

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu biji chia (*Salvia hispanica*) yang diperoleh dari Tangerang, Banten.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu biji chia (*Salvia hispanica*) berbentuk bulat berwarna hitam, abu-abu berbintik putih, bebas jamur, dan tidak rusak.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama memuat semua identifikasi dari variabel yang akan diteliti langsung. Variabel utama pada penelitian ini adalah ekstrak etanol biji chia. Variabel utama kedua adalah penurunan kadar glukosa darah pada tikus putih jantan. Variabel utama ketiga adalah tikus putih jantan yang diinduksikan aloksan.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang ditetapkan dalam klasifikasi ke macam-macam variabel yaitu:

2.1. Variabel bebas. Variabel bebas adalah variabel yang dimanipulasi secara langsung untuk melihat pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol biji chia dengan variasi dosis.

2.2. Variabel tergantung. Variabel tergantung adalah variabel yang mendapatkan efek dipengaruhi oleh variabel bebas sehingga menjadi parameter penelitian. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah penurunan kadar glukosa darah tikus putih jantan pada masing-masing perlakuan.

2.3. Variabel terkontrol. Variabel terkontrol adalah variabel yang dibatasi dalam penelitian agar tidak memengaruhi variabel tergantung dan dapat diulang oleh peneliti lainnya. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah jenis kelamin, usia tikus, berat badan tikus, keadaan fisik, agen penginduksi, dan pakan yang diberikan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, biji chia adalah biji yang diambil saat seluruh bagian bunganya sudah tua, mengering, dan berwarna coklat kekuningan, dipanen pada pagi hari dalam keadaan tidak busuk dan bebas hama. Semua bagian biji diambil kecuali remahan tangkai dan bunga chia.

Kedua, serbuk biji chia adalah serbuk yang berasal dari biji chia setelah melalui proses pengeringan di bawah sinar matahari langsung terlapisi kain hitam, kemudian *digrinding* agar terbentuk serbuk halus dan diayak menggunakan pengayak nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol biji chia adalah ekstrak hasil dari penyarian biji chia dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% yang dipekatkan oleh alat *rotary vacuum evaporatory* bersuhu 50°C untuk mendapatkan ekstrak kental.

Keempat, dosis ekstrak etanol biji chia adalah dosis ekstrak yang dibuat dari biji chia dengan 3 variasi dosis yang diberikan pada tikus secara oral sesuai kelompok uji.

Kelima, tikus adalah hewan uji yang digunakan dengan nama latin *Rattus norvegicus* berjenis kelamin jantan dan berusia 2-3 bulan dengan berat 150-200 gram yang diinduksi aloksan 150 mg/kgBB agar mengalami hiperglikemia.

Keenam, glibenklamid adalah obat yang digunakan dalam menurunkan kadar glukosa darah dan juga digunakan sebagai kontrol obat dalam penelitian.

Ketujuh, metode uji aloksan adalah metode pengujian menggunakan aloksan dengan mekanisme merusak sel β pankreas tempat dimana insulin diproduksi, akibatnya terjadilah peningkatan kadar glukosa dalam darah karena produksi insulin dalam tubuh menurun.

Kedelapan, efek antihiperglikemia adalah efek yang dinyatakan sesuai kemampuan ekstrak etanol biji chia dalam memberikan aktivitas penurunan glukosa darah dari perbedaan hewan uji sebelum dan sesudah diberikan perlakuan. Kadar glukosa awal diukur (T_0) lalu diinduksi dengan aloksan secara intraperitoneal dan ditunggu 5 hari. Periksa kadar gula darah setelah diinduksi aloksan (T_1) dengan kadar glukosa ≥ 200 mg/dL menandakan hiperglikemia, kemudian diberikan sediaan larutan uji selama 14 hari dan ukur kadar glukosa darah pada hewan uji di hari ke-12 (T_2) dan hari ke-19 setelah diinduksi aloksan (T_3).

Kesembilan, dosis efektif adalah dosis terkecil yang memberikan aktivitas antihiperqlikemia yang sebanding dengan kontrol obat.

Kesepuluh, target terapi adalah penurunan kadar glukosa darah hingga mencapai kadar normal 80-100 mg/dL.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya adalah alat gelas, alat timbang, toples kaca, *aluminium foil*, oven, *moisture balance*, ayakan, pisau, penangas air, *grinder*, *Sterling Bidwell*, batang pengaduk, lumpang, alu, kertas saring, krus porselen, kapas, gelas beker, *vacuum rotary evaporator*, kandang tikus, spuit injeksi, timbangan elektronik, sonde oral, glukometer *Easy Touch*, *glucose strip test*, jarum suntik, gelas ukur, *stopwatch*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, lampu bunsen, dan kaki tiga.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya yaitu biji chia, etanol 96%, toluena jenuh air, *aquadest*, CH_3COOH encer, H_2SO_4 pekat, serbuk Mg, HCl 2N, amil alkohol, amoniak, aloksan monohidrat, kloroform, pereaksi mayer, pereaksi dragendorf, Na. CMC 0,5%, FeCl_3 , larutan garam fisiologis (NaCl 0,9%), glibenklamid, tikus putih jantan, pakan, dan minum tikus.

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi biji chia

Identifikasi biji chia digunakan untuk menegakkan keabsahan sampel terkait ciri-ciri morfologi dan makroskopik yang ada pada tanaman tersebut sesuai pustaka dan membuktikan bahan yang diambil adalah biji chia sesuai dengan nama spesiesnya agar terhindar kesalahan dalam pengumpulan bahan. Identifikasi dilakukan di Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Jawa Tengah.

2. Pengeringan biji chia

Pengeringan dilakukan di bawah sinar matahari langsung yang dilapisi kain hitam agar dapat menghindari tumbuhnya mikroorganisme, menjaga agar senyawa aktif pada biji chia tersebut tidak mengalami kerusakan, menghindari adanya kotoran yang terbawa udara saat proses pengeringan, dan menghasilkan simplisia yang tahan terhadap kerusakan agar bisa disimpan dalam waktu yang lebih lama.

3. Pembuatan serbuk biji chia

Hasil pengeringan selanjutnya dihaluskan menggunakan *grinder* untuk diperkecil ukurannya secara mekanis menjadi unit yang sangat kecil (serbuk) agar penarikan zat aktif menjadi efektif sehingga proses ekstraksi berjalan maksimal dan ayakan nomor 40 digunakan untuk mengayak agar didapati serbuk dengan derajat kehalusan relatif homogen, luas permukaan partikel semakin besar, dan kontak antara serbuk dengan pelarut meningkat sehingga proses penyarian berjalan maksimal, lalu ditimbang, dan disimpan dalam wadah bersih dan tertutup.

4. Penetapan susut pengeringan serbuk biji chia

Susut pengeringan serbuk biji chia dicek oleh *moisture balance*. Langkah yang dilakukan pada tahap ini yaitu dengan memasukkan ± 2 g serbuk biji chia ke dalam cakram yang telah ditara dengan suhu 105°C , lalu ditunggu sampai alatnya berbunyi dan muncul angkanya dalam persen. Penetapan susut pengeringan biji chia dilakukan untuk melihat batas maksimal atau rentang besar senyawa yang hilang akibat proses pengeringan. Sampel dapat dikatakan telah memenuhi syarat dalam penetapan susut pengeringan apabila kadar air dari serbuk biji chia tidak lebih dari 10%.

5. Penetapan kadar air serbuk biji chia

Penetapan kadar air pada serbuk biji chia diuji menggunakan metode azeotropi (destilasi toluena) dengan alat *Sterling Bidwell*. Prinsip kerjanya adalah pemisahan bahan kimia sesuai dengan perbedaan kecepatan penguapan (volatilitas) bahan, dimana bahan dengan titik didih rendah akan menguap terlebih dahulu lalu didinginkan kembali ke dalam bentuk cairan. Cairan yang digunakan harus dapat menarik air dari sampel seperti toluena dan xylene. Cairan pembawa yang digunakan adalah toluena karena toluena mempunyai titik didih lebih rendah daripada xylene sehingga proses penguapan lebih cepat. Selain itu bobot jenis toluena lebih besar daripada air sehingga memudahkan pembacaan suatu meniskus dan lebih akurat. Toluena dijenuhkan terlebih dahulu dengan air agar air yang terkandung dalam simplisia tidak berkurang akibat tertarik oleh toluena untuk penjuhan, sehingga hasil kadar air yang diperoleh tidak berkurang atau palsu.

Penetapan kadar air serbuk biji chia dilakukan untuk memberikan batasan minimal atau rentang besarnya kandungan air dalam serbuk biji

chia agar meminimalisir terjadinya kontaminasi. Kadar air pada serbuk simplisia yang dipersyaratkan yaitu <10%. Cara yang dilakukan dalam penetapan kadar air yaitu dengan menyiapkan toluena jenuh air terlebih dahulu. Pembuatan toluena jenuh air dilakukan dengan cara menggojog sejumlah toluena sebanyak 200 mL dalam 10 mL *aquadest* lalu dibiarkan memisah dan lapisan airnya dibuang. Serbuk biji chia ditimbang seberat 20 gram lalu dimasukkan ke dalam labu alas bulat kemudian ditambahkan toluena jenuh air kemudian dipasang rangkaian alatnya. Tahap selanjutnya dipanaskan dengan api kecil selama 30 menit. Pemanasan dihentikan apabila dalam penampung tidak terdapat lagi tetesan air yang menetes, setelah itu kadar air diukur kemudian persen kadar airnya dihitung dengan rumus sebagai berikut: yaitu toluena jenuh air.

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{Volume yang terbaca}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

6. Pembuatan ekstrak etanol biji chia

Simplisia biji chia yang sudah berbentuk serbuk dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi konvensional dengan membenamkan bahan baku tanaman obat dalam jumlah yang diperlukan dalam wadah maserasi dengan pelarut yang sesuai pada suhu kamar selama tiga hari dengan pengadukan berkala. Langkah awal yang dilakukan yaitu menimbang 1000 g serbuk biji chia kemudian dilarutkan dengan 10000 mL pelarut etanol 96%. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk dan diamkan selama 18 jam. Maserat dipisahkan dengan metode filtrasi. Proses penyarian dilakukan kembali terhadap ampas saringan dengan volume pelarut 5000 mL etanol 96%. Ekstraksi yang dilakukan menggunakan wadah botol kaca gelap dan ditempatkan pada lokasi yang terhindar dari sinar matahari agar zat aktif yang memiliki sensitivitas tinggi terhadap cahaya atau sinar UV tidak mengalami kerusakan. Semua maserat dikumpulkan, lalu diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan putaran 80 rpm hingga diperoleh ekstrak kental dan dihitung persen rendemen ekstrak dengan rumus yaitu sebagai berikut:

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{Bobot Ekstrak Kental}}{\text{Bobot Serbuk}} \times 100\%$$

7. Penetapan susut pengeringan ekstrak etanol biji chia

Penetapan susut pengeringan ekstrak diawali dengan menara botol krus lalu menimbang ekstrak ± 2 g gram, lalu masukkan ke dalam

oven pada temperatur 105°C dengan durasi 5 jam dan ditimbang. Masukkan kembali ke dalam oven dengan jeda waktu 1 jam hingga terdapat perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% dan persen kadar airnya dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{Bobot sebelum dikeringkan} - \text{bobot setelah dikeringkan}}{\text{Bobot sebelum dikeringkan}} \times 100\%$$

8. Uji bebas etanol ekstrak etanol biji chia

Ekstrak etanol biji chia dilakukan pengujian bebas etanol melalui proses esterifikasi alkohol. Sampel ekstrak etanol biji chia yang akan diuji bebas etanol ditambahkan dengan CH_3COOH encer dan H_2SO_4 pekat (1:1) pada tabung dan disumbat dengan kapas, lalu dilakukan pemanasan. Tidak adanya bau ester atau etil asetat menunjukkan bahwa ekstrak sudah tidak terdapat etanol.

9. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol biji chia

Identifikasi kandungan kimia pada ekstrak etanol biji chia dilakukan agar dapat menetapkan kebenaran dari kandungan ekstraknya. Kandungan senyawa pada ekstrak etanol biji chia yang diidentifikasi yaitu flavonoid, tanin, alkaloid, polifenol, dan saponin. Pengujian ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas setia Budi Surakarta.

9.1. Identifikasi flavonoid. Seberat 1 g sampel dilarutkan dengan 100 mL air pada tabung reaksi dan dididihkan di atas penangas air selama 15 menit, lalu disaring. Masukkan 5 mL filtrat ke dalam tabung reaksi dan 0,1 g serbuk magnesium dan 1 mL asam klorida 2N. Campuran tersebut dipanaskan dengan air di atas penangas air lagi, kemudian disaring. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan 5 mL amil alkohol. Campuran kemudian dikocok kuat-kuat dan dibiarkan terpisah. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol.

9.2. Identifikasi alkaloid. Seberat 1 g sampel diencerkan dalam 5 mL amoniak, kemudian digerus dalam mortir, lalu 20 mL kloroform ditambahkan sambil terus digerus dan disaring. Filtratnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah 5 mL asam klorida 2 N. Campuran dikocok kuat-kuat hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan asam dipisahkan, kemudian dibagi menjadi tiga bagian. Bagian pertama digunakan sebagai blanko; bagian kedua ditetesi 2-3 tetes pereaksi Mayer, endapan putih menunjukkan adanya alkaloid. Bagian ketiga

ditetesi 2-3 tetes reagen Dragendorff, munculnya warna coklat-orange menunjukkan adanya alkaloid.

9.3. Identifikasi tanin. Seberat 1 g sampel dilarutkan dengan 100 mL air pada tabung reaksi dan dididihkan di atas penangas air selama beberapa menit, kemudian disaring. Filtrat ditetesi 2-3 tetes larutan FeCl_3 . Terbentuknya warna hijau-hitam menunjukkan adanya tanin.

9.4. Identifikasi saponin. Seberat 0,5 g sampel ditambahkan 10 mL air panas, kemudian disaring. Filtrat dalam tabung reaksi yang telah dingin kemudian dikocok kuat-kuat selama 30 detik. Terbentuknya buih padat tidak kurang dari 10 detik setinggi 1 cm sampai 10 cm menunjukkan adanya saponin, dan penambahan 1 tetes asam klorida 2N tidak hilang.

10. Perhitungan dosis

10.1. Dosis aloksan. Dosis aloksan yang diberikan secara injeksi intraperitoneal adalah 150 mg/kgBB tikus.

10.2. Dosis glibenklamid. Dosis glibenklamid pada manusia dewasa adalah 5 mg/70 kgBB manusia. Bila dikonversi dosis glibenklamid menjadi 5 mg x 0,018 = $\frac{0,09 \text{ mg}}{200 \text{ g}}$ x 1000 g = 0,45 mg/kgBB tikus .

10.3. Dosis ekstrak etanol biji chia. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa dosis efektif ekstrak etanol daun *Salvia officinalis* L. adalah 100 mg/kgBB tikus sehingga dosis yang digunakan adalah 100 mg/kgBB tikus dan dibuat variasi dosis $\frac{1}{2}$ dari dosis efektif, 1 dosis efektif, dan 2 kali dosis efektif setara dengan 50 mg/kgBB tikus, 100 mg/kgBB tikus, dan 200 mg/kgBB tikus .

11. Pembuatan sediaan larutan uji

11.1. Larutan aloksan 2%. Aloksan monohidrat ditimbang sebanyak 1000 mg lalu dilarutkan menggunakan NaCl 0,9% 50 mL.

11.2. Larutan suspensi Na. CMC 0,5%. Larutan Na. CMC dengan konsentrasi 0,5% dibuat dengan melarutkan sebanyak 2500 mg Na. CMC dalam *aquadest* hangat memakai lumpang panas sedikit demi sedikit lalu diaduk hingga volume 500 mL.

11.3. Larutan suspensi glibenklamid 0,005%. Glibenklamid ditimbang sebanyak 5 mg dan dimasukkan ke dalam mortir hangat kemudian ditambahkan 100 mL Na. CMC 0,5% hangat sedikit demi sedikit hingga homogen.

11.4. Larutan suspensi ekstrak etanol biji chia 2%. Ekstrak etanol biji chia ditimbang 2000 mg lalu dimasukkan ke dalam mortir

hangat kemudian ditambahkan 100 mL Na. CMC 0,5% hangat sedikit demi sedikit. Lalu diaduk hingga homogen.

12. Pengelompokan dan penyiapan hewan uji

Populasi hewan uji yang digunakan adalah tikus jantan putih (*Mus musculus*) berusia 2-3 bulan, berat tikus 150-200 gram, tidak ditemukan kelainan anatomi, dan dalam kondisi sehat. Tikus jantan dipilih daripada tikus betina karena fluktuasi hormonal yang dapat menyebabkan variabel sifat data betina. Tiap hewan uji diadaptasikan dengan kondisi di laboratorium yang standar, suhu standar kandang pada suhu $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap. Sebelum digunakan, hewan uji dipuasakan terlebih dahulu selama 16 jam.

Pengelompokan tikus secara acak dibagi menjadi 5 kelompok. Kelompok I diberikan Na. CMC 0,5% sebagai kontrol hiperglikemia. Kelompok II diberikan glibenklamid 0,45 mg/kgBB sebagai kontrol obat. Kelompok III diberikan larutan ekstrak etanol biji chia 50 mg/kgBB. Kelompok IV diberikan larutan ekstrak etanol biji chia 100 mg/kgBB. Kelompok V diberikan larutan ekstrak etanol biji chia 200 mg/kgBB.

13. Perlakuan hewan uji

Sebelum menerima aloksan, tikus berpuasa selama 16 jam dengan tetap diberikan air minum. Lalu tikus ditimbang berat badannya dan diambil darah awal untuk menentukan kadar glukosa darah awal (T_0). Tikus diinduksi larutan aloksan monohidrat 150 mg/kgBB yang telah dilarutkan dalam NaCl 0,9% secara intraperitoneal dan diamkan selama 5 hari lalu ditimbang berat badannya dan ukur kadar gula darah pertama (T_1) hingga diperoleh kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dL (kondisi hiperglikemia) dan di hari yang sama tikus diberi perlakuan.

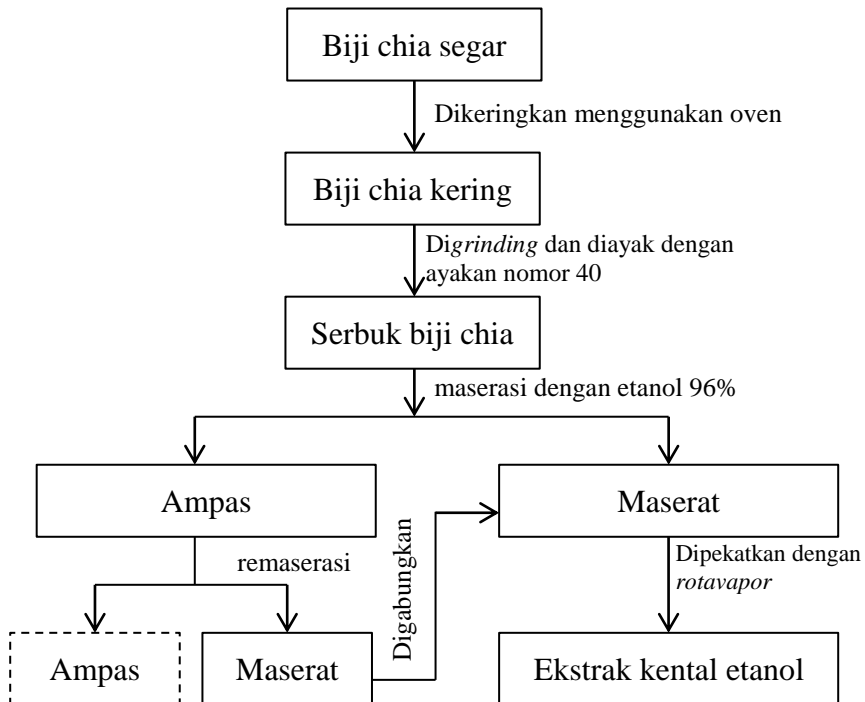
Kelompok I yaitu kelompok kontrol hiperglikemia diberi perlakuan suspensi Na. CMC 0,5% secara oral. Kelompok II yaitu kelompok kontrol obat diberi perlakuan glibenklamid 0,45 mg/kgBB secara oral. Kelompok III yaitu kelompok uji 1 diberi perlakuan ekstrak etanol biji chia 50 mg/kgBB secara oral. Kelompok IV yaitu kelompok uji 2 diberi perlakuan ekstrak etanol biji chia 100 mg/kgBB secara oral. Kelompok V yaitu kelompok uji 3 diberi perlakuan ekstrak etanol biji chia 200 mg/kgBB secara oral.

Pemberian perlakuan pada masing-masing tikus dilakukan selama 14 hari, pada hari ke-12 ditimbang berat badannya dan diambil

darahnya untuk pengukuran kadar glukosa darah kedua (T_2) dan pada hari ke-19 ditimbang berat badannya dan diambil darahnya untuk pengukuran kadar glukosa darah ketiga (T_3).

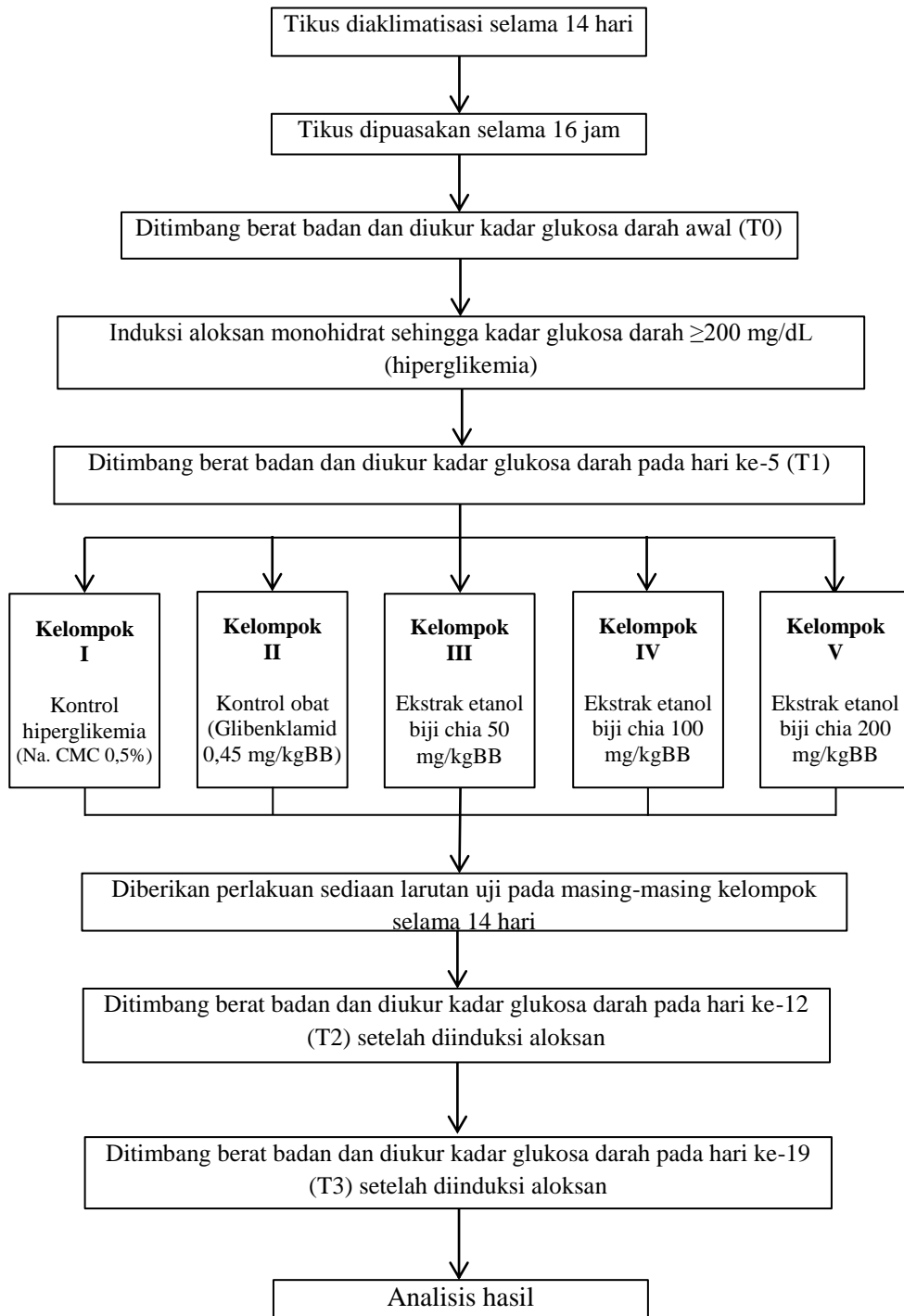
E. Skema Penelitian

1. Skema pembuatan ekstrak etanol biji chia



Gambar 4. Skema pembuatan ekstrak etanol biji chia

2. Skema pengujian aktivitas antihiperqlikemia pada tikus



Gambar 5. Skema pengujian aktivitas antihiperqlikemia pada tikus

F. Analisis Hasil

Analisis data bertujuan mengetahui ada tidaknya perbedaan perlakuan yang disebabkan oleh perbedaan dosis. Tahapan awal dilakukan uji *Shapiro-Wilk* untuk menentukan data terdistribusi normal atau tidak. Bila $p > 0,05$ maka data terdistribusi normal dan bila $p < 0,05$ maka data dianggap abnormal. Uji selanjutnya adalah uji homogenitas untuk mengetahui homogenitas variansi. Bila $p > 0,05$ maka data bervariasi homogen dan bila $p < 0,05$ maka data dianggap tidak bervariasi homogen. Hasil data yang telah terdistribusi normal dan bervariasi homogen diteruskan dengan uji parametrik (ANOVA), sedangkan metode non parametrik untuk data dengan distribusi abnormal dan tidak bervariasi homogen.

Data yang terdistribusi normal dan bervariasi homogen akan dilanjutkan dengan *One-Way ANOVA* untuk melihat apakah terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Bila $p > 0,05$ maka tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok, dan jika $p < 0,05$ maka ada perbedaan yang signifikan antar kelompok. Uji *Post Hoc Tukey HSD* juga digunakan untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang mempunyai perbedaan tidak terlalu signifikan dengan memperhatikan kolom subset.

Data yang terdistribusi abnormal dan tidak bervariasi homogen akan dianalisis menggunakan uji *Kruskal Wallis* untuk mengidentifikasi perbedaan antara berbagai kelompok. Uji *Mann-Whitney* kemudian digunakan untuk memastikan apakah perbedaan antar kelompok signifikan atau tidak.