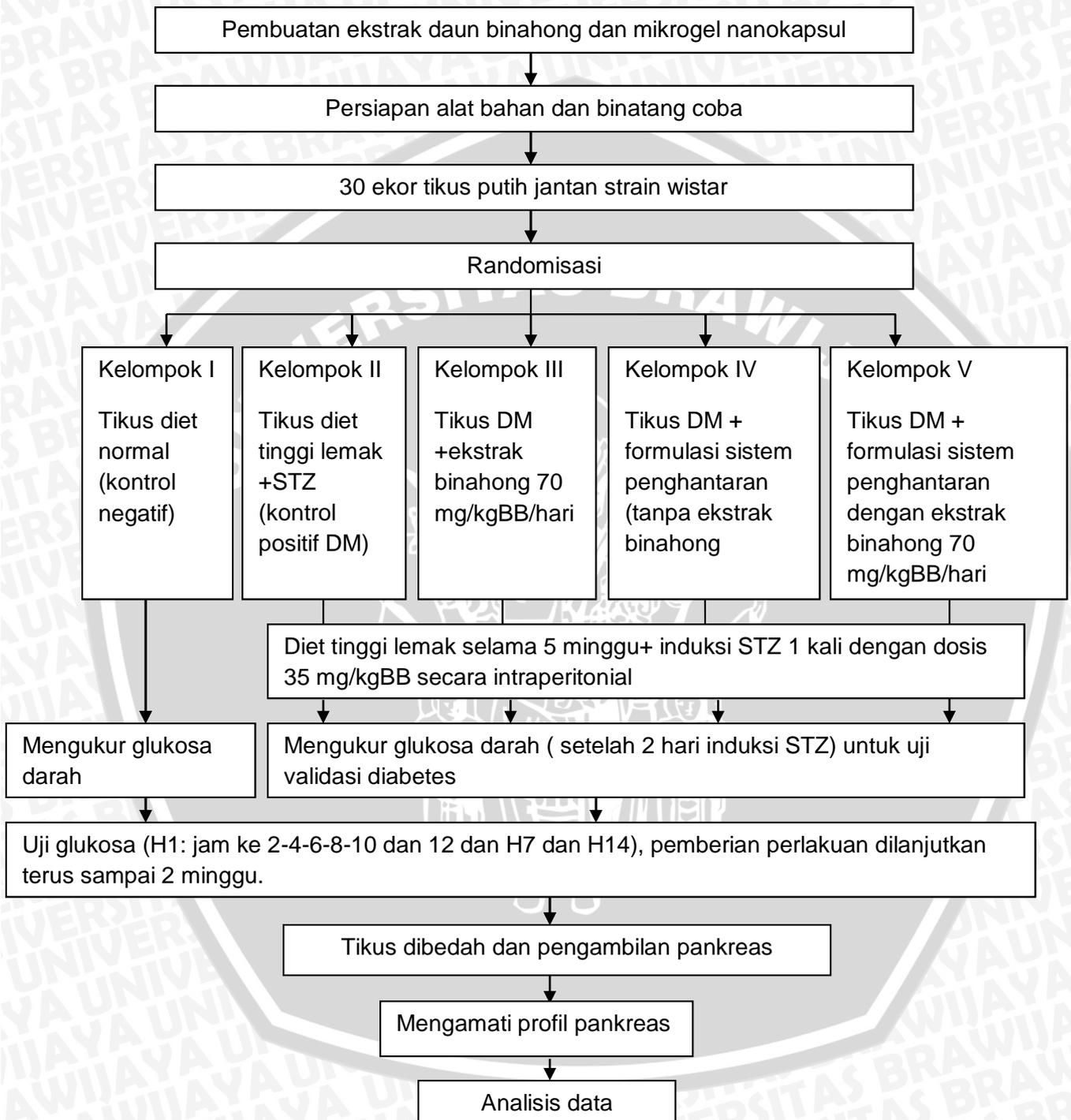
Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan sebelum induksi diabetes mellitus tipe 2. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan sebanyak dua kali yaitu selama induksi diabetes mellitus tipe 2 setelah pemberian diet tinggi lemak selama 5 minggu (sebelum penginjeksian STZ) untuk memastikan bahwa tikus tidak dalam kondisi hipoglikemia ataupun hiperglikemia dan selanjutnya pemeriksaan kadar glukosa darah dilakukan setelah 2 hari injeksi STZ untuk mengetahui tikus sudah dalam kondisi diabetes atau belum. Pada fase terapi yaitu H1, H7 dan H14 pemeriksaan glukosa darah tikus dilakukan setiap 2 jam selama 12 jam untuk mengetahui efek pemberian ekstrak binahong, plasebo formulasi dan ekstrak

binahong dengan formulasi sistem hantaran closed-loop. Pemeriksaan glukosa darah yang terakhir yaitu H15 sebelum dilakukan pembedahan pada tikus tersebut.

- Pemeriksaan profil pankreas dilakukan setelah 15 terapi dengan menggunakan pewarnaan Hematoxylen-Eosin.



#### 4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.1 alur penelitian

#### 4.11 Pengolahan dan Analisis Data

##### a. *One Way Anova*

Analisis statistik dengan *One Way ANOVA* dengan menggunakan *Statistical Package for Social Sciences (SPSS)* versi 20. Uji hipotesis komparatif variabel numerik lebih dari dua kelompok ada beberapa macam yaitu *One Way ANOVA*, uji *Kruskal-Wallis*, uji *Repeated ANOVA* dan uji *Friedmen*. Penggunaan *One Way ANOVA* (uji parametrik) digunakan apabila memenuhi syarat (distribusi data normal, varians sama). Apabila tidak memenuhi syarat, maka diupayakan untuk melakukan transformasi data supaya distribusi menjadi normal dan varians menjadi sama. Jika variabel hasil transformasi tidak berdistribusi normal atau varians tetap tidak sama, maka alternatifnya akan dipilih uji *Kruskal-Wallis* (uji nonparametrik).

Jika pada uji ANOVA atau *Kruskal-Wallis* menghasilkan nilai  $p < 0,05$ , maka dilanjutkan dengan menggunakan analisis Post Hoc (uji *Friedmen*) (Dahlan, 2001). *One Way ANOVA* digunakan untuk menguji perbedaan rata-rata lebih dari dua sampel yaitu diet tinggi lemak dan adanya induksi STZ dengan pemberian dosis ekstrak binahong (kelompok III), formulasi plasebo (kelompok IV) dan formulasi ekstrak binahong yang diformulasi dengan sistem penghantaran closed-loop (kelompok V). Dengan variabel bebas diantaranya berat, dan jumlah sel beta pankreas pada tikus kontrol kemudian mencari mean dan standar deviasi (SD) dengan tingkat kepercayaan 95 % ( $\alpha = 0,05$ ) dimana akan diperoleh  $p > 0,05$  artinya tidak ada perbedaan yang nyata, dan sebaliknya diperoleh  $p < 0,05$  menunjukkan ada perbedaan yang bermakna.

Hipotesis statistik pada penelitian ini adalah

H1 = ada perubahan jumlah, berat, dan perbaikan sel beta pankreas pada tikus wistar diabetes mellitus tipe 2 dengan melihat perbedaan antara dosis etanol ekstrak binahong yang tidak diformulasi, plasebo formulasi, dan ekstrak binahong dengan formulasi sistem penghantaran *close-loop*.

H0 = tidak ada perubahan jumlah, berat, dan perbaikan sel beta pankreas pada tikus wistar diabetes mellitus tipe 2 dengan melihat perbedaan antara dosis ekstrak binahong yang tidak diformulasi, plasebo formulasi, dan ekstrak etanol binahong dengan formulasi sistem penghantaran *close-loop*.

#### **b. Kaplan-Meier**

*Kaplan-Meier* adalah komputasi untuk mengitung peluang *survival*. Metode Kaplan-Meier didasarkan pada waktu kelangsungan hidup individu dan mengasumsikan bahwa data sensor adalah independen berdasarkan waktu kelangsungan hidup. Tujuan untuk estimasi kurva populasi *survival* untuk sampel. Jika pasien diikuti hingga meninggal, maka kurva nya dapat diestimasi secara sederhana dengan menghitung fraksi *surviving* pada setiap waktu.