

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Populasi dan Sampel**

#### **1. Populasi**

Populasi dalam penelitian ini merupakan tanaman nanas queen dari Desa Semawung, Andong, Boyolali, Jawa Tengah yang diambil pada minggu ke 3 Januari 2024.

#### **2. Sampel**

Sampel pada penelitian merupakan bonggol nanas segar, dari buah nanas queen muda yang diambil dari Desa Semawung, Andong, Boyolali, Jawa Tengah.

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama pada penelitian adalah aktivitas ekstrak bonggol nanas terhadap penurunan gula darah pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi diet tinggi lemak dan Streptozotocin.

#### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama dapat dibagi menjadi beberapa jenis variabel, antara lain :

**2.1. Variabel bebas** pada penelitian adalah ekstrak bonggol nanas pada tikus putih jantan galur wistar dengan variasi dosis.

**2.2 Variabel tergantung** pada penelitian adalah perubahan kadar gula darah tikus putih jantan galur wistar pada masing-masing perlakuan.

**2.3 Variabel terkontrol** pada penelitian adalah umur tikus, berat tikus, jenis kelamin, galur hewan uji, pakan yang diberikan, kondisi fisik, lingkungan, laboratorium serta kondisi penelitian.

#### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, bonggol nanas merupakan bonggol yang berada di tengah buah nanas dengan tekstur keras.

Kedua, ekstrak bonggol nanas merupakan hasil maserasi bonggol nanas dengan pelarut etanol 96% perbandingan 1 : 10 yang dipekatkan dengan *vacum evaporator* agar diperoleh ekstrak kental.

Ketiga, metformin merupakan obat antidiabetes oral, dosis sediaan 500 mg.

Keempat, diet tinggi lemak adalah metode induksi diabetes tikus dengan 50 gram kuning telur puyuh rebus dicampur 100 ml larutan Na CMC 0,5%

Kelima, streptozotocin merupakan larutan streptozotocin dengan dosis 35 mg/kgBB tikus secara intraperitoneal untuk merusak sel beta pankreas

Keenam, kadar glukosa darah merupakan glukosa darah yang diambil melalui pembuluh darah vena bagian ekor. Alat glukometer mengukur glukosa darah secara otomatis setelah darah yang keluar dimasukkan ke strip tes.

Ketujuh, hiperglikemi merupakan kadar glukosa darah melebihi 135 mg/dl pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak dan streptozotocin yang ditetapkan dengan alat glukometer.

Kedelapan, dosis efektif merupakan dosis terkecil yang mampu memberikan penurunan kadar gula darah sebanding dengan kontrol positif.

### **C. Bahan dan Alat**

#### **1. Bahan**

Bahan dalam penelitian adalah tikus putih jantan galur wistar, bonggol nanas, streptozotocin, kuning telur puyuh, metformin, etanol 96%, CMC-Na, *buffer* sitrat 0,1 M, dan aquadest, reagen bouchardat, mayer, dragendrof, asam klorida, serbuk magnesium, HCl 2N, FeCl<sub>3</sub>.

#### **2. Alat**

Alat dalam penelitian adalah pisau, timbangan analitik, oven, mesin penggiling, ayakan mesh 60, bejana maserasi, gelas ukur, pengaduk bejana maserasi, kain flanel, Beaker glass, *water bath*, *vacuum rotary evaporator*, *moisture balance*, krus porselen, mortir & stamper, gelas kaca, batang pengaduk, spuit, sonde, kandang hewan uji, tempat minum hewan uji, dan glukometer.

### **D. Jalannya Penelitian**

#### **1. Determinasi tanaman**

Untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan yang diteliti, determinasi dilakukan dengan membandingkan tumbuhan dengan tumbuhan lain yang telah dikenal sebelumnya. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Pengujian – UPF Pelayanan Kesehatan Tradisional, Tawangmangu.

## 2. Pembuatan *ethnical clearance*

Pembuatan *ethnical clearance* dilakukan di RSUD Dr. Moewardi, Surakarta. Hal pertama yang dilakukan yaitu mengisi formulir pendaftaran online. Mendatangi kantor forensik dan medikolegal RSUD Dr. Moewardi dengan menyerahkan bukti pendaftaran dan form yang telah diisi secara online, serta membawa proposal yang telah ditandatangani pembimbing. Melakukan pembayaran. EC akan diproses terlebih dahulu maksimal selama 14 hari. Pengambilan EC harus dilakukan secara mandiri disertai dengan bukti pengajuan yang telah ditandatangani petugas.

## 3. Pengumpulan bahan

Dilakukan pengumpulan bahan dengan mengambil bonggol nanas yang diperoleh dari Desa Semawung, Andong, Boyolali, Jawa Tengah pada minggu ke 3 Januari.

## 4. Pencucian dan Pengeringan

Pencucian bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang masih tertinggal menggunakan air mengalir lalu ditiriskan. Pengeringan dilakukan dengan cara bonggol nanas dipotong kecil - kecil. Potongan bonggol nanas selanjutnya dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C 1 x 24 jam.

## 5. Pembuatan serbuk bonggol nanas

Potongan bonggol nanas yang telah kering dihaluskan menggunakan mesin penggiling hingga terbentuk serbuk. Serbuk diayak dengan ayakan No 60.

## 6. Pembuatan ekstrak bonggol nanas

Serbuk yang sudah diayak ditimbang sebanyak 500 gram kemudian dimaserasi menggunakan etanol 96% 5 liter ± selama 24 jam. Perendaman di enam jam pertama ini juga sambil sesekali diaduk, lalu didiamkan selama delapan belas jam. Maserat pada maserasi pertama disaring dengan kertas penyaring. Maserasi diulang kembali dengan cara sama, hingga tiga kali dengan volume pelarut yang dipakai hanya setengah dari jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Hasil dari ekstrak ditampung menjadi satu, dimasukkan ke dalam satu wadah untuk dipisahkan dengan pelarutnya. Ekstrak cair yang didapat dipisahkan dengan *rotary evaporator* 50°C hingga dihasilkan ekstrak kental bonggol nanas.

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang didapat}}{\text{Bobot serbuk simplisia yang diekstrak}} \times 100\%$$

## **7. Penetapan kadar air ekstrak bonggol nanas**

Metode gravimetri digunakan untuk penetapan kadar air ekstrak bonggol nanas. Menimbang lebih kurang 10 g ekstrak bonggol nanas, dimasukkan dalam wadah yang sudah ditara. Dikeringkan dengan suhu 105°C selama 5 jam, lalu ditimbang. Dilanjutkan pengeringan dan penimbangan dengan selang waktu 1 jam hingga perbedaan antara dua penimbangan berturut - turut tidak melebihi 0,25%.

## **8. Penetapan susut pengeringan ekstrak bonggol nanas**

*Moisture balance* digunakan dalam penetapan susut pengeringan ekstrak bonggol nanas. menara dahulu alat dengan akurasi dan temperatur sesuai dengan jumlah simplisia yang diuji. menimbang kurang lebih 2 gram ekstrak bonggol nanas dimasukan pada alat kemudian dicatat hasilnya berupa angka dalam persen, penetapan dilakukan tiga kali penetapan untuk meminimalisir kesalahan.

## **9. Identifikasi kandungan kimia ekstrak bonggol nanas**

Identifikasi kandungan kimia dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia yang ada dalam ekstrak bonggol nanas. Identifikasi yang dilakukan berupa identifikasi senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, triterpenoid, dan fenol yang terkandung dalam ekstrak bonggol nanas.

**9.1 Identifikasi senyawa alkaloid.** 1 ml ekstrak bonggol nanas ditambahkan 2 tetes Pereaksi Mayer. Hasil positif Jika terbentuk endapan putih atau kuning menggumpal. Larutan percobaan ke II ditambahkan 2 tetes Dragendorf. Terbentuknya endapan jingga coklat menunjukkan positif flavonoid. Larutan percobaan ke III, 1 ml filtrat ditambahkan 2 tetes pereaksi bouchardat. Terbentuk endapan coklat sampai hitam maka positif alkaloid (Depkes RI, 1995).

**9.2 Identifikasi senyawa flavonoid.** Beberapa mg sampel ditambahkan 2 mL etanol 95% kemudian ditambah 10 tetes asam klorida dan 0,5 g serbuk magnesium, lakukan pengocokan perlahan. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan ekstrak berubah berwarna merah, kuning, jingga atau merah jingga sampai merah ungu (Depkes RI, 1995).

**9.3 Identifikasi golongan senyawa saponin.** Masukkan 500 mg ekstrak bonggol nanas ke dalam tabung reaksi dan ditambah 10 ml air panas, dinginkan lalu kocok kuat-kuat selama 10 detik. Saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih setinggi 1 hingga 10 cm dan pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Depkes RI, 1995).

**9.4 Identifikasi golongan senyawa fenol.** 5 ml Ekstrak bonggol nanas ditambahkan dengan FeCl<sub>3</sub>. Timbulnya warna ungu kehitaman menandakan positif senyawa golongan fenolik (Depkes RI, 1995).

**9.5 Identifikasi golongan senyawa terpenoid dan steroid.** 5 ml ekstrak bonggol nanas ditambahkan pereaksi Liebermann Burcahrd. Terbentuknya warna merah menandakan positif adanya terpenoid dan terbentuknya warna biru atau hijau menandakan positif adanya steroid (Fajriah & Megawati, 2015).

## **10. Penetapan dosis**

**10.1 Dosis metformin.** Pada manusia dewasa dosis metformin sebesar 500 mg, hasil konversi pada tikus 200 gram yaitu 0,018. Dosis metformin yang dipakai pada tikus sebesar 45 mg/kg BB. Volume pemberian yang diberikan sebesar 3 ml.

**10.2 Dosis diet tinggi lemak.** 50 gram kuning telur puyuh rebus dicampur 100 ml larutan Na CMC 0,5%. Volume pemberian yang diberikan sebesar 3 ml.

**10.3 Dosis Streptozotocin.** Dosis 35 mg/kg BB tikus diberikan secara intraperitoneal. Volume pemberian yang diberikan sebesar 2 ml.

**10.4 Sediaan uji ekstrak bonggol nanas.** Hasil penelitian sebelumnya membuktikan ekstrak etanol bonggol nanas dengan dosis 125 mg/kg BB, 250 mg/kg BB, dan 500 mg/kg BB memiliki efek menurunkan kadar glukosa darah puasa pada mencit putih jantan yang diinduksi aloksan. Pada penelitian kali ini akan menggunakan dosis ekstrak bonggol nanas sebesar 125 mg/kg BB, 250 mg/kg BB, dan 500 mg/kg BB. Volume pemberian yang diberikan sebesar 3 ml.

## **11. Pembuatan larutan sediaan**

**11.1 Larutan sediaan CMC Na 0,5 %.** Menimbang 500 mg CMC Na ke dalam 10 ml aquades panas. dibiarkan kurang lebih 15 menit hingga bening dan berbentuk seperti gel. diaduk hingga homogen, diencerkan pada labu ukur dengan aquades hingga volume 100 ml.

**11.2 Larutan sediaan metformin.** Volume maksimal pemberian oral pada tikus adalah 5 ml. Pada penelitian ini volume pemberian diberikan sebesar 3 ml. Larutan sediaan metformin dibuat dengan menimbang serbuk tablet yang setara dengan 90 mg ke dalam 30 ml larutan CMC Na 0,5% dan aduk hingga homogen. Perhitungan larutan sediaan metformin dapat dilihat pada lampiran 14.

**11.3 Larutan sediaan diet tinggi lemak.** 50 gram kuning telur puyuh yang telah direbus ditambah dengan larutan 100 ml CMC Na 0,5%

**11.4 Larutan sediaan streptozotocin.** Streptozotocin yang digunakan adalah sebesar 500 mg, dilarutkan dalam 50 ml buffer sitrat 0,1 M pH 4,5, maka 1 ml larutan mengandung 10 mg STZ.

**11.5 Larutan sediaan ekstrak bonggol nanas dosis 125 mg/kg BB.** Larutan sediaan ekstrak bonggol nanas dosis 125 mg/kg BB dibuat dengan menimbang 250 mg ekstrak ke dalam 30 ml larutan CMC Na 0,5% dan aduk hingga homogen.

**11.6 Larutan sediaan ekstrak bonggol nanas dosis 250 mg/kg BB.** Larutan sediaan ekstrak bonggol nanas dosis 250 mg/kg BB dibuat dengan menimbang 500 mg ekstrak ke dalam 30 ml larutan CMC Na 0,5% dan aduk hingga homogen.

**11.7 Larutan sediaan ekstrak bonggol nanas dosis 500 mg/kg BB.** Larutan sediaan ekstrak bonggol nanas dosis 500 mg/kg BB dibuat dengan menimbang 1 g ekstrak ke dalam 30 ml larutan CMC Na 0,5% dan aduk hingga homogen.

## **12. Pengelompokan dan perlakuan hewan uji**

Tikus yang digunakan sebanyak 25 ekor tikus putih jantan. Besar sampel pada penelitian ini dihitung menggunakan rumus:

$$(t-1)(r-1) > 15$$

T yaitu banyaknya kelompok perlakuan dan r jumlah replikasi. Pada penelitian ini terdapat 5 kelompok hewan uji, yaitu satu kelompok sebagai kontrol negatif, satu kelompok sebagai kontrol positif dan tiga kelompok sebagai kelompok perlakuan, maka jumlah replikasi untuk setiap perlakuan dapat dihitung dengan rumus Federer (Federer W. T, 1991). Hasil perhitungan disajikan pada lampiran 20.

Jumlah sampel pada penelitian ini sebesar 5 ekor tikus per kelompok perlakuan sehingga jumlah sampel keseluruhan adalah 25 ekor tikus. Pengambilan sampel dilakukan menggunakan teknik sample random sampling, karena sampel diambil dari populasi yang dilakukan secara acak. Digunakan tikus putih jantan galur wistar sebagai hewan uji. Hewan uji dibagi dalam 5 kelompok masing - masing kelompok terdiri dari lima ekor tikus. Sebelum dilakukan pengujian tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 16 jam. Pada saat dipuasakan ini tikus akan tetap diberi minum. Pada hari pertama dilakukan pengukuran kadar glukosa awal (T<sub>0</sub>). Tikus selanjutnya diinduksi diet

tinggi lemak selama 7 hari secara per oral dan dilanjutkan dengan induksi streptozotocin dosis 35 mg/kg BB satu kali secara intraperitoneal. Pada hari ke 10 kadar gula darah tikus kembali dilakukan pengukuran (T1). Kadar glukosa darah tikus yang melebihi 135 mg/dl yang akan dipakai untuk penelitian.

Kemudian masing - masing kelompok diberi CMC Na 0,5% (kelompok kontrol negatif), metformin (kelompok kontrol positif), ekstrak bonggol nanas 125 mg/kg BB, 250 mg/kg BB, 500 mg/kg BB, secara oral setiap hari. Pada hari ke 7 dan 14 pemberian sediaan uji, kadar glukosa darah ditetapkan dan dibaca dengan alat glukometer. Kelompok uji untuk penelitian ini adalah:

Kelompok 1 : kelompok negatif CMC Na

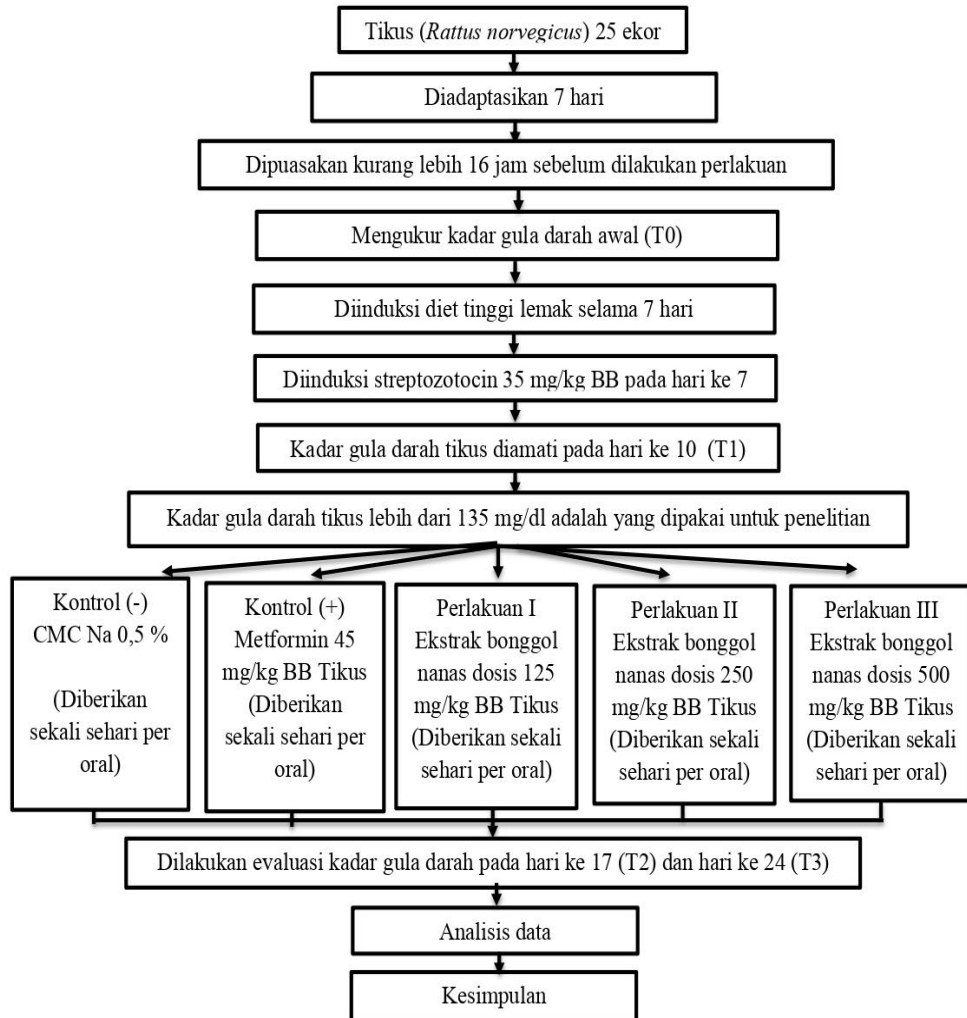
Kelompok 2 : kontrol positif, tikus diberikan metformin 45 mg/kg BB

Kelompok 3 : tikus diberi ekstrak bonggol nanas dosis 125 mg/kg BB

Kelompok 4 : tikus diberi ekstrak bonggol nanas dosis 250 mg/kg BB

Kelompok 5 : tikus diberi ekstrak bonggol nanas dosis 500 mg/kg BB

### 13. Prosedur pengujian



Gambar 4. Skema uji aktivitas antihiperqlikemi ekstrak bonggol nanas.

### E. Analisis Hasil

Data yang terkumpul diolah secara statistik menggunakan *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS). Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji *Paired T- Test* untuk menentukan apakah terdapat perbedaan antara nilai pre - test dan post - test. Normalitas data diuji menggunakan *Shapiro Wilk*. Jika diperoleh hasil normal maka dilakukan *one way ANOVA*, bila data tidak normal digunakan uji *Kruskal-Wallis*. Jika hasil uji menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan, lakukan uji *post hoc Tukey* untuk melihat kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan.