

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental*, metode yang digunakan adalah *post test-only controlled design*. Rancangan penelitian yang dipakai adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK), yaitu dengan membagi sampel dalam beberapa kelompok perlakuan secara acak.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi target dalam penelitian ini adalah seluruh tikus strain *Sprague dawley* model DM tipe 2.
2. Populasi terjangkau dalam penelitian ini adalah tikus jantan model DM tipe 2 melalui induksi diet tinggi lemak (DTL) selama 40 hari dan injeksi *peritoneal* STZ 35 mg/kgBB satu kali sebagai dosis tunggal.
3. Sampel dalam penelitian ini adalah tikus jantan strain *Sprague dawley* model DM tipe 2 yang diinduksi dengan DTL selama 40 hari dan injeksi *peritoneal* STZ 35 mg/kgBB satu kali sebagai dosis tunggal yang memenuhi kriteria inklusi.

4.2.1 Besar Sampel

Estimasi besar sampel untuk masing-masing perlakuan (4 perlakuan) dihitung menggunakan rumus Federer (Federer, 1991):

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

$$n = 6$$

Keterangan:

t: jumlah perlakuan

n: besar sampel

Dengan demikian, untuk setiap kelompok uji dibutuhkan 6 ekor tikus jantan strain *Sprague dawley* sebagai sampel sehingga total tikus yang dibutuhkan adalah 24 ekor.

4.2.2 Kelompok Perlakuan

Kelompok perlakuan berjumlah 4 (empat) yang dibagi secara acak (P_n , P_1 , P_2 , P_p), dengan ketentuan sebagai berikut:

- Kelompok kontrol negatif (P_n): 6 ekor tikus model DM tipe 2 yang diinduksi dengan DTL selama 40 hari.
- Kelompok perlakuan (P_1): 6 ekor tikus model DM tipe 2 yang diinduksi dengan DTL selama 40 hari dan diberi non-nanopartikel ekstrak biji *Nigella sativa* 48 mg/kg/hari selama 26 hari.
- Kelompok perlakuan (P_2): 6 ekor tikus model DM tipe 2 yang diinduksi dengan DTL selama 40 hari dan diberi nanopartikel PLGA setara ekstrak biji *Nigella sativa* 48 mg/kg/hari selama 26 hari.
- Kelompok kontrol positif (P_p): 6 ekor tikus model DM tipe 2 yang diinduksi dengan DTL selama 40 hari dan diberi Glibenklamid 0,09 mg/200 gBB selama 26 hari.

Berdasarkan penelitian Benhaddou-Andaloussi *et al.* (2011) tentang aktivitas antidiabetes *Nigella sativa* secara *in vivo*, dosis efektif untuk

menurunkan GDP tikus adalah 48 mg/kgBB/hari sehingga pada penelitian ini digunakan dosis tersebut.

4.2.3 Prosedur Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan secara acak agar setiap hewan coba memiliki kesempatan yang sama untuk masuk dalam suatu kelompok perlakuan. Metode yang digunakan adalah sistem lotre sebanyak dua kali. Lotre pertama untuk menentukan perlakuan yang akan diambil terlebih dahulu. Lotre kedua untuk mengelompokkan tikus.

Terlebih dahulu dilakukan lotre untuk menentukan perlakuan yang akan diambil terlebih dahulu. Dalam lotre ini terdapat lima macam kertas yaitu Pn, Pp, P1, dan P2. Kertas yang keluar terlebih dahulu adalah kelompok perlakuan yang lebih dahulu ditentukan anggotanya. Kertas yang telah keluar tidak dimasukkan lagi. Selanjutnya dilakukan lotre untuk menentukan pengelompokan hewan coba. Hewan coba diberi nomor 1 sampai 24 pada kandang menggunakan kertas label. Dalam lotre ini terdapat 24 macam kertas yaitu 1 sampai 24 selanjutnya dilotre untuk menentukan tikus yang masuk kelompok tertentu. Nomor lotre yang sudah diambil tidak dimasukkan kembali.

4.2.4 Kriteria Subyek

Subyek dalam penelitian ini adalah tikus jantan strain *Sprague dawley* karena dapat mensimulasikan kondisi DM tipe 2 dengan baik, penanganan mudah, dan harga terjangkau. Kriteria tikus yang digunakan adalah sebagai berikut:

4.2.4.1 Kriteria Inklusi

- a) Tikus strain *Sprague dawley*.
- b) Berjenis kelamin jantan.

c) Usia 18 bulan.

DM tipe 2 umumnya mulai terjadi pada usia lebih dari 40 atau 50 tahun (Soegondo dan Tanudjaja, 1994). Pada penelitian ini dipilih tikus usia 18 bulan karena tikus berusia 18 bulan setara dengan manusia berusia 45 tahun (Andreollo *et al.*, 2012).

d) Berat badan 180-400 gram.

e) Sehat dan aktif.

4.2.4.2 Kriteria Eksklusi

Tikus yang digunakan sebagai subyek penelitian ini tidak boleh memenuhi kriteria sebagai berikut:

a) Tikus dengan DM sebelum dilakukan induksi DM tipe 2.

b) Tikus dengan gejala infeksi pada sebelum perlakuan, ditandai dengan pembengkakan nodus limfa, adanya luka, dan timbul kemerahan di daerah luka.

c) Tikus yang pernah menjadi subyek penelitian lain sebelumnya.

Subyek yang digunakan bukan manusia karena penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi nanopartikel PLGA dengan non-nanopartikel ekstrak biji *Nigella sativa* sebagai antioksidan pada DM tipe 2 secara pre-klinis selain terapi standar sebelum direkomendasikan penggunaannya pada manusia.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah terapi non-nanopartikel ekstrak biji *Nigella sativa* dosis 48 mg/kgBB/hari, nanopartikel PLGA setara ekstrak biji *Nigella sativa* dosis 48 mg/kgBB/hari, Glibenklamid dosis 0,09 mg/200 gBB yang diberikan selama 26 hari, dan tanpa terapi.

4.3.2 Variabel Tergantung Penelitian

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar MDA otak tikus jantan strain *Sprague dawley* model DM tipe 2.

4.4 Instrumen Analisis

Kadar MDA otak diukur secara kuantitatif menggunakan Spektrofotometer UV-VIS berdasarkan reaksi warna dengan *Thiobarbituric Acid* (TBA).

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakokinetik Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (PSF FKUB) Malang untuk perawatan dan perlakuan hewan coba. Pembuatan ekstrak biji *Nigella sativa* dilakukan di Balai Materia Medika Batu. Pengujian fitokimia kualitatif dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Fitoterapi PSF FKUB. Pembuatan dan karakterisasi nanopartikel ekstrak biji *Nigella sativa* dilakukan di Laboratorium BIOSAINS UB dan Laboratorium Bersama FMIPA Universitas Negeri Malang. Pengukuran kadar MDA otak dilakukan di Laboratorium PSF FKUB. Penelitian dimulai pada Januari 2015 setelah mendapatkan persetujuan etik dan berakhir pada Mei 2015.

4.6 Instrumen Penelitian

4.6.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian dikelompokkan berdasarkan metode masing-masing sebagai berikut:

- a) Pemeliharaan tikus: sekam sebagai alas kandang tikus, pakan *cornfeed* PAR-S dan tepung terigu untuk diet normal, ditambah

kolesterol, asam kolat, dan minyak babi untuk DTL serta air bersih untuk minum tikus.

- b) Pembuatan ekstrak biji *Nigella sativa*: 150 gram serbuk biji *Nigella sativa*. Pelarut ekstraksi yang digunakan adalah etanol 95% sebanyak 900 mL.
- c) Pembuatan nanopartikel ekstrak biji *Nigella sativa* untuk 27 hari: PLGA sebanyak 15,55 g, ekstrak biji *Nigella sativa* sebanyak 3,11 g, *propylene carbonate* (PC) sebanyak 933,12 mL, *Pluronic F 68* sebanyak 62,21 g, *aqua bidest* sebanyak 6,22 L.
- d) Uji fitokimia kualitatif:
 - (i) Pembuatan larutan uji: 500 mg ekstrak biji *Nigella sativa* dan 50 mL etanol 95%.
 - (ii) Uji saponin: larutan uji, 10 mL air panas, minyak zaitun.
 - (iii) Uji flavonoid: larutan uji, 5 mL amonia encer, 1 mL H₂SO₄, dan larutan aluminium 1%.
 - (iv) Uji minyak atsiri: larutan uji, 1 tetes sudan III.
 - (v) Uji alkaloid: larutan uji, 2 mL HCl 2 N, 0,1 g NaCl, 1-2 tetes reagen Mayer, 1-2 tetes reagen Wagner, 1-2 tetes reagen Dragendorff.
 - (vi) Uji tanin: larutan uji, 10 mL larutan NaCl 0,9% panas, 1% larutan gelatin, dan larutan FeCl₃.
 - (vii) Uji terpenoid: larutan uji, 2 mL kloroform, dan 3 mL H₂SO₄ pekat.
 - (viii) Kromatografi lapis tipis: sampel ekstrak biji *Nigella sativa*, standar TQ, 10 mL etil asetat, 90 mL n-heksana, dan plat silika.
- e) Terminasi hewan coba: kloroform 1-2 mL dan kapas.

- f) Pembuatan dan induksi larutan STZ: 500 gram STZ dan 10 mL buffer sitrat pH 4,5, etanol 70%.
- g) Pembuatan suspensi Glibenklamid: tablet Glibenklamid 5 mg, 21 mL PBS, dan 4 mL propilen glikol.
- h) Pengukuran pH sediaan: akuades, sampel suspensi Glibenklamid, sampel non-nanopartikel dan nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa*.
- i) Pemeriksaan MDA otak tikus: homogenat otak tikus, akuades, NaOH 3 M, H₂SO₄ 0,05 M, *Tri Chloride Acetic Acid* (TCA) 2%, dan TBA 0,355%.
- j) Pembuatan kurva baku dan pengukuran panjang gelombang maksimal: akuades, NaOH 3 M, H₂SO₄ 0,05 M, standar MDA, TBA, dan TCA.

4.6.2 Alat Penelitian

- a) Pemeliharaan tikus: kotak plastik untuk kandang tikus, tutup kandang dari anyaman kawat, botol minum, neraca analitis.
- b) Pembuatan ekstrak biji *Nigella sativa*: timbangan digital untuk menimbang sampel, aluminium foil, *Extraction Unit* E-816, *rotary evaporator*, botol gelap untuk wadah ekstrak.
- c) Pembuatan nanopartikel ekstrak biji *Nigella sativa*: timbangan digital, *beaker glass*, gelas ukur, *magnetic stirrer*, mikropipet, dan sentrifuga 10000 g.
- d) Karakterisasi morfologi nanopartikel PLGA: *Scanning Electron Microscope* (SEM) merek FEI tipe Inspect S 50, mikropipet, dan *carbon tip*.

- e) Uji fitokimia kualitatif:
- (i) Pembuatan larutan uji: gelas beker, batang pengaduk, timbangan digital, gelas ukur.
 - (ii) Pemeriksaan saponin: tabung reaksi, gelas ukur, penggaris.
 - (iii) Pemeriksaan flavonoid: plat tetes, pipet tetes.
 - (iv) Pemeriksaan minyak atsiri: plat tetes, pipet tetes.
 - (v) Pemeriksaan alkaloid: cawan porselen, 3 buah tabung reaksi, pipet tetes, gelas ukur, penangas air.
 - (vi) Pemeriksaan tanin: gelas ukur, pipet tetes, gelas beker.
 - (vii) Uji terpenoid: gelas ukur, cawan porselen.
 - (viii) Uji KLT: *chamber* besar, plat KLT silika gel, mikropipet 2 μ L, kertas saring, pinset, dan *UV lamp*.
- f) Pemberian suspensi Glibenklamid, non-nanopartikel dan nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa* pada tikus: sonde lambung tikus.
- g) Pembuatan dan induksi larutan STZ: gelas ukur, gelas beker, mikropipet, vortex, timbangan digital, *sput* 1 mL.
- h) Pembuatan suspensi Glibenklamid: timbangan digital, gelas ukur, batang pengaduk, SONICA.
- i) Pengukuran GDP: glukometer, *glucostick*, *blood lancets*.
- j) Terminasi tikus: toples kaca berukuran besar.
- k) Pembedahan tikus: pisau bedah, papan bedah, pinset, gunting bedah, wadah organ, cawan petri untuk mencuci organ.
- l) Pembuatan homogenat jaringan otak tikus: eppendorf, batang penghancur, gunting, pinset, mikropipet.

- m) Pemeriksaan kadar MDA otak tikus: sentrifuga, vortex, oven dengan pengaturan tekanan, Spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang maksimal (532 nm), mikropipet, *blue tip*, dan *yellow tip*.

4.7 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Skala Data	Keterangan
1.	Kadar glukosa darah puasa (GDP)	Kadar GDP adalah kadar glukosa yang berada di dalam darah disertai dengan tikus dipuaskan selama 10-12 jam dengan cara tidak diberi makan namun tetap diberi minum <i>ad libitum</i> .	Rasio	Kadar GDP diukur sebelum perlakuan, 40 hari setelah induksi DTL, hari ketiga setelah injeksi STZ, dan 26 hari setelah terapi yang diukur dengan glukometer.
2.	DM tipe 2	DM tipe 2 adalah gangguan metabolik yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah akibat resistensi insulin dominan dan defisiensi insulin relatif hingga gangguan sekresi insulin dominan dan resistensi insulin (ADA, 2013).	-	Tikus didefinisikan DM jika kadar GDP > 126 mg/dL (Chinedu <i>et al.</i> , 2014).
3.	Kadar MDA otak tikus	MDA merupakan salah satu hasil akhir peroksidasi lipid yang pada penelitian ini diukur pada otak tikus berdasarkan reaksi warna merah muda dengan TBA pada pengukuran panjang gelombang maksimal.	Rasio	Jika dibandingkan dengan kontrol negatif, semakin tinggi kadar MDA menandakan peroksidasi lipid semakin meningkat. Sebaliknya, semakin rendah kadar MDA menandakan terjadi penurunan peroksidasi lipid (efek antioksidan <i>Nigella sativa</i>).

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Penyiapan Ekstrak Biji *Nigella sativa*

Tahap ekstraksi biji *Nigella sativa*:

- a) Sebanyak 150 g serbuk biji *Nigella sativa* dimasukkan ke dalam *soxhlet thimble*.
- b) Etanol 95% sebanyak 900 mL dimasukkan secara perlahan ke dalam gelas *soxhlet*.
- c) Dilakukan ekstraksi *soxhlet* selama 3 jam dengan pemanas 90%.
- d) Ekstrak dipisahkan dari pelarutnya dengan dievaporasi pada suhu 60°C menggunakan *water bath rotary evaporator* sampai terbentuk ekstrak pekat (semi padat).
- e) Ekstrak disimpan dalam wadah kaca gelap atau wadah porselen tertutup rapat aluminium foil.

4.8.2 Uji Fitokimia Kualitatif

- (i) Identifikasi senyawa golongan alkaloid (Depkes RI, 1989)
 - a. Ekstrak ditimbang sebanyak 100 mg.
 - b. Ditambahkan dengan 2 mL HCl 2 N 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 atau endapan putih.

- 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.
- (ii) 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 minyak zaitun.
- (iii) 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_2SO_4 . Reaksi positif menunjukkan terbentuknya warna kuning.
 - e. Bagian kedua ditambah 1% larutan aluminium (Al). Reaksi positif menunjukkan warna kuning.
 - f. Ekstrak bagian ketiga 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.
- (iv) Identifikasi senyawa golongan terpenoid (Depkes RI, 1989)
- Ekstrak ditimbang sebanyak 100 mg.
 - Ditambah 2 mL kloroform dan 3 mL H₂SO₄ pekat secara hati-hati untuk membentuk lapisan.
 - Warna cokelat kemerahan pada permukaan menandakan adanya terpenoid.
- (v) Identifikasi senyawa golongan tanin (Depkes RI, 1989)
- Ekstrak ditimbang sebanyak 100 mg.
 - Dilartukan dalam 10 mL larutan NaCl 0,9% panas dan disaring.
 - Dibagi menjadi tiga bagian sama banyak (A, B, dan C).
 - Ditambahkan larutan NaCl pada bagian pertama (A).
 - Ditambahkan larutan gelatin 1% pada bagian kedua (B).
 - Ditambahkan reagen gelatin-NaCl pada bagian ketiga (C).
 - Endapan yang terbentuk oleh reagen kedua dan ketiga mengindikasikan keberadaan tanin.
 - Hasil positif dikonfirmasi dengan penambahan larutan FeCl₃ ke dalam ekstrak dan harus dihasilkan karakter endapan berwarna biru, biru kehitaman, hijau, atau biru kehijauan.
- (vi) Identifikasi minyak atsiri (Stahl, 1985)
- Dilakukan pembuatan larutan uji dengan cara melartukan sebanyak 500 mg ekstrak biji *Nigella sativa* 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.

4.8.3 Uji Kualitatif Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Berikut metode identifikasi kandungan TQ dalam ekstrak etanol biji *Nigella sativa* dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT):

- a) Disiapkan plat KLT silika *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 digunakan, terdiri dari n-heksana : etil asetat = 9 : 1 dalam 100 mL yaitu n-heksana 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 TQ menggunakan neraca analitis dan dilarutkan dalam 100 μ L n-heksan.
- f) Ditotolkan 2 μ L ekstrak biji *Nigella sativa* dan 2 μ L standar TQ pada plat KLT dengan mikropipet dengan jarak 2 cm antar totolan.
- g) Dimasukkan plat KLT ke dalam *chamber* berisi 100 mL eluen.
- h) Diamati hingga eluen mencapai batas atas plat KLT.
- i) Dikeluarkan plat KLT dari *chamber* dan dikeringkan \pm 2 menit.

Diamati noda ekstrak biji *Nigella sativa* dan standar TQ pada sinar UV $\lambda = 254$ nm (Velho-Pereira *et al.*, 2011).

4.8.4 Pemeliharaan Hewan Coba

Hewan coba yang menderita dan mati untuk kepentingan manusia perlu dijamin kesejahteraannya dan diperlakukan secara manusiawi. Dalam penelitian yang melibatkan hewan coba, harus diterapkan prinsip 3 R (*replacement*,

reduction, dan *refinement*). *Replacement* adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan dengan benar, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.

Reduction adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian dengan jumlah sesedikit mungkin, tetapi dengan hasil optimal. Jumlah hewan coba dapat dihitung menggunakan rumus Federer. *Refinement* adalah memperlakukan hewan coba secara manusiawi (*humane*) dengan memperhatikan beberapa kondisi, yaitu (Ridwan, 2013): bebas dari rasa lapar dan haus, ketidaknyamanan, rasa nyeri, dan ketakutan serta stres jangka panjang. Berikut adalah prosedur pemeliharaan hewan coba:

- a) Sebelum dilakukan perlakuan hewan coba, tikus diadaptasikan selama 7 hari.
- b) Tikus ditempatkan pada kandang hewan coba yang terbuat dari kotak plastik dengan tutup terbuat dari kawat. Setiap kandang berisi 1 ekor tikus.
- c) Makanan tikus disediakan berupa pakan *cornfeed* PAR-S dan tepung terigu dengan perbandingan 3:1 selama 7 hari pengkondisian hewan coba.
- d) Makanan tikus berupa DTL diberikan selama 40 hari.
- e) Botol minum disediakan pada kandang hewan coba dan rutin diganti setiap hari.
- f) Kandang tikus diberi sekam yang rutin diganti 2 kali setiap minggu.
- g) Suhu kandang tikus adalah suhu kamar (20-25°C).

- h) Penerangan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap siklus terang dimulai pukul 06.00 sampai 18.00.
- i) Apabila ketika penelitian tikus menderita maka perlu dilakukan penyesuaian kondisi sehingga meminimalkan penderitaan tikus. Misalnya, jika hewan coba tidak mau makan dengan DTL maka dilakukan penyesuaian DTL diberikan dua hari sekali secara bergantian dengan pakan normal.
- j) Apabila tikus terlihat menderita karena sakit maka tikus dieutanasia dan dibedah untuk dianalisis kelainan yang mungkin terjadi pada organnya.
- k) Apabila ketika penelitian tikus mati sebelum dilakukan terminasi, maka tikus dibedah dan dilihat organnya untuk dianalisis kelainan yang mungkin terjadi.

4.8.5 Induksi DM tipe 2

- a) Diet Tinggi Lemak (DTL)

DTL terbuat dari campuran PARS 50%, tepung terigu 25%, kolesterol 1%, asam kolat 0,1%, minyak babi 2,5%, dan air 21,4%. DTL diberikan selama 40 hari sebelum terapi. Jumlah pakan sebanyak 25 g/hari/tikus. 25 g DTL terbuat dari (Pranata, 2010):

 - 1) Konsentrat PARS 50% x 25 g = 12,5 g/hari.
 - 2) Tepung terigu 25% x 25 g = 6,25 g/hari.
 - 3) Kolesterol 1% x 25 g = 0,25 g/hari.
 - 4) Asam cholat 0,1% x 25 g = 0,025 g/hari.
 - 5) Minyak babi 2,5% x 25 g = 0,625 g/hari.

b) Induksi *Intraperitoneal* Streptozocin (STZ) (Dewi, 2010)

(i) Pembuatan larutan STZ

- 1) Streptozocin (STZ) 500 gram dilarutkan ke dalam 10 mL buffer sitrat pH 4,5, selanjutnya di vortex hingga homogen, sehingga dihasilkan larutan STZ stok.
- 2) Larutan STZ stok disimpan pada suhu 4°C.
- 3) Terbentuk sediaan larutan STZ 50 mg/1 mL (tiap 1 mL larutan mengandung 50 mg STZ).

(ii) Injeksi larutan STZ pada tikus

- 1) Berat badan tikus ditimbang untuk menentukan STZ yang diperlukan.
- 2) Setelah pemberian diet, tikus dipuasakan semalam, hewan kemudian diinjeksikan dengan larutan STZ dosis rendah (35 mg/kgBB) di bagian *intraperitoneal* (Srinivasan *et al.*, 2005).
- 3) Larutan STZ dimasukkan ke dalam *sprit* dengan volume sesuai perhitungan dosis.
- 4) Tikus dipegang erat, diposisikan dengan bagian perut menghadap ke arah atas dan kepala sedikit menghadap ke bawah.
- 5) Permukaan perut tikus diusap dengan kapas yang mengandung etanol 70%.
- 6) Larutan STZ diinjeksi secara perlahan, selanjutnya bagian perut yang diinjeksi diusap kembali dengan kapas yang mengandung etanol 70%.

4.8.6 Pembuatan Nanopartikel PLGA Ekstrak Biji *Nigella sativa*

4.8.6.1 Perhitungan Bahan untuk Pembuatan Nanopartikel PLGA

Ekstrak Biji *Nigella sativa*

Formula pembuatan nanopartikel (Paul *et al.*, 2011):

Perbandingan PLGA : ekstrak : *propylene carbonate* (PC) : *polyoxyethylene-polyoxypropylene* (*Pluronic F 68*) (1%) adalah 50 mg : 10 mg : 3 mL : 200 mg/20 mL.

Perhitungan kebutuhan bahan yang diperlukan untuk 6 tikus dengan dosis ekstrak biji *Nigella sativa* 48 mg/kgBB/hari/tikus selama 27 hari dalam penelitian ini:

a) Bobot ekstrak biji *Nigella sativa* yang dibutuhkan

$$\begin{aligned} \text{Ekstrak biji } Nigella sativa &= 48 \text{ mg/kgBB/hari/tikus} \times 0,4 \text{ kg (rata-rata} \\ &\quad \text{berat badan tikus)} \\ &= 19,2 \text{ mg/hari/tikus} \times 6 \text{ ekor tikus} \times 27 \text{ hari} \\ &= 3110,4 \text{ mg} \end{aligned}$$

b) Bobot PLGA yang dibutuhkan

Berdasarkan formula Paul *et al.* (2011) yang menggunakan 50 mg PLGA untuk 10 mg ekstrak sehingga kebutuhan PLGA untuk 3110,4 mg ekstrak:

$$\frac{10 \text{ mg}}{50 \text{ mg}} = \frac{3110,4 \text{ mg}}{x \text{ mg}} \rightarrow x = 15552 \text{ mg} = 15,552 \text{ g}$$

c) Volume PC yang dibutuhkan

Berdasarkan formula Paul *et al.* (2011) yang menggunakan solven 3 mL PC untuk melarutkan 10 mg ekstrak sehingga PC yang dibutuhkan untuk melarutkan 3110,4 mg ekstrak:

$$\frac{10 \text{ mg}}{3 \text{ mL}} = \frac{3110,4 \text{ mg}}{x \text{ mL}} \rightarrow x = 933,12 \text{ mL} = 0,933 \text{ L}$$

d) Bobot *Pluronic F 68* yang dibutuhkan

Berdasarkan formula Paul *et al.* (2011) yang menggunakan 10 mg ekstrak untuk 200 mg *Pluronic F 68* sehingga kebutuhan *Pluronic F 68* yang dibutuhkan untuk 3110,4 mg ekstrak:

$$\frac{10 \text{ mg}}{200 \text{ mg}} = \frac{3110,4 \text{ mg}}{x \text{ mg}} \rightarrow x = 62,208 \text{ mg} = 62,208 \text{ g}$$

e) Volume *aqua bidest* yang dibutuhkan

Volume *aqua bidest* yang dibutuhkan untuk membuat *Pluronic F 68* 1%:

$$\frac{1 \text{ g}}{100 \text{ mL}} = \frac{62,208 \text{ g}}{x \text{ mL}} \rightarrow x = 6.220,8 \text{ mL} = 6,2208 \text{ L}$$

4.8.6.2 Prosedur Pembuatan Nanopartikel PLGA Ekstrak Biji *Nigella*

sativa

1. Preparasi bahan-bahan yang diperlukan.
2. Ditimbang 3110,4 mg ekstrak biji *Nigella sativa* dengan timbangan digital.
3. Ditimbang 15,552 g PLGA dengan timbangan digital.
4. Diambil 933,12 mL PC dengan gelas ukur.
5. Ekstrak biji *Nigella sativa* dan PLGA dilarutkan dalam PC menggunakan *magnetic stirrer* 500 rpm selama 30 menit sampai tercampur.
6. Ditimbang 62,08 g *Pluronic F 68* dengan timbangan digital.
7. Diambil 6,2208 L *aqua bidest* dengan gelas ukur.

8. *Pluronic F 68* dilarutkan dalam *aqua bidest* menggunakan *magnetic stirrer* 1250 rpm selama 30 menit sampai larut dan homogen.
9. Campuran ekstrak, PLGA, dan PC dipipet menggunakan mikropipet dan ditambahkan ke dalam campuran *Pluronic F 68* dan *aqua bidest* dengan laju pemberian 0,5 ml/menit.
10. Campuran larutan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 10000 g dan T = 4°C selama 30 menit.
11. *Pellet* yang terbentuk dipisahkan dan ditimbang menggunakan timbangan digital.
12. *Pellet* dibilas menggunakan *aqua bidest* dengan cara divorteks dan disentrifugasi 10000 g T=4°C selama 1 jam.
13. *Pellet* didiamkan dan diresuspensi ke dalam 324 mL *aqua bidest*. Sediaan ini diberikan untuk terapi 6 tikus kelompok P₂ selama 27 hari.
14. Volume sediaan yang diberikan pada tikus P₂ menggunakan rumus:

$$\frac{BB \text{ tikus (g)}}{400 \text{ g}} \times 2 \text{ mL}$$

4.8.7 Karakterisasi Morfologi Nanopartikel PLGA Ekstrak Biji *Nigella sativa*

Karakterisasi morfologi nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa* dalam penelitian ini menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) merek FEI tipe Inspect S 50 yang memiliki kemampuan memindai struktur permukaan sampel perbesaran 1.000.000 kali. Berikut adalah prosedur karakterisasi morfologi ekstrak biji *Nigella sativa* menggunakan SEM:

- a) Dibuang cairan dalam sediaan nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa*.
- b) Dipipet *pellet* lalu diletakkan pada *carbon tip*.
- c) Diberi etanol absolut agar cairan cepat menguap.
- d) Dikonduktifkan.
- e) Diamati ukuran nanopartikel pada SEM perbesaran 5000 kali, 10000 kali, dan 50000 kali.

4.8.8 Pengukuran Kadar Glukosa Darah Puasa (GDP)

- a) Sebelum dilakukan pemeriksaan kadar GDP, tikus dipuasakan 10-12 jam (mulai malam hari) (Oguanobi *et al.*, 2012).
- b) Tikus diangkat dengan cara memegang bagian ujung ekor dan diletakkan pada tempat yang datar. Tikus dipegang menggunakan tangan kiri yang bergerak dari belakang dengan jari tengah dan telunjuk mengunci tengkuk tikus, sementara ibu jari menjepit kaki depan tikus. Bisa juga untuk perlakuan yang hanya memerlukan ekor, tikus bisa dimasukkan ke dalam *holder*.
- c) Ujung ekor diberi alkohol dan ditusuk jarum. Ekor diurut ke distal sehingga darah keluar melalui ujung luka.
- d) Darah ditempelkan di stik yang ditempelkan pada alat ukur digital, kemudian dilihat hasilnya.
- e) Pemeriksaan glukosa darah puasa dilakukan pada: sebelum perlakuan, 40 hari setelah induksi DTL, hari ketiga setelah induksi STZ, dan 26 hari setelah diberikan terapi.

4.8.9 Pembuatan Suspensi Glibenklamid (Can *et al.*, 2004)

- a) Tablet Glibenklamid 5 mg digerus halus kemudian disuspensikan dalam 21 mL PBS dan ditambahkan 4 mL propilen glikol.
- b) Campuran dihomogenkan menggunakan *ultrasonic water bath* dengan kecepatan 47,6 kHz selama 45 menit hingga terbentuk suspensi yang homogen.
- c) Tiap 1 mL suspensi ini mengandung 0,2 mg Glibenklamid.

4.8.10 Metode Penyondean (Shimizu, 2004; SOP Laboratory Animal Medicine, 2010)

- a) 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.
- b) Memegang tikus dalam posisi tegak (vertikal).
- c) Memperpanjang kepala belakang dengan jari telunjuk di atas kepala untuk menaikkan kepala sehingga membentuk garis lurus dengan kerongkongan.
- d) 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 dimasukkan kembali. Maksimum volume yang direkomendasikan untuk tikus adalah 1-2 mL/100 gBB.
- e) Setelah pemberian, perlahan-lahan mengeluarkan sonde dari kerongkongan.

- f) Mengamati tikus selama 15-30 menit untuk setiap tanda-tanda rasa nyeri atau tertekan.

4.8.11 Terminasi Hewan Coba

- a) Terminasi tikus dilakukan dengan inhalasi menggunakan kloroform.

Langkah terminasi tikus adalah sebagai berikut:

- Disiapkan toples kaca berukuran sedang/besar dan beberapa kapas yang sudah dibasahi dengan kloroform.
- Kapas yang sudah dibasahi dengan kloroform dengan jumlah secukupnya dimasukkan ke dalam toples.
- Tikus yang siap diterminasi dimasukkan ke dalam toples dengan hati-hati.
- Ditunggu hingga tikus tidak bergerak lagi yang menandakan tikus sudah tidak sadar.

- b) Setelah tikus dipastikan tidak sadar, dilakukan pembedahan berdasarkan protokol dalam prosedur tetap pembedahan hewan coba di laboratorium untuk diambil otaknya.

4.8.12 Penanganan Hewan Coba Setelah Penelitian

Tikus yang dikorbankan untuk penelitian selanjutnya akan dikubur di dalam tanah sesuai dengan prosedur tetap laboratorium, yaitu:

- a) Semua tikus dibungkus dengan plastik hitam.
- b) Disiapkan lubang dengan cara menggali tanah berukuran $\pm 1 \text{ m} \times 1 \text{ m} \times 2 \text{ m}$.
- c) Semua tikus dimasukkan ke dalam lubang tersebut secara perlahan dan dilakukan penguburan.

4.8.13 Pembuatan Larutan Baku Kerja

Larutan baku kerja dibuat dengan cara mengencerkan standar MDA hingga kadar 0; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; dan 100 ng/mL.

4.8.14 Pengukuran Panjang Gelombang Maksimal

Prinsip dari metode ini adalah reaksi antara MDA dengan asam tiobarbiturat (*thiobarbituric acid/TBA*) pada kondisi asam dan suhu tinggi sehingga membentuk kompleks MDA-(TBA)₂ yang berwarna merah muda (Illie and Margina, 2012). Larutan diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-VIS pada rentang panjang gelombang 400-750 nm untuk memperoleh panjang gelombang maksimal dengan absorbansi MDA-(TBA)₂ tertinggi.

4.8.15 Pembuatan Kurva Baku

- a) Larutan baku dengan berbagai kadar tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimal yang telah diukur sebelumnya.
- b) Dibuat kurva kadar terhadap kadar MDA, dicari persamaan regresi dan besaran R mendekati satu untuk memperoleh linearitas yang baik.

4.8.16 Pengukuran Kadar MDA Otak

4.8.16.1 Pembuatan Homogenat Otak

Pembuatan homogenat jaringan otak menggunakan metode berikut ini:

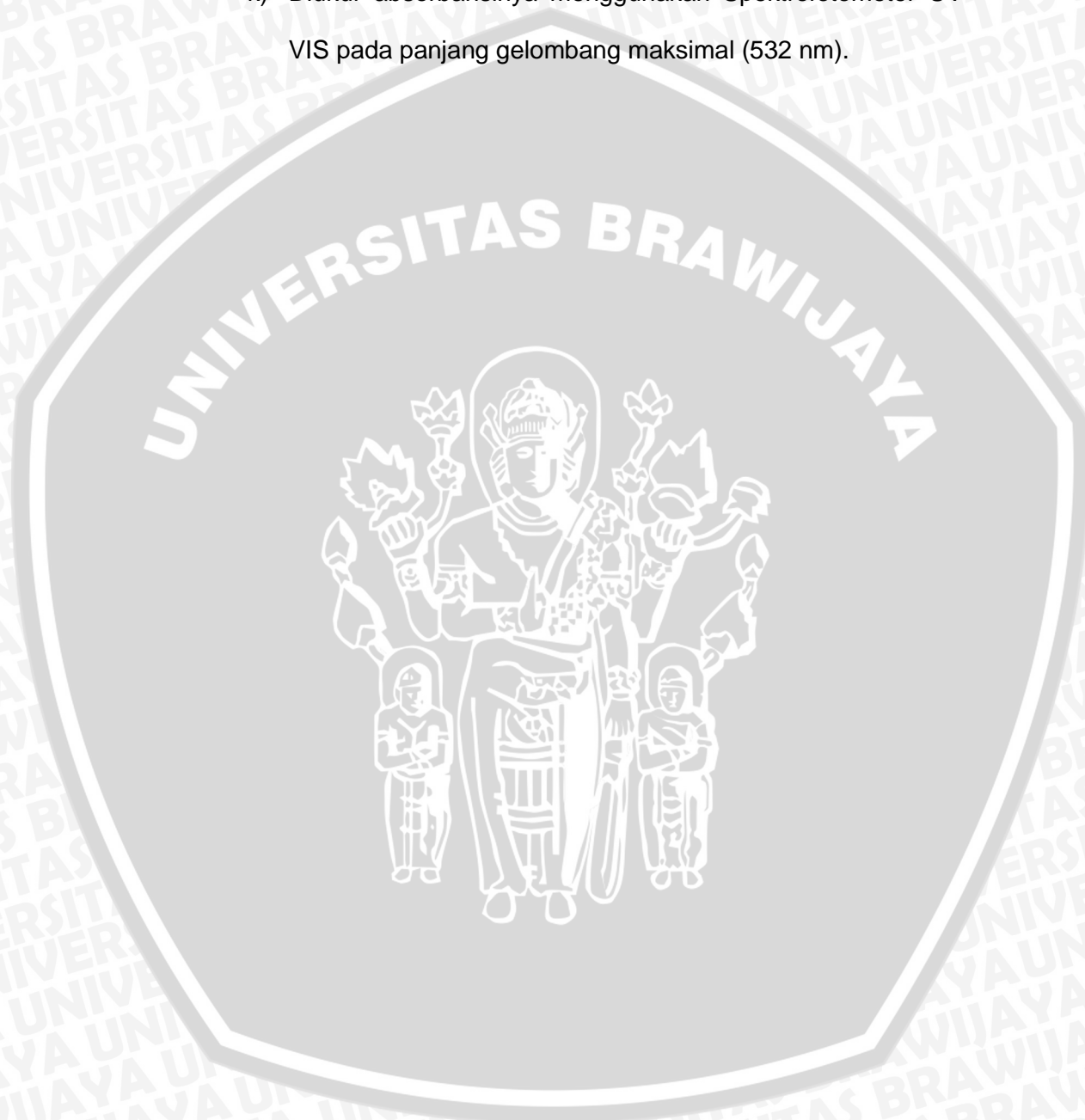
- a) Organ otak dibersihkan dari lemak kemudian dicuci dengan PBS.
- b) Diambil sebanyak 100 mg.

- c) Dihomogenkan pada *microtube* 1,5 mL menggunakan batang penghancur dan ditambahkan 500 μ L PBS pH 7 sambil tetap ditumbuk hingga homogen.
- d) Divortex hingga homogen.
- e) Disentrifugasi dengan kecepatan 2800 rpm selama 7 menit untuk memisahkan debris.
- f) Sebanyak 1 mL supernatan dipindahkan ke dalam *microtube* baru.
- g) Supernatan yang diperoleh disimpan pada suhu -20°C selama minimal 2 jam.

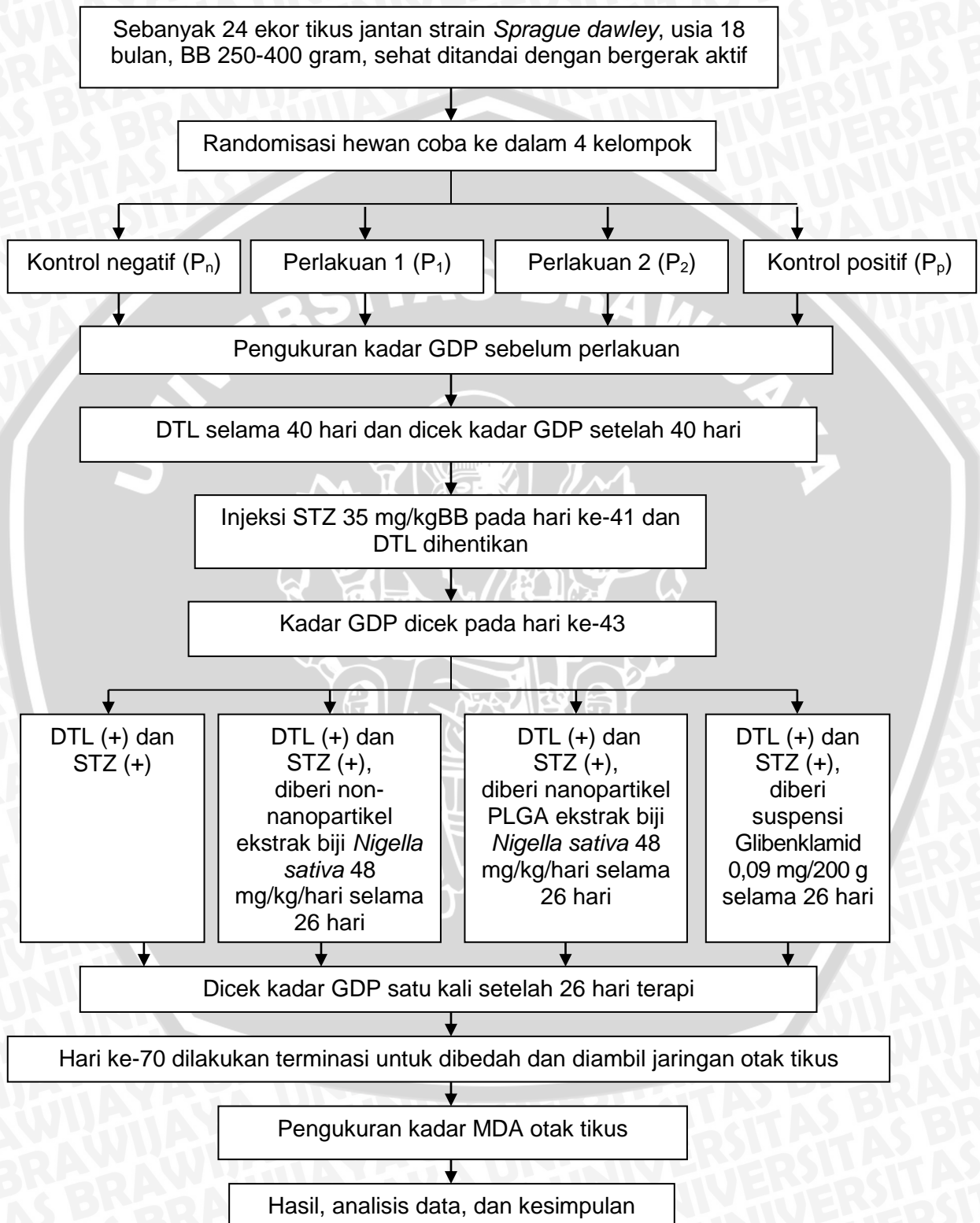
4.8.16.2 Pengukuran Kadar MDA Otak

- a) Sebanyak 200 μ L supernatan otak dipindahkan dalam falkon baru.
- b) Disiapkan 400 μ L akuades dalam falkon yang akan digunakan sebagai blanko.
- c) Supernatan dan blanko ditambahkan 50 μ L NaOH 3 M kemudian divortex hingga homogen.
- d) Diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit.
- e) Ditambahkan 2 mL H_2SO_4 0,05 M dan 1 mL TCA 20% kemudian divortex hingga homogen.
- f) Disentrifugasi 3000 rpm pada 4°C selama 10 menit.
- g) Sebanyak 2 mL supernatan dan blanko dipindahkan pada falkon baru.
- h) Ditambahkan 1 mL TBA 0,355% kemudian divortex hingga homogen.

- i) Diinkubasi pada suhu 90°C selama 40 menit.
- j) Disentrifugasi 3000 rpm pada 4°C selama 10 menit.
- k) Diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang maksimal (532 nm).



4.9 Alur Penelitian



Skema 4.1 Alur Penelitian



4.10 Analisis Data

Data hasil penelitian ini dianalisis secara komputerisasi menggunakan *software Statistical Product and Service Solution*, IBM SPSS Statistics 20 dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Hipotesis pada penelitian ini berupa hipotesis komparatif tidak berpasangan lebih dari dua kelompok dengan variabel bebas dan variabel tergantung berupa data numerik sehingga uji yang dilakukan adalah uji parametrik *One-way Analysis of Variance* (ANOVA) dengan alternatifnya yaitu uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*. Syarat untuk melakukan uji *One-way ANOVA* adalah distribusi data normal dan homogeny. Oleh karena itu, dilakukan uji normalitas data dan uji homogenitas varian.

Uji normalitas dilakukan dengan uji *Shapiro-Wilk* karena besar sampel di bawah 50. Pada uji *Shapiro-Wilk*, jika signifikansi lebih dari 0,05 maka data dianggap normal, namun jika distribusi data tidak normal maka dilakukan transformasi data untuk menormalkan data. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dengan memasukkan variabel ke dalam uji *One-way ANOVA* disertai dengan homogenitas varian. Jika signifikansi menunjukkan nilai di atas 0,05 maka varian data dianggap homogen, namun apabila data tidak homogen maka dilakukan transformasi data untuk menghomogenkan data. Jika data hasil transformasi tidak berdistribusi normal atau varian tidak homogen maka dapat dilakukan uji non-parametrik yaitu uji *Kruskal-Wallis*.

Setelah dilakukan uji *One-way ANOVA* atau *Kruskal-Wallis*, perbedaan antar kelompok dapat diketahui dengan melihat signifikansi. Jika $p > 0,05$ maka H_0 diterima, artinya tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok. Jika $p < 0,05$ maka H_0 ditolak dan H_1 diterima, artinya terdapat perbedaan yang signifikan

antar kelompok. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna maka dilakukan uji *Post Hoc*.

