

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dari penelitian ini berupa buang pinang yang tua yang sudah matang berasal dari Kec. Trowulan Kab. Mojokerto dan buah tin yang sudah matang diperoleh dari desa Ciwidey Jawa Barat di tahun 2024.

Sampel penelitian ini adalah biji pinang yang tua dan memiliki daging berwarna kecoklatan didalamnya, lalu untuk buah tin dipilih buah yang sudah matang, segar, kulit luar berwarna ungu dan daging buah berwarna merah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini adalah ekstrak kombinasi buah tin dan biji pinang yang diperoleh dengan metode maserasi. Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah penurunan kadar gula darah dan berat badan pada mencit putih jantan dengan induksi aloksan sebagai antihiperglikemia.

2. Klasifikasi variabel utama

2.1 Variabel bebas merupakan variabel yang dapat dilakukan dengan memodifikasi guna mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung, variabel bebas pada penelitian ini adalah perbandingan kombinasi kadar ekstrak buah tin dan biji pinang.

2.2 Variabel tergantung adalah inti permasalahan pada penelitian, yang dimana penelitian ini adalah penurunan kadar glukosa dalam darah dan berat badan pada mencit putih dengan tiap tiap perbandingan kadar ekstrak yang berbeda.

2.3 Variabel terkontrol adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung dan harus didefinisikan agar mendapatkan hasil yang tidak dapat disebar atau dapat dilakukan secara berulang secara tepat dan cepat oleh peneliti yang lain, yang dimana variabel terkontrol pada penelitian ini mencakup kondisi fisik, kondisi lingkungan, jenis kelamin, pakan yang diberikan, galur hewan uji, keadaan laboratorium, serta berat badan hewan uji yang dimana hewan yang digunakan adalah mencit putih jantan.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, biji pinang adalah buah yang masih tua dengan daging buah yang berwarna kecoklatan dan didapatkan dari Kec. Trowulan, Kabupaten Mojokerto.

Kedua, buah tin adalah buah tin yang telah setengah matang dengan kulit buah berwarna hijau keunguan, masih terlihat segar, daging buah yang berwarna merah hingga ungu diperoleh dari desa Ciwidey, Jawa barat.

Ketiga, biji pinang dan buah tin adalah daging biji pinang dan buah tin yang telah melalui sortasi basah untuk menghilangkan kotoran dari sampel kemudian dikering menggunakan oven pada suhu 80°C selama 72 jam, dihaluskan menggunakan blender, dan diayak menggunakan ayakan mesh nomor 40.

Keempat, ekstrak biji pinang dan tin adalah ekstrak yang diperoleh dari serbuk biji pinang kering dan buah tin kering didapatkan dari metode maserasi dengan pelarut yang digunakan etanol 70%, setelah itu dilakukan proses pemekatan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* sampai mendapatkan ekstrak yang kental.

Kelima, aktivitas antihiperqlikemia adalah aktivitas yang diperoleh melalui pengujian kadar gula darah dan berat badan mencit selama pengujian berlangsung.

Keenam, kadar gula darah adalah kadar gula darah yang diperoleh melalui vena lateralis pada ekor mencit putih yang tersebut akan ditentukan menggunakan alat *glucometer Easy Touch GCU*.

Ketujuh, mencit putih adalah hewan uji mencit putih yang berumur 2 hingga 3 bulan dengan jenis kelamin jantan dengan bobot 20 gram hingga 30 gram.

Kedelapan, induksi hiperqlikemia yang digunakan adalah induksi aloksan dengan dosis 210 mg/kgBB. Pada hari ketiga setelah pemberian induksi kemudian dilakukan pengukuran kadar gula darah mencit putih dengan glukometer sebagai nilai (T1). Mencit dinyatakan hiperqlikemia jika kadar gula darahnya mencapai >126 mg/dl.

Kesembilan, kontrol positif adalah pemberian glibenklamid 0,65 mg/kgBB mencit sebagai kontrol positif pengujian.

Kesepuluh, pemberian dosis tunggal adalah ekstrak biji pinang dan buah tin dengan dosis 560 mg/kg BB.

Kesebelas, kombinasi ekstrak adalah kombinasi biji pinang dan buah tin secara per oral dengan perbandingan 1:1, 3:1, dan 1:3 untuk mengetahui kombinasi mana yang lebih efektif.

C. Alat, Bahan dan Hewan Uji

1. Alat

Alat alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas, alat timbang, bejana maserasi, penangas air, ayakan nomor 40, blender, pisau, kertas saring, kain flannel, batang pengaduk, Erlenmeyer, *beaker glass*, *vacum rotary evaporator*, kandang mencit, timbangan elektronik, sondel oral, spuit injeksi, *Glucometer Easy Touch*, *glucose strip test*, gelas ukur, *stopwatch*.

2. Bahan

Adapun bahan bahan yang akan digunakan adalah biji pinang, buah tin segar, etanol 70%, pakan, minum mencit, aloksan monohidrat, Na CMC 0,5%, glibenklamid 5 mg, akuades.

3. Hewan uji

Adapun hewan uji yang digunakan adalah mencit putih jantan yang berusia antara 2 bulan dan 3 bulan dengan berat badan 20 gram hingga 30 gram.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman merupakan metode identifikasi tanaman dengan melakukan pemeriksaan ciri-ciri mikroskopis maupun makroskopis dari biji pinang yang berasal dari Kec. Trowulan, Kabupaten Mojokerto dan buah tin yang berasal dari desa Ciwidey di Jawa Barat.

2. Pengeringan sampel tanaman dan pembuatan serbuk

Buah pinang yang sudah tua atau matang serta daging buahnya berwarna gelap dibersihkan dengan baik di bawah air mengalir untuk menghilangkan kotoran atau getah yang mungkin menempel pada daging. Setelah itu, biji tersebut ditiriskan, dipotong kecil-kecil, dan dikeringkan pada suhu 50 derajat Celcius selama 72 jam hingga daging buah mengering dan berubah warna menjadi coklat. Setelah itu, blender digunakan untuk menggiling daging buah pinang yang sudah dikeringkan hingga menjadi serbuk. Setelah itu, bubuk akhir ditimbang,

diayak dengan saringan ukuran 40, dan disimpan dalam wadah tertutup rapat.

Buah tin yang telah setengah matang, dengan kulit ungu dan daging merah yang masih segar, dibersihkan dengan air yang mengalir untuk menghapus noda yang ada pada daging buah dan disortir untuk memilih buah yang tidak rusak. Setelah dicuci, buah ditiriskan dan diiris-iris setebal 3 mm. Daging buahnya kemudian dikeringkan selama 84 jam pada suhu 50 derajat Celcius. Selanjutnya, blender digunakan untuk menggiling daging buah ara kering hingga menjadi serbuk. Setelah diayak dengan ayakan nomor 40, serbuk yang dihasilkan ditimbang dan disimpan dalam wadah tertutup rapat.

3. Uji susut pengeringan serbuk

Pengurangan berat setelah proses pengeringan dikenal sebagai susut pengeringan menggunakan *moisture balance*. Simplisia akan ditimbang secara hati-hati sebanyak satu sampai dua gram ke dalam wadah yang tertutup. Simplisia diratakan dalam wadah, kemudian alat akan ditutup dan tombol on dinyalakan dengan pengaturan yang telah dirubah ke dalam mode otomatis, setelah alat telah berhenti data yang diperoleh tersebut akan dihitung dan memperoleh hasil rendemen dari sampel simplisia (DepKes RI, 2017).

4. Pembuatan Ekstrak

Serbuk biji pinang 1.5 kg dan buah tin 1.5 kg masing masing diekstrak dengan etanol 70% dengan tujuan untuk menyaring metabolit sekunder yang terdapat dalam masing masing simplisia. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi. Masukkan 15 liter etanol 70% sebagai pelarut dari masing masing ekstrak. Hasil pencampuran 1x24 jam dengan 6 jam pertama dilakukan penggojokan, kemudian disaring menggunakan corong yang sudah diberikan kain flannel. Ulangi prosedur penyaringan menggunakan pelarut yang sama, tambahkan 7,5 liter pelarut kedua. Kemudian, gunakan *rotary evaporator* untuk menguapkan campuran hingga diperoleh ekstrak kental, dan gunakan persentase berat untuk menentukan rendemen.

5. Uji kadar air ekstrak

Menentukan kadar air ekstrak, yang berkorelasi dengan kemurnian dan potensi kontaminasi, merupakan tujuan pengukuran kadar air. Teknik gravimetri digunakan dalam penelitian ini. Menimbang sampel seberat 10 gram, mengeringkannya selama lima jam pada suhu 105°C, dan kemudian menimbang hasil pengeringan

merupakan langkah-langkah dalam proses tersebut. Setiap jam, prosedur pengeringan dan penimbangan harus diselesaikan sampai selisih hasil penimbangan berikutnya tidak melebihi 0,25% (DepKes RI, 2017).

6. Skrining fitokimia serbuk dan ekstrak

Pada pengujian skrining fitokimia dilakukan pada saat setelah pembuatan serbuk dan pembuatan ekstrak pada masing masing buah, pengujian ini menggunakan cara kerja seperti berikut :

6.1 Uji alkaloid Sembilan mililiter air suling dan satu mililiter asam klorida 2 N ditambahkan setelah 0,5 gram ekstrak etanol ditimbang. Setelah dua menit dipanaskan di atas penangas air, campuran didinginkan dan disaring. Dua tetes pereaksi Mayer yang akan menghasilkan endapan putih atau kuning, ditambahkan ke dalam 0,5 ml filtrat. Prosedur ini diulangi dengan reagen lain; endapan berwarna coklat atau jingga kecoklatan dihasilkan oleh pereaksi Dragendorf, sedangkan endapan berwarna coklat sampai kehitaman dihasilkan oleh pereaksi Bouchardat. Jika lumpur atau kekeruhan muncul pada setidaknya dua dari tiga tes, alkaloid dianggap positif (Sambode *et al.*, 2022).

6.2 Uji flavonoid Setelah dilakukan pengukuran ekstrak etanol 200 mg, sampel diambil sebanyak 5 ml etanol, kemudian dipanaskan dalam tabung reaksi selama lima menit. Kemudian ditambahkan 0,2 g bubuk magnesium, diikuti dengan beberapa tetes HCl pekat, dan semuanya dikocok kuat-kuat. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan hasil yang tampak berwarna merah, kuning, atau oranye.

6.3 Uji tanin Setelah ditimbang dan disaring 0,5 g ekstrak etanol ditambahkan 10 ml aquades dan didiamkan selama 15 menit. Air sulingan digunakan untuk mengencerkan filtrat yang dihasilkan hingga tidak berwarna. Ambil dua mililiter larutan ini dan tambahkan satu atau dua tetes larutan reagen besi (III) klorida 10%. Tanin hadir jika larutan berubah warna menjadi biru atau hijau kehitaman (Sambode *et al.*, 2022).

6.4 Uji saponin Sepuluh mililiter air panas dan disaring ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 0,5 gram ekstrak etanol. Setelah itu, filtrat dikembalikan ke tabung reaksi dan dikocok selama sepuluh detik. Hasilnya dianggap positif jika, setelah penambahan beberapa tetes asam klorida, busa stabil setinggi 1–10 cm

terbentuk di dalam tabung reaksi selama minimal 10 menit (Sambode *et al.*, 2022).

6.5 Uji triterpenoid/steroid Dua mililiter sampel dicampurkan dengan dua mililiter kloroform dan dua mililiter asam asetat konsentrasi tinggi. Selanjutnya, dua mililiter asam sulfat pekat ditambahkan perlahan-lahan ke dalam tabung hingga terlihat perubahan warna menjadi merah ungu atau hijau biru, yang disertai dengan pembentukan cincin yang menunjukkan keberadaan triterpenoid atau steroid (Sambode *et al.*, 2022).

7. Pembuatan larutan uji

7.1 Larutan aloksan. Aloksan akan dilarutkan dengan konsentrasi 1%, pembuatan aloksan dengan cara melarutkan 1 gram aloksan ke dalam 100 ml larutan fisiologis NaCl 0,9%. Setelah itu, aloksan tersebut diinjeksikan ke mencit melalui metode intraperitoneal dengan dosis yang telah dikonversikan dari dosis tikus 210 mg/kg berat badan mencit.

7.2 Larutan CMC Na 0,5%. Pembuatan larutan CMC Na adalah dengan cara menimbang 5000 mg CMC Na dan menambahkan aquades panas secara perlahan sambil terus diaduk hingga menghasilkan larutan koloidal., setelah selesai terbentuk koloidal dalam larutan, aquades ditambahkan sampai total volume mencapai 1000 ml.

7.3 Ekstrak sediaan kombinasi. ekstrak dari biji pinang dan buah tin di timbang 2 gram dengan perbandingan 1:1, 3:1, dan 1:3, lalu dimasukkan ke dalam mortir dan ditambahkan suspensi CMC Na 0,5% sedikit demi sedikit ad homogen. Setelah homogen larutan dipindahkan ke dalam Erlenmeyer kemudian ditambahkan CMC Na 0,5% hingga 100 ml.

7.4 Pembuatan sediaan dosis tunggal biji pinang. Ekstrak biji pinang ditimbang sebanyak 2 gram lalu dimasukkan ke dalam mortir dan ditambahkan suspensi CMC Na 0,5% sedikit demi sedikit hingga larutan menjadi homogen, lalu pindahkan ke dalam Erlenmeyer dan tambahkan CMC Na 0,5% hingga 100 ml.

7.5 Pembuatan sediaan dosis tunggal buah tin. Ekstrak buah tin ditimbang sebanyak 2 gram lalu dimasukkan ke dalam mortir dan ditambahkan suspensi CMC Na 0,5% sedikit demi sedikit hingga larutan menjadi homogen, lalu pindahkan ke dalam Erlenmeyer dan tambahkan CMC Na 0,5% hingga 100 ml

7.6 Glibenklamid. Larutan ini digunakan sebagai pembanding dari sediaan kombinasi ekstrak yang akan diujikan. Larutan ini memiliki konsentrasi 0,005% dengan melarutkan 1 tablet glibenklamid yang mengandung 5 mg bahan aktif lalu digerus hingga halus menggunakan mortir, lalu ditambahkan suspensi CMC Na 0,5% sedikit demi sedikit hingga larutan menjadi homogen, lalu pindahkan ke dalam Erlenmeyer dan tambahkan CMC Na 0,5% hingga 100 ml.

8. Perlakuan Hewan Uji

Mencit putih jantan adalah hewan yang akan digunakan dalam pengujian kali ini. Pemilihan mencit ini berdasarkan berat badan antara 20 hingga 30 gram dengan usia rata-rata 3 sampai 4 bulan, dalam keadaan normal tanpa adanya kecacatan, sehat serta dipelihara dengan tepat dan diaklimasikan selama seminggu. Mencit dilakukan penimbangan agar tidak adanya bobot yang kurang atau lebih dari target yang telah ditentukan, hewan uji akan dikelompokkan menjadi 8 kelompok dengan susunan kelompoknya adalah kelompok kontrol positif, kontrol negatif, kontrol pinang tunggal, kontrol tin tunggal dan 3 kelompok yang akan diberikan ekstrak buah kombinasi. Mencit akan dipuasakan selama 12 jam untuk akan diambil sampel darah. Jarum akan dimasukkan pada bagian ekor mencit (vena lateral) lalu akan digunakan untuk mengukur kadar gula darah waktu puasa menggunakan alat *easy touch* pada sebelum dan perlakuan (T_0) dan diukur berat badannya. Setiap kelompok akan diinduksikan aloksan secara peroral untuk mendapatkan keadaan mencit yang sedang hiperglikemia, lalu dilakukan kembali pengukuran gula darah setelah hari ke-4 tiap kelompok untuk mendapatkan nilai dari (T_1) serta diukur berat badannya. Setelah pemberian aloksan hewan uji akan diberi larutan yang digunakan untuk penurunan kadar glukosa darah setiap hari dan akan diukur gula darahnya pada hari ke-11 (T_2) dan hari ke-18 (T_3), hari ke-21 (T_4) dan mencit akan ditimbang berat badannya apakah ada penurunan atau kenaikan berat badannya.

9. Pengujian Aktivitas Antihiperglikemia

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan Ludong dkk (2019) yaitu biji pinang dengan dosis efektif 400 mg/kgBB tikus, dan buah tin 400 mg/kgBB tikus (Patni *et al.*, 2022). Dosis tersebut setara dengan 560 mg/kgBB mencit yang akan diberikan pada 40 ekor mencit putih jantan yang terbagi ke dalam 8 kelompok uji seperti berikut :

- Kelompok I : Kontrol normal
- Kelompok II : kontrol negatif yang diinduksikan aloksan dan diberi larutan CMC 0,5%
- Kelompok III : kontrol positif yang diinduksikan aloksan dan diberi larutan glibenklamid dengan dosis 0,65 mg/kgBB mencit
- Kelompok IV : diinduksikan aloksan dan larutan ekstrak biji pinang dengan dosis 560 mg/kgBB mencit
- Kelompok V : Diinduksikan aloksan dan diberi larutan ekstrak buah tin dosis 560 mg/kgBB mencit
- Kelompok VI : Diinduksikan aloksan dan diberi larutan kombinasi ekstrak biji pinang dengan dosis 420 mg/kgBB mencit dan buah tin 140 mg/kgBB mencit
- Kelompok VII : Diinduksikan aloksan dan diberi larutan kombinasi ekstrak biji pinang dengan dosis 140 mg/kgBB mencit dan buah tin 420 mg/kgBB mencit
- Kelompok VIII : Diinduksikan aloksan dan diberi larutan kombinasi ekstrak biji pinang dengan dosis 280 mg/kgBB mencit dan buah tin 280 mg/kgBB mencit

10. Pengukuran kadar glukosa darah dan berat badan mencit.

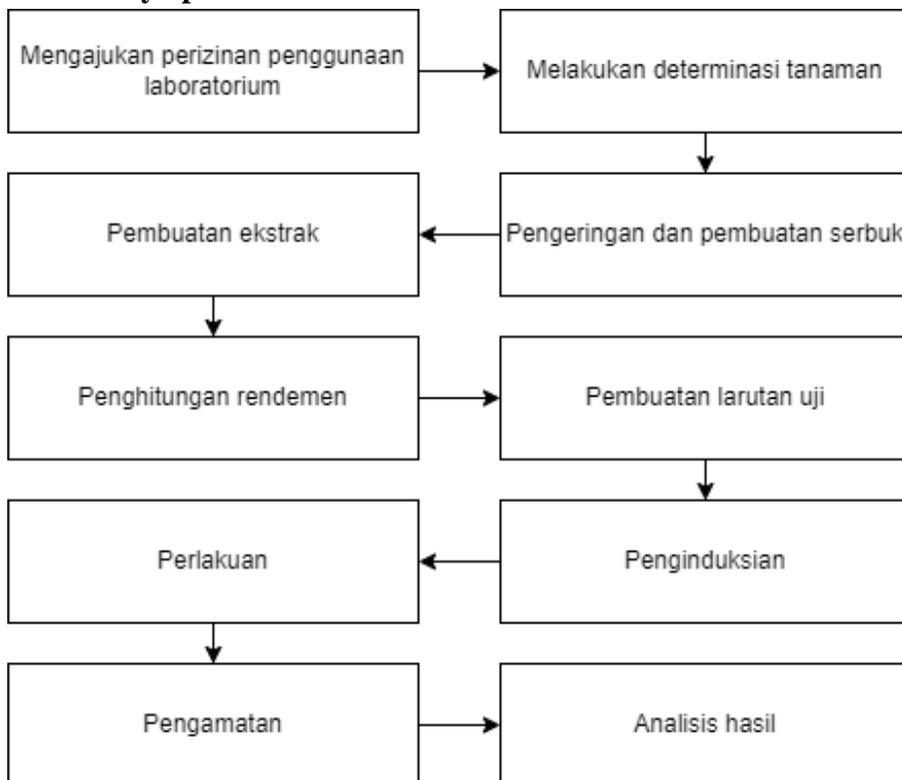
Metode pengukuran kadar glukosa darah dilakukan menggunakan glucometer pada mencit dengan cara mengambil sampel darah dari ujung ekornya dan pengukuran berat badan menggunakan timbangan digital pada hari keempat, kesebelas, kedelapan belas, dan kedua puluh satu. Sampel darah yang diperoleh diletakkan pada strip kapiler untuk mengukur kadar glukosa darah dan timbangan untuk memperoleh berat badan pada hari ke-0, guna mengetahui tingkat glukosa darah dan berat badan awal. Pengukuran yang dilakukan pada hari ke-4 bertujuan untuk memeriksa kondisi mencit setelah induksi aloksan. Sementara itu, pengukuran kadar glukosa darah pada hari ke-11, ke-18, dan ke-21 dimaksudkan untuk menilai penurunan kadar glukosa darah dan berat badan yang optimal setelah pemberian ekstrak kombinasi biji pinang dan buah tin dengan berbagai dosis serta kontrol obat perbandingan. Data yang didapatkan akan dianalisis secara statistik untuk membandingkan dampak dari perlakuan ekstrak kombinasi biji pinang dan buah tin terhadap obat perbandingan, yaitu glibenklamid.

E. Analisis Data

Data dari penelitian ini menunjukkan penurunan kadar gula darah dan berat badan pada mencit putih jantan yang mengalami hiperglikemia. Uji *Shapiro-Wilk* digunakan untuk menentukan apakah data terdistribusi normal. Data dianggap normal jika $p > 0,05$. Jika data tidak terdistribusi normal, maka dilakukan pengujian non-parametrik. Sebaliknya, jika data terdistribusi normal, uji homogenitas dilakukan untuk memastikan adanya ketidaksamaan varians. Data dianggap homogen jika $p > 0,05$, dan sebaliknya. Jika data telah terdistribusi normal dan homogen, peneliti akan melanjutkan dengan pengujian parametrik menggunakan *One Way ANOVA* untuk mengevaluasi apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan. Jika $p < 0,05$, hal ini menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan, sehingga dilanjutkan dengan uji *Tukey post hoc* untuk mengetahui perbedaan di antara setiap kelompok perlakuan.

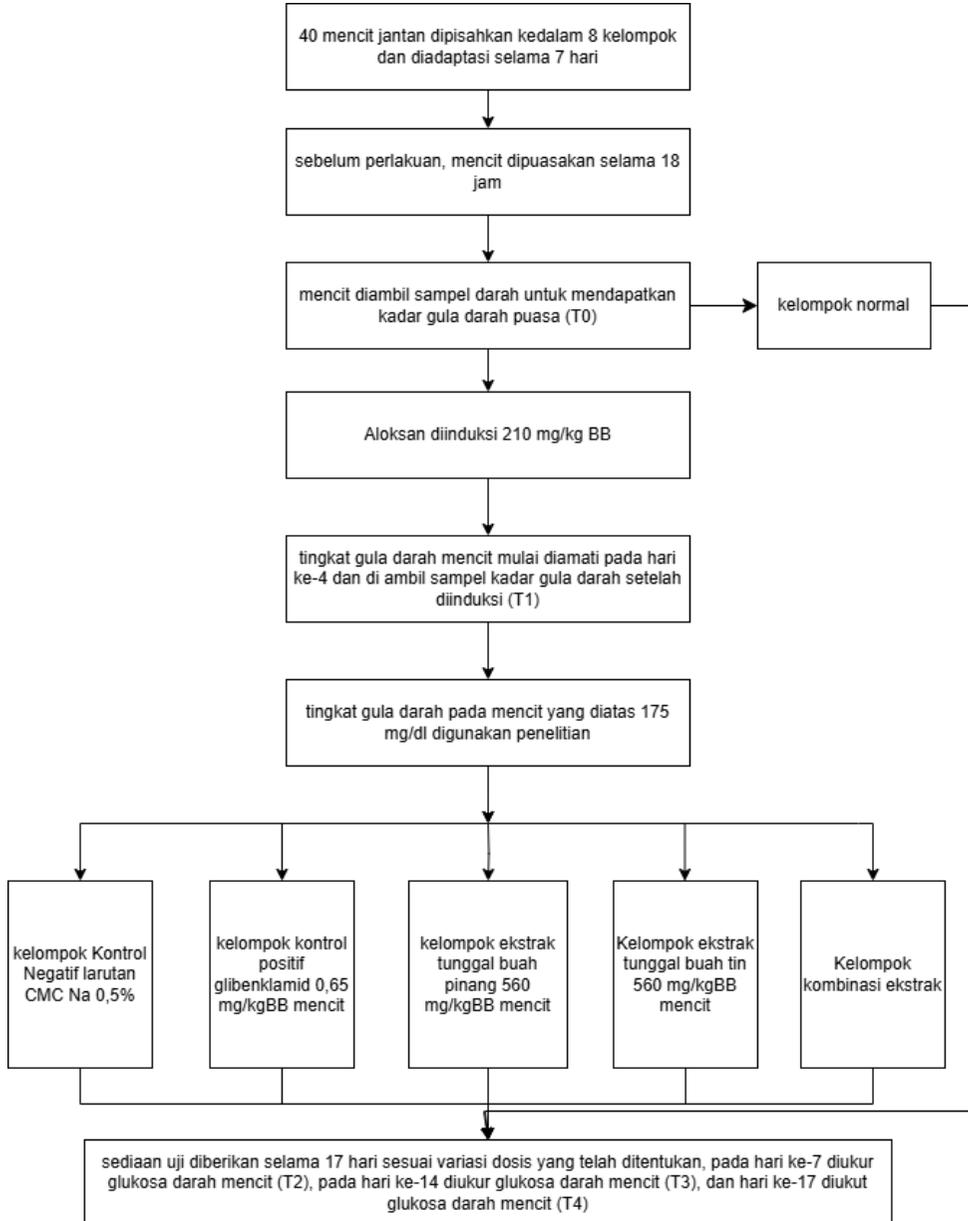
F. Skema Penelitian

1. Jalannya penelitian



Gambar 6. Alur penelitian

2. Perlakuan hewan uji



Gambar 7. Alur perlakuan hewan uji