

BAB III METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Untuk mengetahui dosis dan efek fraksi biji kopi robusta maka pada penelitian ini menggunakan pra-penelitian sebagai dasar untuk mengetahui fraksi mana yang efektif dalam menurunkan kadar glukosa darah hewan uji dengan menggunakan 5 kelompok uji yang setiap kelompoknya terdiri dari 5 ekor mencit yang diinduksi STZ-Na yang terdiri dari kontrol positif, kontrol negatif, kompok uji fraksi air, fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat. Selanjutnya setelah diketahui fraksi mana yang efektif dalam menurunkan kadar glukosa darah dilakukan penelitian dengan menggunakan hewan uji tikus putih jantan yang diinduksi STZ-NA. Hiperglikemik muncul disebabkan karena resisten pada insulin digunakan 7 kelompok tikus putih jantan yang terdiri dari 5 ekor tikus di setiap kelompok yang mencangkup dalam kontrol normal; kontrol positif; kontrol negatif; kelompok ekstrak biji kopi robusta; kelompok fraksi etil asetat dosis 13,3mg/kg BB ; kelompok fraksi etil asetat 26,6mg/kg BB; kelompok fraksi etil asetat 53,2mg/kg BB.

B. Subjek dan Lokasi Penelitian

Subyek penelitian ini adalah mencit dan tikus putih jantan yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta, mencit yang digunakan berumur 6-8 minggu dengan berat 18-20 g dan juga tikus yang digunakan berumur 2 bulan dengan kriteria berat badan 150-200 g, mempunyai kondisi yang sehat dan memiliki aktivitas yang normal. Penelitian dilakukan di Universitas Setia Budi Surakarta dan pembuatan serta pembacaan preparat histopatologi di Laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan UGM.

C. Populasi dan Sampel

Populasi merupakan semua objek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi penelitian ini adalah biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang diperoleh dari daerah Makale, Sulawesi Selatan.

Sampel merupakan Sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan adalah biji kopi robusta. Kopi robusta yang digunakan di dalam penelitian ini adalah buah kopi robusta yang dipanen ketika berusia 8-10 bulan mulai dari kuncup

sampai terbentuk buah. Buah kopi yang digunakan merupakan buah kopi yang masih memiliki kulit buah yang hijau dan tidak memiliki cacat pada kulit buahnya.

D. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah dosis fraksi biji kopi robusta.

Variabel kedua dari penelitian ini adalah aktivitas antihiperlikemik pada hewan uji diabetes.

Variabel ketiga dari penelitian ini adalah meregenerasi sel beta pankreas.

Variabel utama dibagi menjadi tiga variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel kendali.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis fraksi biji kopi robusta.

Variabel tergantung yaitu pokok persoalan yang merupakan kriteria penelitian, variabel tergantung pada penelitian ini adalah aktivitas antihiperlikemik, dan hasil regenerasi sel beta pankreas.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung selain dari variabel bebas, yaitu kondisi pengukuran atau penelitian, laboratorium dan kondisi dari hewan uji yang dapat meliputi berat badan, usia, lingkungan dan tempat termasuk pada alat-alat, bahan, induksi STZ-NA.

3. Definisi operasional variabel

Pertama, biji kopi robusta adalah biji dari buah kopi yang diperoleh dari Makale, Sulawesi Selatan.

Kedua, serbuk biji kopi robusta adalah serbuk yang diperoleh dari biji kopi robusta yang telah dikeringkan, digiling dan diayak dengan ayakan nomor mesh 40.

Ketiga, ekstrak etanol biji kopi robusta adalah ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi serbuk biji kopi robusta dengan pelarut etanol 70 %, selanjutnya dipekatkan menggunakan vakum evaporator hingga diperoleh ekstrak pekat biji kopi robusta.

Keempat, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air yang diambil dari fraksinasi ekstrak kental biji kopi robusta dengan metode

ekstraksi cair-cair dengan menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan air.

Kelima, hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit yang berumur 6-8 minggu dengan berat 18-20 g yang diinduksi STZ-NA, dan tikus jantan yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan sekitar 150-200g yang mengalami hiperglikemik akibat induksi STZ-NA.

Keenam, induksi antihiperglikemik dalam penelitian ini adalah STZ yang merupakan induksi agen diabetogenik yang dapat merusak sel beta pankreas secara signifikan, NA sebagai penghambat kerusakan keseluruhan pada sel pankreas.

Ketujuh, aktivitas antihiperglikemik adalah menurunkan kadar glukosa darah tikus putih jantan yang ditentukan dengan menggunakan alat glucometer dinyatakan dalam (mg/dL).

Kedelapan, aktivitas regenerasi sel beta pankreas adalah adanya perbaikan sel beta pankreas yang teramati pada preparat histopatologi setelah perbandingan terhadap fraksi aktif dengan preparat kontrol negatif.

Kesembilan, tikus hiperglikemik adalah tikus yang dibuat hiperglikemik dengan penginduksi streptozotzin dengan dosis 40 mg/kg BB tikus dan nikotinamid 110mg/kg BB secara intraperitoneal. Hewan model dianggap hiperglikemia apabila kadar gula darah puasa \geq 200 mg/dL,

E. Bahan, Alat, dan Hewan Uji

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kopi robusta, glibenklamid sebagai kontrol positif, *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) Na 1%, etanol absolut, amoniak, kloroform, asam klorida, alkohol, natrium hidroksida, FeCl₃ 1%, formalin, reagen Lieberman burchard, pelarut xylen, reagen mayer.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan maserasi yang terdiri dari botol maserasi, beker glass, kalin flannel, ayakan mesh 40, alluminium foil, corong geles, oven, kolorimeter, labu takar 50ml, pipet hematokrit, batang pengaduk, alat bedah, lancet, alat timbang *Sterling-Bidwell*, *moisture-balance*, mikroskop Olympus CX-21, mikrotom, *inverted microscope*, *evaporator*, pinset, pipet tetes,

kertas timbang, kertas saring, vial, kendang tikus, cutter, spuit, jarum suntik dan alat gelas, piknometer

3. Hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antihiperqlikemik adalah mencit yang berumur 6-8 minggu dengan berat 18-20 g dengan jumlah mencit yang digunakan 12 ekor dibagi dalam 4 kelompok untuk digunakan dalam pengecekan dosis aktif ekstrak etanol biji kopi robusta, kemudiann 30 ekor mencit dibagi dalam 5 kelompok yang terdiri dari 5 ekor mencit perkelompok. Hewan uji yang digunakan untuk menganalisa dosis fraksi aktif dan uji histopatologi pankreas adalah tikus putih jantan berumur 2-3 bulan dengan berat berkisar 150-250 g. Pada hewan uji tikus digunakan sebanyak 35 ekor yang terdiri dari 7 kelompok setiap kelompok masing-masing berjumlah 5 ekor tikus.

F. Jalannya Penelitian

1. Etikal klirens

Ethical Clearance (EC) atau kelayakan etik adalah keterangan tertulis yang diberikan oleh Komisi Etik Penelitian untuk riset yang melibatkan makhluk hidup yang menyatakan bahwa suatu proposal riset layak dilaksanakan setelah memenuhi persyaratan tertentu. Persetujuan dari Komisi Ethical Clearance dalam suatu penelitian sangat diperlukan dalam publikasi jurnal ilmiah nasional ataupun international.

2. Determinasi tanaman

Tahap pertama untuk melihat kealian tanaman yang dilakukan dalam penelitian ini adalah determinasi tanaman kopi robusta (*Coffea canephora*). Tujuannya untuk mengungkap kebenaran dengan membandingkan ciri morfologi biji kopi hijau Robusta yang terdeteksi di B2P2TOOT Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

3. Pengambilan dan pembuatan serbuk biji kopi robusta

Biji kopi hijau robusta diambil secara acak dengan memilih biji kopi tanaman bebas hama, sampel masih dalam keadaan segar yang diperoleh dari daerah makale, Sulawesi selatan. Sampel biji kopi robusta yang diperoleh disortasi basah lalu dihilangkan kulit arinya lalu dicuci bersih menggunakan air mengalir dan ditiriskan. Kemudian dikeringan di bawah matahari langsung, kemudian dilakukan sortasi kering kemudian dihaluskan lalu serbuk diayak dengan ayakan nomor 40.

4. Penetapan susut pengeringan serbuk biji kopi robusta

Serbuk biji kopi robusta ditimbang secara seksama sebanyak 1g sampai 2g dan dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal tertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Serbuk biji kopi robusta dimasukkan ke dalam cruss kemudian dimasukkan ke dalam oven. Dibuka tutupnya, keringkan pada suhu 105°C hingga botol tetap. Sebelum setiap pengeringan, biarkan botol dalam keadaan tertutup mendingin dalam eksikator hingga suhu kamar, kemudian dilakukan kembali hingga diperoleh bobot tetap. Dibuat dalam 3 kali replikasi (DepKes, 2000)

5. Pembuatan ekstrak etanol biji kopi robusta

Maserasi merupakan proses ekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali penggojokkan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Prinsip metode ini adalah pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan kontinyu (terus-menerus). Maserasi sendiri memiliki keuntungan untuk senyawa yang tidak tahan terhadap pemanasan. Maserasi dapat dilakukan dengan cara memasukan satu bagian serbuk kering simplisia atau 600 g ke dalam maserator, kemudian ditambah 10 bagian pelarut etanol 70% sebanyak 6000 ml. Direndam selama 6jam pertama sambil berkali-kali diaduk, kemudian didiamkan selama 18jam maserat difiltrasi. Dilakukan pengulangan proses penyarian sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama atau sebanyak 3000ml. Maserat yang terkumpul kemudian diuapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental (Kemenkes, 2013).

6. Penetapan kadar abu total

Simplisia yang telah dihaluskan ditimbang saksama 2 sampai 3 g dan masukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijar dan ditara, dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, didinginkan dan ditimbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, ditambahkan air panas, diaduk, disaring melalui kertas saring bebas abu. Dipijarkan kertas saring beserta sisa penyaringan dalam krus yang sama. Dimasukkan filtrat ke dalam krus, uapkan dan pijarkan hingga bobot tetap. Dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut :

$$\frac{\text{berat abu total (g)} - \text{berat krus kosong}}{\text{berat sampel awal (g)}} \times 100\%$$

7. Penetapan kadar abu tidak larut asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total dididihkan dengan 25ml asam klorida encer LP selama 5 menit. dikumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, disaring melalui kertas bebas abu, dicuci dengan air panas, dipijarkan dalam krus hingga bobot tetap. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap berat bahan uji. Dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut :

$$= \frac{\text{berat abu total (g)} - \text{beratkrus kosong (g)}}{\text{berat sampel awal}} \times 100\%$$

8. Penetapan kadar air ekstrak biji kopi robusta

Penetapan kadar air biji kopi robusta dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Caranya dengan menimbang serbuk biji kopi sebanyak 20 g dimasukkan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut toluen jenuh air sebanyak 200 ml (Toluen jenuh air dibuat dengan cara mengocok 200 ml toluen dengan 20 ml air, biarkan memisah dan buang lapisan air) sampai serbuk terendam, kemudian memasang alat *Sterling-Bidwell*, tahap selanjutnya dipanaskan dengan api kecil. Pemanas dihentikan bila air pada penampung tidak menetes lagi, kemudian diukur kadar airnya dengan melihat volume pada skala alat tersebut dan dihitung persen kadar air. Dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut :

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{volum terbaca}}{\text{berat bahan}} \times 100\%$$

9. Fraksinasi ekstrak biji kopi robusta

Ekstrak etanol biji kopi robusta diambil sebanyak 20 g yang diperoleh kemudian dilarutkan dengan sedikit air panas, kemudian dipartisi dengan 100 ml dan pelarut n-heksan 100 ml ke dalam corong pisah dan dilakukan sebanyak 3 kali. Fraksi n-heksan merupakan filtrat yang terletak di atas dan filtrat air yang terletak pada bagian bawah. Filtrat n-heksan dipisahkan dari fraksi air ditampung dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu penangas 50°C.

Fraksi air sisah dari fraksi n-heksan kemudian difraksi Kembali dengan pelarut etil asetat 100 ml dengan menggunakan corong pisah proses ini diulang sebanyak 3 kali. Fraksi etil merupakan filtrat yang terletak di atas dan filtrak air yang berada di bagian bawah, fraksi etil dipisahkan dari fraksi air kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C. filtrat sisah dari fraksinasi dengan etil asetat adalah fraksi air, yang kemudian dikentalkan dengan penangas air sampai kental.

10. Identifikasi kualitatif ekstrak biji kopi robusta

Uji identifikasi dilakukan terhadap ekstrak etanol biji kopi robusta meliputi identifikasi senyawa senyawa yang terkandung di dalamnya yaitu alkaloid, kafein, flavonoid dan saponin, tanin.

10.1. Identifikasi saponin. Sepuluh tetes ekstrak biji kopi robusta dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambah air panas secukupnya, dikocok selama 15 menit dan 2 tetes HCL 2N bila berbentuk buih permanen selama kurang lebih 10 menit maka memberikan identifikasi adanya saponin.

10.2. Identifikasi tanin. Ekstrak dilarutkan dalam etanol kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan pereaksi FeCl_3 dalam larutan etanol, hasil positif ditunjukkan dengan adanya warna hijau, merah ungu, biru, atau hitam.

10.3. Identifikasi alkaloid. Ekstrak sebanyak 2 ml kemudian diuapkan di atas cawan porselin hingga dapat residu, residu kemudian dilarutkan 5 ml HCl 2N. Larutan yang didapat dimasukkan ke dalam tiga tabung reaksi masing-masing sebanyak 5-10 tetes. Tabung pertama ditambahkan pereaksi Dragendorff sebanyak 3 tetes, tabung kedua ditambahkan pereaksi Mayer sebanyak 3 tetes, dan tabung ketiga ditambahkan pereaksi Wagner 3 tetes. Terbentuk endapan jingga pada tabung pertama, endapan putih hingga kekuningan pada tabung kedua, dan endapan cokelat pada tabung ketiga menunjukkan adanya alkaloid.

10.4. Identifikasi flavanoid. Pada identifikasi flavonoid dilakukan dua uji yaitu tabung. Pada uji tabung ekstrak kental 0,5 g dimasukkan ke dalam cawan penguap kemudian dilarutkan dengan etanol. Filtrat dituang ke dalam tabung reaksi yang berisi butiran logam Mg dan HCl pekat kemudian amil alkohol dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian kocok kuat dan dibiarkan hingga memisah. Bila terdapat flavonoid maka akan terbentuk warnah merah atau coklat pada lapisan amyl alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Herborne, 1987).

10.5. Identifikasi kafein. Ekstrak dilakukan uji kafein dengan menggunakan KLT dengan fase diam silica GF 254 yang ditotolkan kafein standar dengan senyawa uji dari ekstrak dan fraksi dengan menggunakan fase gerak kloroform : etanol (99:1) dan kemudian dapat dilihat pada sinar uv 254 nm maka kafein standar akan berpendar biru dengan nilai R_f 0.237 (Studi *et al.*, 2015).

Identifikasi kadar kafein pada biji kopi robusta dengan spektrofotometer UV-Vis. Ekstrak biji kopi robusta diambil 1g

kemudian dilarutkan dalam 150 mL akuades padnas dan kemudian disaring dan diambil filtrat dan dimasukkan ke dalam corong pisah kemudian ditambahkan 1,5 g CaCO_3 kemudian diekstraksi dengan penambahan klorofom 25 mL sebanyak 4 kali pengulangan.

Hasil ekstrak kemudian diuapkan menggunakan *rotari evaporator* sampai klorofom menguap dan ekstrak kafein yang tersisa diencerkan menggunakan akuades sebanyak 10 kali. Larutan kemudian diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Larutan diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

Panjang gelombang maksimum larutan standarisasi kafein dengan larutan yang memiliki konsentrasi 4 ppm dengan panjang nilai absorbansi panjang gelombang dalam rentan 250-300 nm, setelah itu di buat kurva kalibrasi larutan standar kafein dengan konsentrasi sebesar 4; 6; 8; 10; 12 mg/L kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum larutan standar kafein.

11. Pembuatan larutan Streptozotoksin-Nikotinamid

Dosis STZ yang digunakan untuk menghasilkan kerusakan sel beta pankreas dalam waktu 3 hari adalah dosis 40 mg secara intraperitoneal. STZ diberikan untuk menginduksi DM setelah dilarutkan 100 mmol/L sitrat dengan pH 4,5 yang merupakan pH stabil untuk STZ (Szkudelski, 2012).

Dosis NA yang digunakan untuk melindungi pankreas jika dosis STZ yang diberikan sebesar 40 mg untuk interval waktu kerusakan pankreas terjadi selama 3 hari adalah sebesar 110 mg. untuk penggunaannya NA dilarutkan dahulu dalam normal salin (NaCl 0,9%) yang mirip dengan cairan tubuh dan diberikan secara intraperitoneal 15 menit sebelum pemberian STZ (Szkudelski, 2012).

12. Pembuatan sediaan CMC

Sebanyak 1 g CMC dimasukkan ke dalam mortar yang berisi 30ml aqua destilate hangat, didiamkan selama 15 menit hingga didapatkan masa yang transparan, lalu digerus ad homogen, selanjutnya diencerkan dengan aqua destilate dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml ditambah aqua destilata ad tanda batas.

13. Penentuan dosis

13. Dosis glibenklamid. Dosis glibenklamid diambil berdasarkan penggunaannya pada manusia yaitu 5 mg/70 kg BB manusia. Faktor konversi manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus

dengan berat badan 200 g adalah 0,018, sehingga dosis glibenklamid adalah 0,09 mg/200g BB tikus atau 0,45 mg/kg BB tikus dan dosis glibenklamid pada mencit 0,0126 mg/20g BB mencit atau 0,64 mg/kg BB mencit.

13.2 Dosis ekstrak biji kopi robusta. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Factor *et al* (2017) biji kopi robusta yang telah disangrai dapat menurunkan kadar glukosa darah dengan dosis pemberian 93 mg/kg BB tikus.

13.3 Penentuan dosis fraksi. Penentuan dosis fraksi yaitu dari persen rendemen fraksi dibagi dengan total persen rendemen fraksi dikalikan dengan dosis efektif ekstrak etanol biji kopi robusta.

14. Penyiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit dan tikus yang terbagi dalam 12 ekor mencit yang digunakan untuk menentukan dosis ekstrak yang efektif dalam menurunkan kadar glukosa darah setelah didapatnya dosis ekstrak etanol yang efektif selanjutnya menggunakan 30 ekor mencit yang digunakan sebagai penelitian untuk menentukan fraksi efektif dalam menurunkan kadar glukosa darah serta 30 ekor mencit putih jantan yang digunakan dalam penelitian untuk mengetahui dosis efektif dari fraksi biji kopi robusta. Mencit yang digunakan dalam penelitian terhadap ekstrak etanol biji kopi robusta dibagi dalam 4 kelompok yang masing-masing terdiri dari 3 ekor mencit diinduksi dengan mencit diinduksi STZ- NA selama 3 hari selanjutnya diukur kadar gula darah mencit (T0) bila mencit mengalami kadar gula darah yang tinggi >200 mg/dL selanjutnya hewan uji yang telah mengalami hiperglikemik diberikan larutan uji secara oral selama 7 hari dan diukur kembali kadar gula darah mencit (T1) dan pada hari ke 14 (T2) dan pada hari ke 21 (T3) sebelum dilakukan pengecekan gula darah hewan uji dipuasakan terlebih dahulu selama 8 jam. Tabel penelitian dapat dilihat tabel 1:

Tabel 1. Penelitian ekstrak etanol biji kopi robusta pada mencit

Kelompok	Jumlah mencit (ekor)	Perlakuan
I (kontrol negatif)	5	CMC Na 1% + Mencit diinduksi STZ + Na
II (Kontrol positif)	5	Mencit diinduksi STZ + Na + glibenklamid
III (ekstrak 200 mg/kg BB)	5	Mencit diinduksi STZ + Na + ekstrak etanol 200 mg/kg BB mencit
III (ekstrak 400 mg/kg BB)	5	Mencit diinduksi STZ + Na + ekstrak etanol 400 mg/kg BB mencit

Mencit yang digunakan selanjutnya untuk melihat fraksi efektif dalam penelitian dibagi dalam 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit diinduksi dengan mencit diinduksi STZ- NA selama 3hari selanjutnya diukur kadar gula darah mencit (T0) bila mencit mengalami kadar gula darah yang tinggi >200 mg/dL selanjutnya hewan uji yang telah mengalami hiperglikemik diberikan larutan uji secara oral selama 7 hari dan diukur kembali kadar gula darah mencit (T1) dan pada hari ke 14 (T2) dan pada hari ke 21 (T3) sebelum di lakukan pengecekan gula darah hewan uji dipuaskan terlebih dahulu selama 8 jam. Tabel penelitian dapat dilihat tabel 2:

Tabel 2. Penelitian ekstrak dan fraksi pada mencit

Kelompok	Jumlah mencit (ekor)	Perlakuan
I (kontrol negatif)	5	CMC Na 1% + Mencit diinduksi STZ + Na
II (Kontrol positif)	5	Mencit diinduksi STZ + Na + glibenklamid
III (uji ekstrak)	5	Mencit diinduksi STZ + Na + ekstrak 400mg/kg BB mencit
III (uji fraksi air)	5	Mencit diinduksi STZ + Na + fraksi air 216 mg/kg BB mencit
IV (uji fraksi n-heksan)	5	Mencit diinduksi STZ + Na + fraksi n-heksan 42 mg/kg BB mencit
V (uji fraksi etil asetat)	5	Mencit diinduksi STZ + Na + fraksi etil asetat 38mg/kg BB mencit

Setelah didapatkan fraksi yang efektif dalam penurunan kadar glukosa darah selanjutnya mencari dosis fraksi efektif dengan menggunakan 3 varian dosis yang dapat menurunkan kadar glukosa darah pada tikus yang diindukk STZ-NA. hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan sebanyak 35 ekor yang dibagi dalam 7 kelompok uji setiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Kelompok 1 menjadi kelompok normal tidak diberikan perlakuan apapun, pada kelompok II-VII diberikan induksi STZ-NA. setelah tikus diinduksi dengan STZ-NA selama 3 hari selanjutnya diukur kadar gula darah tikus diukur (T0) bila tikus mengalami kadar gula darah yang tinggi >200 mg/dL dinyatakan diabetes selanjutnya hewan uji yang telah mengalami hiperglikemik diberikan larutan uji secara oral selama 7 hari dan diukur kembali kadar gula darah tikus (T1) dan pada hari ke 14 (T2) dan pada hari ke 21 (T3) sebelum di lakukan pengecekan gula darah hewan uji dipuaskan terlebih dahulu selama 8 jam dan

selanjutnya tikus pada hari ke 21 dikorbankan. Dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Pengujian variasi dosis fraksi pada tikus

Kelompok	Jumlah tikus (ekor)	Perlakuan
I (Kontrol normal)	5	CMC Na 1%
II (Kontrol negatif)	5	CMC Na 1% + Tikus diinduksi STZ + Na
III (Kontrol positif)	5	Tikus diinduksi STZ + Na + glibenklamid
IV (ekstrak biji kopi robusta)	5	Tikus diinduksi STZ + Na + ekstrak biji kopi robusta 280 mg/kg BB tikus
V (Uji fraksi aktif dosis 1)	5	Tikus diinduksi STZ + Na + Dosis fraksi etil asetat 13,3 mg/kg BB tikus
VI (Uji fraksi aktif dosis 2)	5	Tikus diinduksi STZ + Na + Dosis fraksi etil asetat 26,6 mg/kg BB tikus
VII (Uji fraksi aktif dosis 3)	5	Tikus diinduksi STZ + Na + Dosis fraksi etil asetat dosis 53,2 mg/kg BB tikus

15. Pengukuran kadar glukosa darah hewan coba

Tikus yang digunakan diadaptasi terlebih dahulu selama 1 minggu, dilakukan pengujian kadar glukosa darah sebelum diberikan apapun (T0) diberikan diinduksi pada hari ke-3 diukur kadar gula darah hewan uji (T1) pada kondisi ini dipastikan hewan uji mengalami hiperglikemik yang ditandai dengan kadar glukosa darah di atas 200 mg/dL. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan kembali setelah pemberian bahan uji pada hari ke 7 (T2), hari ke 14 (T3), dan hari ke 21 (T4).

Sebelum pengambilan darah pada ekor hewan uji, dibersihkan terlebih dahulu dengan menggunakan alkohol 70 %. Selanjutnya cuplikan darah yang diambil dari vena lateralis ekor dalam jumlah sangat sedikit yang berkisar hanya 1 μ l disentuh dalam test strip, kemudian alat tersebut akan segera mengukur kadar glukosa darah setelah strip terisi oleh darah setelah 10 detik maka akan tampak hasil pembacaan konsentrasi glukosa darah pada glucometer. Nilai glucometer merupakan nilai konsentrasi glukosa darah dengan satuan mg/dL.

Pengukuran kadar glukosa darah dengan glucometer menggunakan metode elektrokimia, yaitu berdasarkan potensi daya listrik yang disebabkan oleh reaksi glukosa dengan bahan pereaksi

glukosa pada elektroda strip. Strip uji mengandung bahan kimia glucose oksidase 20,1 % b/b, heksasianoferat (III) 32,0 % b/b, dan bahan-bahan tidak reaktif yaitu 38,8 % b/b. Prinsip kerja glukometer sampel akan diserap masuk ke dalam ujung strip berdasarkan reaksi kapiler, apabila darah mengisi ruangan reaksi di ujung strip, kalium ferisianida diuraikan dan glukosa sampel dioksidasi oleh enzim glukosa oksidase yang menyebabkan penurunan bilangan oksidasi kalium heksasianoferat (III) menjadi heksasianoferat (II) (Sholikhah *et al.*, 2021).

16. Uji histopatologi

Hewan coba dikorbankan dengan anestesi dengan kloroform, kemudian seluruh bagian hati dan pankreas diambil. Sampel pada jaringan pankreas yang telah difiksasi dalam formalin 10% dan paraffin digunakan untuk pengujian mikroskopis berdasarkan prosedur laboratorium.

16.1 Pengambilan organ. Hewan uji dikorbankan dengan anestesi, kemudian seluruh bagian pankreas diambil. Lalu jaringan pankreas dibuat preparat histopatologi.

16.2 Fraksi jaringan. Rendemen organ dengan menggunakan formalin 10%

16.3 Dehidrasi jaringan. Rendemen jaringan yang sudah difiksasi ke dalam larutan alkohol secara bertahap.

16.4 Clearing jaringan. Proses clearing atau penjernihan bertujuan untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan dikarenakan alkohol dan paraffin tidak dapat menyatu, sehingga larutan yang akan dimasukan ke dalam jaringan dapat berikatan dengan paraffin. Pada tahap ini menggunakan larutan xylene, untuk menghilangkan alkohol (dealkoholisasi). Dimulai dengan memasukkan jaringan pankreas ke dalam xylene I selama 30 menit, kemudian xylene II selama 90 menit dan selanjutnya xylene III selama 90 menit.

16.5 Pembuatan blok paraffin. Agar jaringan mudah dipotong maka jaringan harus dipadatkan menggunakan paraffin dengan cara membenamkannya pada paraffin selama 1 jam. Setelah pembenaman, proses dilanjutkan dengan pengecoran (bloking) yaitu dengan cara menuangkan sedikit demi sedikit paraffin cair dibagian pinggir agar tidak bocor, kemudian letakkan jaringan sesuai dengan keinginan saat jaringan diiris (potong jaringan yang ingin diamati di bawah mikroskop diletakan didasar agar permukaan rata) setelah itu

tuangkan paraffin secukupnya agar menutupi jaringan seluruhnya. Hindarkan terbentuknya gelembung air dan didiamkan selama 12 jam.

16.6 Pengirisan jaringan. Letakan pisau pada mikrotom dengan sudut tertentu kemudian rekatkan blok paraffin yang akan dipotong pada holder dengan menggunakan spatula atau scalpel blade yang panas. Letakan holder berikut pada preparat pada tempatnya dimikrotom dan atur ketebalan irisan 5-10 μm . Atur jarak preparat yang dipegang holder ke arah pisau sedekat mungkin, Gerakan notor pada mikrotom secara ritmis, bauang paraffin awal yang tidak ada ajarungannya, setelah potongan mengenai jaringan potong blok preparat secara hati-hati, pindahkan peralatan dengan sengkeli ke atas air di dalam waterbath yang telah diatur suhunya 55°C, tujuannya agar pita paraffin terkembang dengan baik, tempelkan pita paraffin ke kaca objektif yang telah terlebih dahulu dioleskan dengan albumin, dengan cara mencelupkan kaca objek tegak lurus ke dalam waterbath, perkirakan agar potongan jaringan yang akan diamati menempel ditengah kaca objek. Simpan kaca objek yang berisi potongan paraffin dan jaringan selama 12 jam.

16.7 Pewarnaan jaringan. Pewarnaan jaringan dilakukan agar jaringan mudah dibaca di bawah mikroskop. Pengujian histopatologi dilakukan dengan pewarnaan HE.

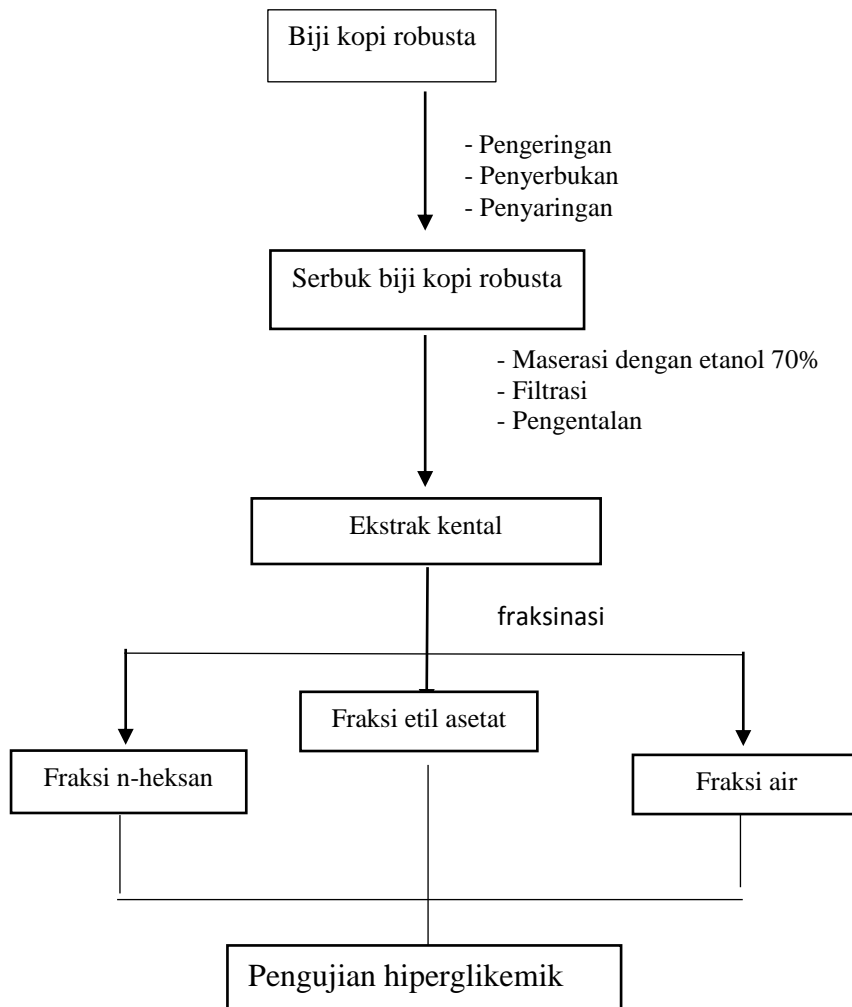
16.8 Pengamatan jaringan dengan mikroskop. Tahapan terakhir adalah dengan melakukan observasi di bawah mikroskop dan optilab untuk menganalisis hasil seperti menghitung jumlah, skala, dan pengukuran jarak serta keterangan pada gambar sehingga didapatkan hasil yang jelas dan dapat dipertanggung jawabkan.

G. Analisis Hasil

Analisis data dalam penelitian ini dipilih berdasarkan data yang diperoleh. Kuantitatif dinyatakan sebagai rata-rata (mean) dengan standar deviasi (SD). Sedangkan data kualitatif dari hasil gambar histopatologi jaringan pankreas dengan yang menunjukkan masa sel pankreas dengan pewarna HE. Analisis data secara statistik meliputi uji distribusi normal (Saphiro wilk) yang digunakan untuk menguji apakah data terdistribusi normal atau tidak. Apabila data tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji non parametik. Apabila terdistribusi normal ($p > 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji parametik analisis satu arah (ANOVA). Uji dilanjutkan dengan test Post Hoc

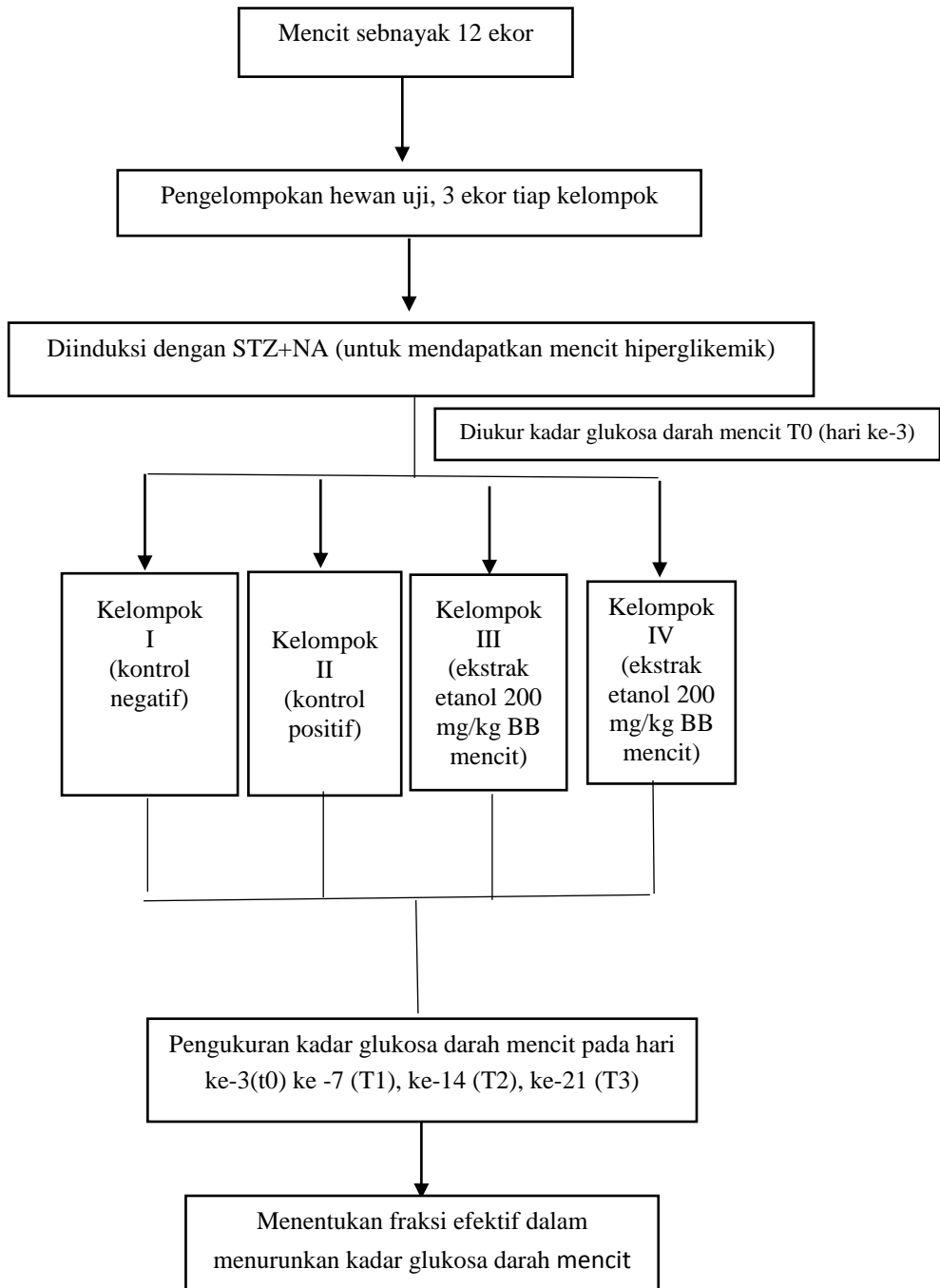
untuk melihat apakah terdapat perbedaan dari masing-masing kelompok perlakuan.

H. Alur Pembuatan Ekstrak dan Fraksi



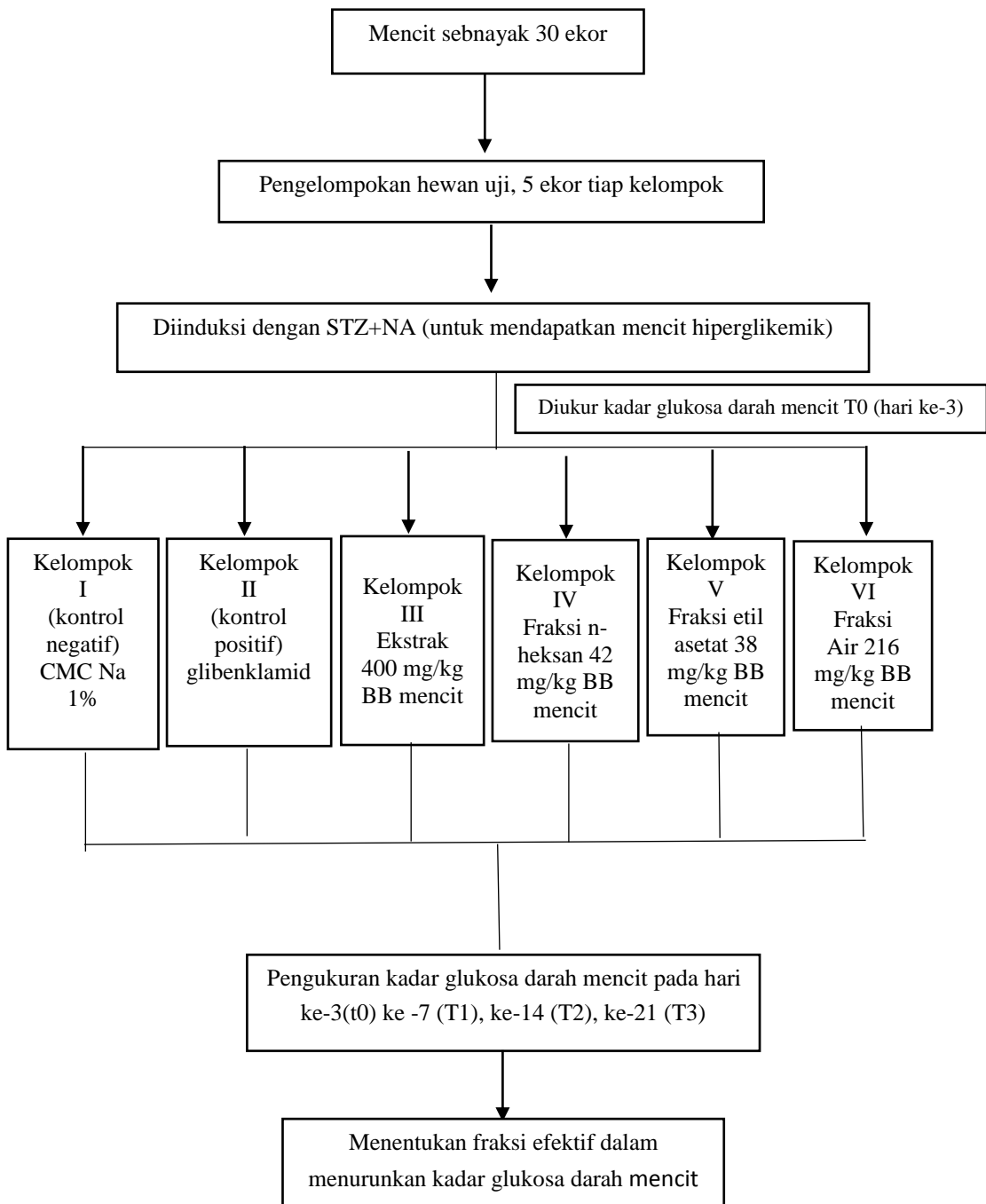
Gambar 3. Alur pembuatan ekstrak dan fraksi dari biji kopi robusta

I. Skema Pengujian Antihiperqlikemik Ekstrak Etanol Pada Mencit



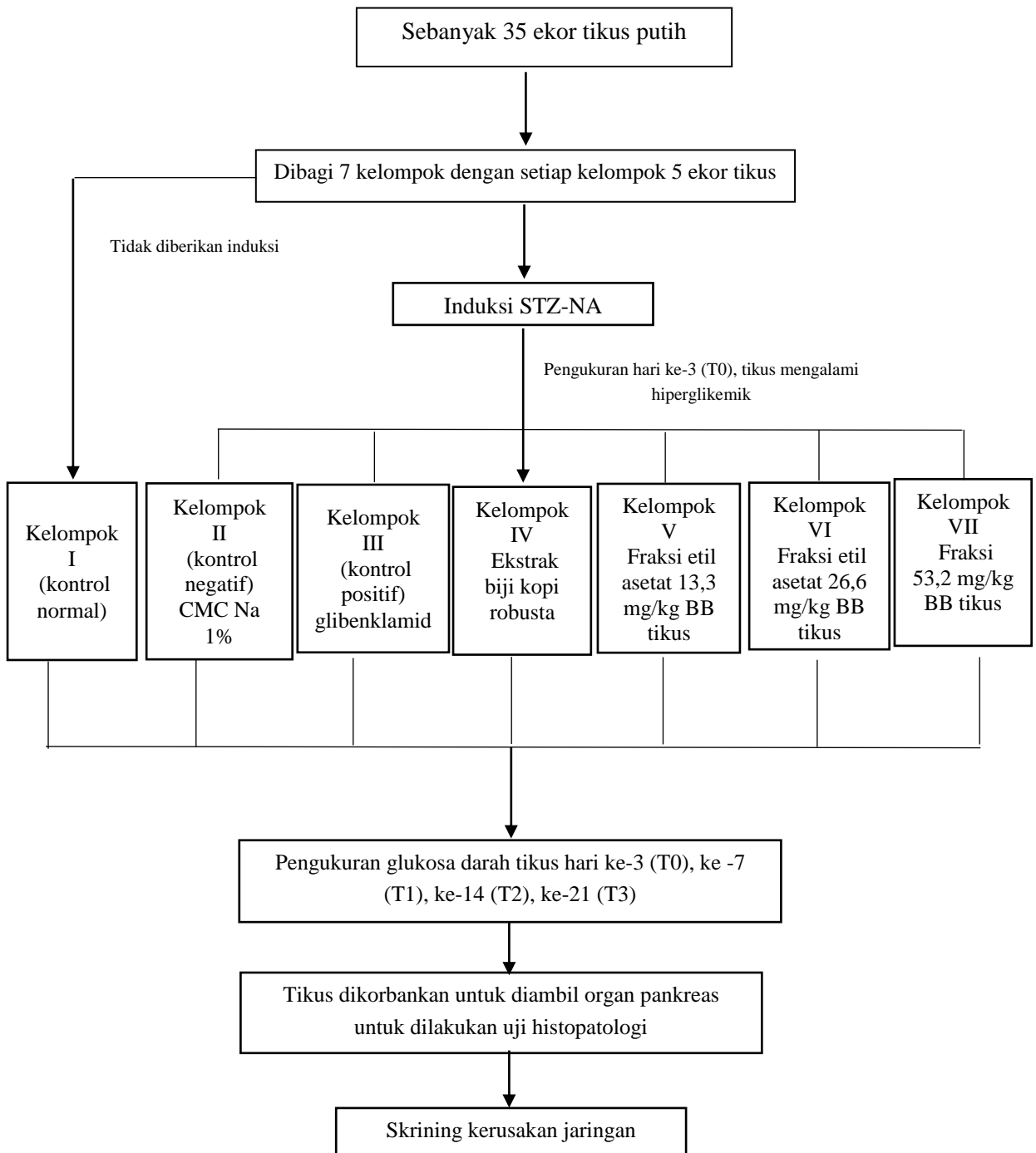
Gambar 4. Skema pengujian antihiperqlikemik fraksi pada mencit

J. Skema Pengujian Antihiperlikemik fraksi pada mencit



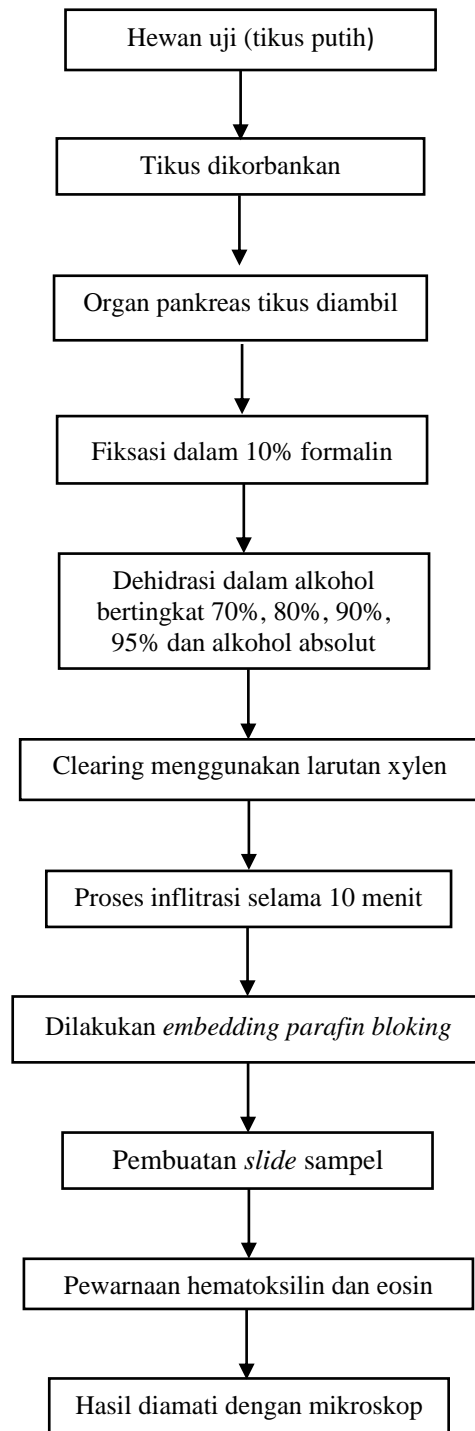
Gambar 5. Skema pengujian antihiperlikemik fraksi pada mencit

K. Skema Pengujian Antihiperqlikemik dan Regenerasi Sel Pankreas



Gambar 6. Skema pengujian efek antihiperqlikemik

L. Skema Preparat Histologi Pankreas



Gambar 7. Skema preparat histologi pankreas