

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit dari buah naga putih (*Hylocereus undatus*) dan kulit dari buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) diperoleh dari perkebunan di daerah Ngargoyoso, Karanganyar.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit dari buah naga putih (*Hylocereus undatus*) dan kulit dari buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) yang berkualitas bagus (tidak terlalu tua dan tidak berlubang), tidak busuk dan segar yang diperoleh dari perkebunan di daerah Ngargoyoso, Karanganyar pada waktu panen.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit dari buah naga putih (*Hylocereus undatus*) dan kulit dari buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) yang di ekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Variabel kedua dalam penelitian ini adalah mencit Swiss Webster jantan sebagai hewan uji. Variabel ketiga dalam penelitian ini adalah penentuan efek penurunan kadar gula dalam darah mencit Swiss Webster jantan.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama memuat identifikasi dari semua sampel. Variabel utama yang akan diidentifikasi, antara lain adalah variabel bebas, variabel kendali dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang diinginkan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung, dalam penelitian ini variabel bebasnya adalah pemberian ekstrak etanol kulit buah naga dengan dosis yang telah ditentukan.

Variabel kendali adalah variabel yang berpengaruh pada variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya sehingga hasil yang didapatkan tidak tersebar dan penelitian dapat diulang oleh peneliti lain dengan tepat. Dalam penelitian ini variabel kendalinya adalah kondisi fisik dari hewan uji yang meliputi: berat badan, jenis kelamin, umur, galur, lingkungan hidup, kondisi saat percobaan, laboratorium serta peneliti itu sendiri.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria dalam penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek penurunan kadar gula dalam darah terhadap mencit Swiss Webster jantan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, kulit buah naga putih adalah kulit dari buah naga berdaging putih yang segar yang diperoleh dari buah naga yang berasal dari daerah Karanganyar.

Kedua, kulit buah naga merah adalah kulit dari buah naga berdaging merah yang segar yang diperoleh dari buah naga yang berasal dari daerah Karanganyar.

Ketiga, serbuk kulit buah naga adalah serbuk yang diperoleh dari hasil pengeringan, penggilingan dan pengayakan kulit buah naga.

Keempat, ekstrak etanol kulit buah naga adalah ekstrak yang dihasilkan dari hasil ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan etanol 70% sebagai pelarutnya kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 40⁰C.

Kelima, kadar gula darah adalah kadar gula yang diukur menggunakan *easy touch* sebelum dan sesudah diberi perlakuan dengan ekstrak kulit buah naga sebelum dipuasakan selama 12 jam.

Keenam, kadar gula darah total adalah salah satu variabel yang sangat penting pengaruhnya terhadap kadar gula dalam plasma karena penurunan kadar gula darah sama dengan menurunkan risiko relatif untuk penyakit kardiovaskular.

Ketujuh, hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih Swiss Webster jantan yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan yang seragam.

Kedelapan, efek yang diamati adalah efek dari penurunan kadar gula dalam darah total pada mencit putih Swiss Webster jantan yang paling optimal.

Kesembilan, dosis efektif adalah dosis terkecil yang sudah memberikan efek penurun kadar gula darah total yang sudah sebanding dengan kontrol positif.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi timbangan analitik, alat POCT, bejana maserasi, kertas saring, kaca arloji, kain

flannel, beaker glass, tabung reaksi, erlenmeyer pyrex, batang pengaduk kaca, gelas ukur kaca, ayakan no.40, spuit injeksi 1 ml, blender, vacum, oven, *rotary evaporator*, spektrofotometri UV-Vis, jarum suntik oral, dan pipet tetes. Alat untuk perlakuan pada hewan uji meliputi kandang, wadah makan dan wadah minum.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit buah naga yang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, buah naga diperoleh dari perkebunan di daerah Ngargoyoso, Karanganyar.

Binatang percobaan yang digunakan dalam penelitian adalah mencit putih Swiss Webster jantan yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan mencit antara 20-30 gram.

Bahan sebagai kontrol adalah metformin dan CMC 0,5%. Metformin sebagai kontrol positif dan CMC 0,5% sebagai kontrol negatif.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Pada penelitian ini, determinasi tanaman merupakan tahap awal yang dilakukan pada kulit buah naga merah dan kulit buah naga putih. Tujuan dilakukan determinasi ini adalah untuk mengetahui kebenaran sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini. Determinasi tanaman kulit buah naga ini dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pembuatan serbuk kulit buah naga merah dan buah naga putih

Kulit buah naga yang diambil adalah kulit buah naga yang berasal dari buah naga yang tidak terlalu matang dan tidak terlalu muda. Buah naga dicuci dengan air mengalir untuk membersihkan kotoran dan tanah yang menempel. Setelah dicuci hingga bersih dan ditiriskan, kulit buah naga di kupas menggunakan alat pengupas buah naga kemudian di potong kecil-kecil kemudian dikeringkan dengan cara dioven dengan suhu 40⁰C hingga kering. Kulit buah naga yang telah kering kemudian dibuat serbuk dan di ayak dengan ayakan no. 40 dimana derajat kehalusan yang didapat adalah serbuk yang agak kasar namun tidak kasar dan tidak halus (Depkes, 2008). Kemudian serbuk ditimbang dan disimpan di dalam wadah kering dan di tutup rapat.

3. Pembuatan ekstrak etanolik kulit buah naga merah dan buah naga putih

Serbuk simplisia kering dilakukan maserasi menggunakan pelarut yang sesuai untuk membuat ekstrak. Metabolit sekunder pada simplisia dapat tersari dengan baik menggunakan pelarut yang sesuai atau tepat. Penelitian ini menggunakan etanol 70% sebagai pelarut.

200 gram serbuk kulit buah naga dimasukkan ke dalam maserator, tambahkan 2000 ml pelarut. Dilakukan perendaman selama 6 jam dengan sesekali diaduk, selanjutnya selama 18 jam didiamkan. Lakukan sentrifugasi untuk memisahkan maserat, filtrasi atau dekantasi. Lakukan remaserasi dengan pelarut yang sama dengan volume pelarut 1000 ml pada penyarian kedua. Kumpulkan semua maserat, dilakukan proses penguapan untuk membentuk ekstrak dengan alat "*rotavapor*" hingga diperoleh ekstrak kental. (Kemenkes, 2017)

4. Penetapan kadar air ekstrak kulit buah naga merah dan buah naga putih

Penentuan kadar air menggunakan cara destilasi toluen. Pertama toluen dijenuhkan dengan air terlebih dahulu dengan cara mencampurkan air dan toluene dengan perbandingan 1:10 dalam corong pisah, setelah dikocok di diamkan hingga kedua lapisan air dan toluene akan memisah, kemudian lapisan air dibuang. Serbuk sebanyak 10 gram, ditimbang seksama dan dimasukkan ke dalam labu. Lalu dimasukkan lebih kurang 100 ml toluen ke dalam labu dan alat dihubungkan. Setelah lapisan air dan toluen memisah sempurna, volume air dibaca dan dihitung kadar air dalam persen (Depkes RI, 2000). Replikasi sebanyak 3 kali.

5. Identifikasi kualitatif kandungan kimia ekstrak kulit buah naga merah dan buah naga putih

Uji kualitatif kandungan kimia yang terkandung pada kulit buah naga baik yang serbuk maupun ekstrak etanol bertujuan untuk membuktikan kebenaran bahan/zat aktif yang terkandung pada kulit buah naga.

5.1. Identifikasi flavonoid secara KLT. Dilakukkan analisis secara KLT menggunakan silika gel 60 GF₂₅₄ 5,5 cm, menggunakan fase gerak campuran butanol : asam asetat : aquadest perbandingannya 4:1:2. Menjenuhkan fase gerak didalam chamber selama 15 menit. Melakukan penotolan pada lempeng silika gel 60 GF₂₅₄ dengan batas atas 0,5 cm dan batas bawah 1 cm. Menunggu spot atau tolotan kering

kemudian dimasukkan ke dalam chamber yang berisi campuran butanol : asam asetat : aquadest yang sudah jenuh kemudian ditunggu hingga menyentuh batas atas. Amati menggunakan sinar UV 254 nm dan sinar UV 366 nm berikan tanda. Untuk mengetahui kandungan senyawa flavonoid dilihat dari nilai rf yang telah dihitung kemudian dibandingkan dengan baku rutin dan quersetin.

5.2. Identifikasi flavanoid. Menimbang ekstrak kulit buah naga sebanyak 0,5 g, ditambahkan air panas sebanyak 10 ml, dipanaskan selama 5 menit. Identifikasi dengan mengambil filtrat 5 ml ditambahkan sedikit serbuk logam Mg, 1 ml HCl pekat, dan 1 ml amil alkohol kemudian dikocok. Hasil positif flavonoid menunjukkan warna merah/kuning/jingga pada lapisan amil alkohol (Ismiyarto *et al*, 2009).

5.3. Identifikasi alkaloid. Menimbang ekstrak kulit buah naga sebanyak 0,5 g, ditambahkan 1 ml HCl 2 M dan 9 ml aquadest, dipanaskan selama 2 menit, kemudian dinginkan dan disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian masing-masing ditambah dengan pereaksi Dragendroff, Wagner dan Mayer (Setyowati *et al*, 2014).

5.4. Identifikasi tannin. Menimbang ekstrak kulit buah naga sebanyak 0,5 g, dilarutkan dalam 10 ml aquadest, kemudian disaring dan filtrat ditambah dengan 3 tetes FeCl_3 1 %. Uji tanin menunjukkan hasil positif jika terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan (Setyowati *et al*, 2014).

5.5. Identifikasi saponin. Menimbang ekstrak kulit buah naga sebanyak 0,5 g, ditambahkan 5 mL aquadest lalu dipanaskan selama 5 menit, didinginkan dan dikocok kuat-kuat. Hasil positif pada uji saponin jika terbentuk busa setinggi kurang lebih 1 cm dan stabil setelah didiamkan selama 15 menit (Yuningsih, 2007)

5.6. Identifikasi antosianin. Ekstrak kulit buah naga ditimbang sebanyak 0,5 g, kemudian ditambahkan HCL 2M dan dipanaskan selama 2 menit pada suhu 100 °C, kemudian diamati apabila warna tetap merah maka ekstrak mengandung senyawa antosianin (Lestario *et al*, 2013).

6. Pembuatan larutan uji

6.1. Pembuatan larutan CMC. 0,5 gram serbuk CMC ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam mortir yang sudah diberi aquadest yang sudah dipanaskan secara sedikit-sedikit ditunggu hingga mengembang. Untuk mendapatkan konsentrasi larutan 0,5% kemudian

menambahkan aquadest ad 100 ml dan diaduk hingga homogen. Agar zat aktif dapat terdispersi sempurna dan homogen dan dapat dilakukan pemberian keseragaman dosis maka digunakan CMC 0,5%.

6.2. Pembuatan suspensi metformin. Suspensi metformin 0,5 % dibuat dengan cara pertama CMC dikembangkan terlebih dahulu dengan menambahkan air panas di mortir dan diaduk hingga mengembang semua, kemudian tambahkan aquadest hingga ad 100 ml hingga terbentuk gel CMC. Kemudian membuat larutan stok metformin 0,5 % digerus 1 tablet metformin 500 mg di dalam mortir. Kemudian dimasukan larutan CMC ke dalam mortir yang berisi serbuk metformin dan digerus hingga homogen.

6.3. Pembuatan larutan uji ekstrak kulit buah naga. Pembuatan larutan stok uji ekstrak kulit buah naga 1% dengan cara pertama CMC dikembangkan terlebih dahulu dengan menambahkan air panas di mortir dan diaduk hingga mengembang semua, kemudian tambahkan aquadest hingga ad 100 ml hingga terbentuk gel CMC. Membuat larutan stok uji ekstrak kulit buah naga dengan menimbang 1 gram ekstrak kulit buah naga, digerus dalam mortir, kemudian ditambahkan larutan CMC ke dalam mortir yang berisi ekstrak kulit buah naga dan digerus hingga homogen.

7. Penentuan dosis

7.1. Dosis CMC. Larutan CMC 0,5% diberikan sebagai kontrol positif terhadap mencit putih jantan.

7.2. Dosis Metformin. Dosis metformin untuk manusia dengan berat badan 70 kg adalah 500 mg, kemudian dikonversikan pada mencit 20 gram dengan faktor konversi 0,0026 yaitu $500 \text{ mg} \times 0,0026 \text{ mg/g BB} = 1,3 \text{ mg metformin/20 g BB mencit}$.

7.3. Dosis Ekstrak Kulit Buah Naga. Dosis ekstrak kulit buah naga putih dan kulit buah naga merah adalah 62,5 mg/kg BB, 125 mg/kg BB, dan 250 mg/kg BB mencit yang diberikan selama 14 hari untuk melihat mana kah yang lebih efektif dalam menurunkan kadar gula dalam darah pada mencit Webster jantan yang diberi aloksan.

8. Pemberian Induksi Aloksan

Diberikan induksi aloksan dengan dosis 175 mg/kg BB yang sebelumnya dipiuasakan selama 10-12 jam. Setelah diinduksi aloksan mencit akan mengalami kenaikan gula darah dan dapat dilakukan penelitian untuk uji antihiperqlikemia.

9. Perlakuan Terhadap Hewan Uji

Mencit putih jantan ialah hewan uji yang digunakan, dengan usia 2-3 bulan serta berat berkisar 20-30 gram, keadaan normal, sehat serta dipelihara dengan tepat. Setelah itu selama 7 hari hewan uji diadaptasi di laboratorium. Mencit diberi makan pelet serta air minum tiap hari hingga jumlah makanan yang dimakan stabil. Sesudah ditimbang serta berat tubuh telah penuh persyaratan setelah itu hewan uji dikelompokkan acak meliputi kelompok negatif, kelompok positif, serta enam kelompok uji tiap- tiap 5 ekor. Tiap- tiap mencit setelah itu diberi tanda sesuai kelompok untuk memudahkan jalannya penelitian. Mencit dipuaskan ± 12 jam sebelum pengambilan darah. Jarum ditusukkan pada bagian ekor (vena lateral) lalu dilakukan pengukuran kandungan glukosa darah memakai alat *easy touch* untuk mengetahui kadar glukosa darah sebelum perlakuan (T_0). Kemudian setiap kelompok diinduksi aloksan untuk membuat keadaan mencit hiperglikemia. Setelah tiga hari, kemudian diukur kembali kadar glukosa darah tiap kelompok (T_1).

Kemudian masing-masing hewan uji dengan perlakuan sesuai kelompok 14 hari yaitu:

- Kelompok I : kontrol negatif diberi induksi aloksan dan suspensi CMC 0,5%
- Kelompok II : kontrol positif diberi induksi aloksan dan suspensi metformin 1,3 mg/20 g BB mencit.
- Kelompok III : diberi pakan standar, diberi induksi aloksan dan ekstrak etanol kulit buah naga merah 62,5 mg/kg BB
- Kelompok IV : diberi pakan standar, diberi induksi aloksan dan ekstrak etanol kulit buah naga putih 62,5 mg/kg BB
- Kelompok V : diberi pakan standar, diberi induksi aloksan dan ekstrak etanol kulit buah naga merah 125 mg/kg BB
- Kelompok VI : diberi pakan standar, diberi induksi aloksan dan ekstrak etanol kulit buah naga putih 125 mg/kg BB
- Kelompok VII : diberi pakan standar, diberi induksi aloksan dan ekstrak etanol kulit buah naga merah 250 mg/kg BB
- Kelompok VIII : diberi pakan standar, diberi induksi aloksan dan ekstrak etanol kulit buah naga putih 250 mg/kg BB

Setelah 7 hari diukur kembali kadar gula darah total pada mencit dengan menggunakan alat pengukur kadar gula dalam darah *easy touch*.

10. Pengukuran Kadar Gula Dalam Darah Total Pada Mencit

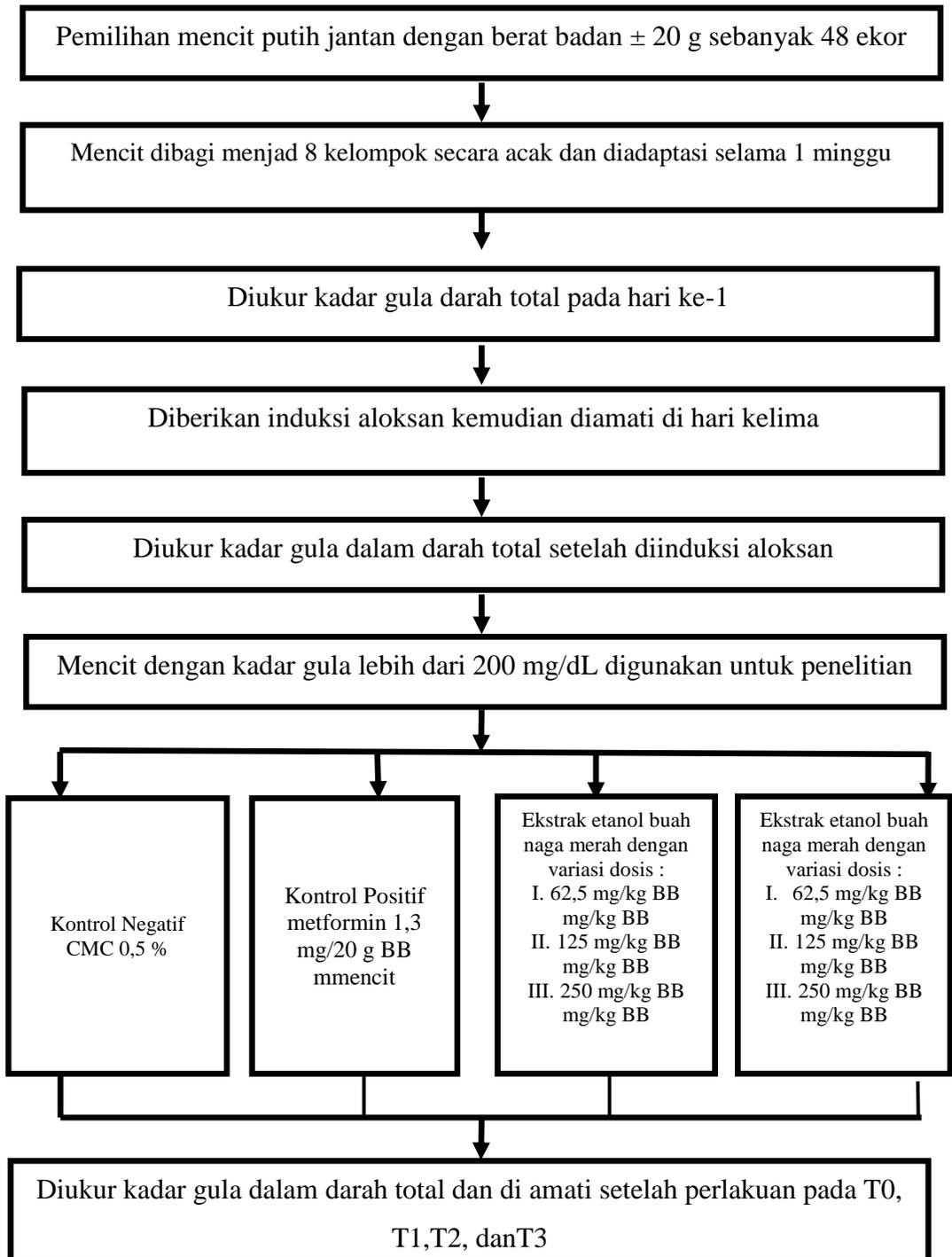
Penentuan kadar glukosa darah mencit lewat ekor (vena lateral) bisa ditentukan secara langsung dengan memakai glukometer ialah serangkaian pengecekan laboratorium simpel memakai alat meter. Prinsip kerja alat ini membentuk asam glukonat akibat glukosa dalam sampel bereaksi dengan glukosa oksidase, lalu membentuk ferrocyanide akibat asam glukonat bereaksi dengan ferricyanide serta menghasilkan arus berbanding lurus dengan kadar glukosa dalam darah. Konsentrasi glukosa sampel darah berupa intensitas arus yang terukur. Cara kerjanya ialah meneteskan darah pada zona sampel pada strip test, setelah itu sampel akan timbul di layar dengan satuan mg/dL, lalu catat hasil kemudian strip dilepas (Anonim, 2013)

E. Analisis Data

Analisa data diperoleh dari data penelitian ini ialah informasi yang dianalisa secara statistik untuk memperoleh dosis yang sangat efisien selaku antihyperglikemia untuk menurunkan kandungan glukosa darah mencit. Untuk melihat data normal ($p > 0,05$) atau tidak normal ($p < 0,05$) memakai uji distribusi normal (saphiro wilk), dilanjut dengan uji homogenitas varian Levene Test, bila data homogenya maka dilanjutkan uji One Way ANOVA untuk mengetahui apa ada perbandingan signifikan ataupun tidak di antara perlakuan. Bila hasil ada perbedaan yang signifikan ialah nilai $p < 0,05$, sehingga dilanjutkan uji Tukey Post Hoc Test digunakan Multiple Comparison serta Homogenous Subsets untuk melihat perbedaan antara kelompok perlakuan.

F. Alur Penelitian





Gambar 3. Skema Alur Penelitian