

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dari penelitian ini adalah berupa bunga telang (*Clitoria ternatea*) berwarna warna biru cerah yang masih segar dipetik langsung di Mojosongo, Kota Surakarta dan pinang (*Areca catechu*) yang sudah tua berasal dari Kec. Trowulan, Kabupaten Mojokerto.

Sampel penelitian ini merupakan bunga dari tanaman telang dan biji pinang yang sudah tua. Bunga telang yang dipilih adalah bagian bunga berwarna warna biru cerah yang masih segar dan biji pinang yang sudah tua dengan ciri kulit luar berwarna kuning, warna pinang coklat, tekstur biji pinang tua lebih keras disbanding yang muda, kandungan serat lebih banyak sehingga lebih susah dikunyah dan rasa pinang tua cenderung lebih pahit.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini adalah ekstrak kombinasi bunga telang (*Clitoria ternatea*) dan biji pinang (*Areca catechu*) menggunakan metode maserasi.

Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah penurunan kadar gula darah atau hiperglikemia kombinasi ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea*) dan biji pinang (*Areca catechu*) pada mencit jantan yang diinduksi diabetogen aloksan.

2. Klasifikasi variabel utama

Setelah tahap identifikasi dilakukan variabel utama yang dilanjutkan dengan pengelompokan variabel bebas, variabel tergantung dan terkendali.

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas merupakan variabel yang diubah untuk memastikan dampaknya terhadap variabel terikat. Variabel bebas penelitian adalah perbandingan ekstrak bunga telang dan biji pinang.

2.2 Variable tergantung. Variabel tergantung merupakan fokus utama dalam penelitian yang mudah terpengaruh oleh variabel bebas. Variabel tergantung digunakan untuk menguji efek penurunan

kadar glukosa dalam darah pada mencit (*Mus musculus*) dengan tiap tiap perbandingan kadar ekstrak yang berbeda.

2.3 Variable terkendali. Variabel terkendali merupakan variabel kritis karena mempengaruhi variabel terikat, sehingga perlu dinilai kualifikasinya. Variabel terkendali pada penelitian ini mencakup kondisi fisik, kondisi lingkungan, jenis kelamin, pakan yang diberikan, galur hewan uji, keadaan laboratorium, serta berat badan hewan uji yang mana hewan yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*).

C. Definisi operasional variabel

Pertama, bunga telang (*Clitoria ternatea*) yang dipilih adalah bunga yang utuh dan tidak mengalami kerusakan, berwarna warna biru cerah yang masih segar dipetik langsung di Mojosongo, Kota Surakarta.

Kedua, biji pinang (*Areca catechu*) yang dipilih adalah biji pinang yang sudah tua dengan ciri kulit luar berwarna kuning, warna biji pinang coklat, tekstur biji pinang tua lebih keras dibanding yang muda, kandungan serat lebih banyak sehingga lebih susah dikunyah dan rasa pinang tua cenderung lebih pahit, didapatkan dari Kec. Trowulan, Kabupaten Mojokerto.

Ketiga, bunga telang segar dan biji pinang yang telah dipisahkan dari kulitnya. Sampel sudah melewati proses sortasi basah untuk memisahkan kotoran dengan sampel, kemudian dilakukan pengeringan dalam oven pada suhu 50°C selama 4 jam untuk bunga telang dan pengeringan dalam oven pada suhu 80°C selama 72 jam untuk pinang. Penyerbukan menggunakan blender dan dilakukan pengayakan menggunakan mesh nomor 40.

Keempat, adalah pengujian susut pengeringan dan uji skrining fitokimia pada serbuk bunga telang dan biji pinang yang dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia pada serbuk simplisia.

Kelima, akan diperoleh hasil ekstrak dari bunga telang kering dan biji pinang kering didapatkan dari metode maserasi dengan pelarut yang digunakan adalah etanol 70%, setelah itu setelah itu akan didapatkan hasil ekstrak yang kental melalui proses pemekatan dengan menggunakan alat *rotary evaporator*.

Keenam, adalah pengujian skrining fitokimia ekstrak dan penghitungan rendemen bertujuan untuk pengetahui rendemen dan kandungan kimia pada masing-masing ekstrak.

Ketujuh, kombinasi ekstrak bunga telang dan biji pinang ditetapkan dengan konsentrasi jumlah bobot hasil maserasi tiap ekstrak perbandingan beragam yaitu 1:3, 1:1 dan 3:1.

Kedelapan, kadar gula darah merupakan kandungan gula darah yang diperoleh melalui vena pada ekor mencit (*Mus musculus*) yang dimana kadar dari gula darah tersebut akan ditentukan menggunakan alat *Glucometer Easy Touch (GCU)*.

Kesembilan, hewan uji adalah mencit (*Mus musculus*) yang berumur 2 hingga 3 bulan dengan jenis kelamin jantan dengan bobot 20 gram hingga 30 gram.

Kesepuluh, metode uji aloksan adalah metode pengujian menggunakan aloksan dosis 210 mg/KgBB dengan mekanisme merusak sel β pankreas tempat dimana insulin diproduksi, akibatnya terjadilah peningkatan kadar glukosa dalam darah karena produksi insulin dalam tubuh menurun. Pada hari ke-4 setelah pemberian induksi kemudian dilakukan pengukuran kadar gula darah mencit dengan glukometer sebagai nilai (T1). Mencit dinyatakan hiperglikemia jika kadar gula darahnya mencapai >126 mg/dL.

Kesebelas, parameter uji yang digunakan adalah tingkat gula darah sebelum dan sesudah perlakuan serta penurunan BB setelah induksi aloksan dan penaikan BB setelah diberikan perlakuan dosis tunggal ekstrak bunga telang dan biji pinang maupun dosis kombinasi.

D. Alat, Bahan, dan Hewan Uji

1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu nampak, oven, lap, stopwatch, alat timbang, sudip, sendok, corong, bejana maserasi, penangas air, ayakan nomor 40, blender, pisau, kertas saring, kain flanel, batang pengaduk, erlenmeyer, mortir dan stamfer, gelas, kandang mencit, pipet mikro, pipet tetes, timbangan elektronik, cawan porselein, sonde oral, spuit injeksi, *Beaker glass*, *vacum rotary evaporator*, *glucometer easy touch*, *glucose strip test*, gelas ukur, *moustur balance*, tabung reaksi, dan rak tabung, spatel.

2. Bahan

Adapun bahan-bahan yang akan digunakan yaitu bunga telang (*Clitoria ternatea*) dan biji pinang (*Areca catechu*), etanol 70%, preaksi Meyer, Bouchard, Dgragendorf, HCl2N, NaOH, Mg stearate, FeCl₃,

CHCl₃, H₂SO₄, hewan uji, pakan dan minum hewan uji, aloksan monohidrat, Na CMC 0,5%, glibenklamid 5 mg, akuades.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) putih jantan, berumur 2-3 bulan dengan berat 20-30 gram. Penelitian ini menggunakan 40 ekor mencit yang dibagi menjadi 8 kelompok, terdiri dari 5 ekor mencit dari tiap kelompoknya.

E. Jalannya Penelitian

1. Pengajuan surat izin penggunaan laboratorium

Penyusunan dan pengajuan surat izin laboratorium diberikan kepada kepala laboran pada laboratorium bahan alam dan laboratorium farmakologi dipergunakan untuk mendapatkan perizinan penggunaan laboratorium. Kegiatan yang dilakukan pada laboratorium yaitu pelaksanaan proses ekstraksi, pengujian dan pemantauan untuk mendapatkan hasil dari pengujian yang akan dilakukan. Pembuatan ekstraksi dari tanaman yang digunakan diperkirakan akan membutuhkan waktu selama kurang lebih 14 hari, dan untuk melakukan pengujian serta pemantauan membutuhkan waktu kurang lebih 22 hari.

2. Determinasi tanaman

Determinasi merupakan proses yang dilakukan untuk mengetahui keaslian bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dan biji pinang (*Areca catechu* L.). Pengamatan dilakukan terhadap ciri-ciri morfologis tanaman, diantaranya akar, batang dan daun. Determinasi dilakukan di Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Obat Dan Obat Tradisional Tawangmangu.

3. Pengeringan dan pembuatan serbuk

3.1 Serbuk bunga telang. Bunga telang terpilih melalui proses penyortiran basah, cucilah dengan air mengalir untuk menghilangkan noda atau kotoran yang mungkin menempel. Bunga telang dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C selama 4 jam sehingga menghasilkan tekstur yang kering dan rapuh jika disentuh. Bunga telang yang sudah kering dilakukan penyerbukan menggunakan blender. Serbuk yang telah didapatkan diayak menggunakan mesh nomor 40, kemudian ditimbang dan disimpan pada wadah yang tertutup rapat.

3.2 Serbuk biji pinang. Buah pinang tua yang sudah dipetik, akan dilakukan pembelahan untuk memisahkan antara kulit antara kulit

dan biji pinang. Biji pinang yang telah dipisahkan akan melalui proses penyortiran basah, yaitu mencucinya dengan air mengalir untuk menghilangkan noda atau kotoran yang mungkin menempel pada biji pinang tersebut. Biji pinang yang sudah bersih diiris dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 80°C selama 72 jam hingga berwarna coklat. Pinang yang sudah kering dilakukan penyerbukan menggunakan blender. Serbuk yang telah didapatkan diayak menggunakan mesh nomor 40, kemudian di timbang dan di simpan pada wadah yang tertutup rapat.

4. Pembuatan ekstrak.

Ekstraksi serbuk bunga telang (*Clitoria ternatea*) dan biji pinang (*Areca catechu*), dilakukan menggunakan metode maserasi. Serbuk bunga telang ditimbang sebanyak 1 Kg dan serbuk biji pinang ditimbang sebanyak 1,5 Kg. Masing-masing serbuk kemudian dimasukkan ke dalam bejana dan dilarutkan dengan etanol 70% dengan perbandingan 1:10 yaitu sebanyak 10 liter untuk bunga telang dan sebanyak 15 liter untuk pinang hingga serbuk simplisia terendam agar dapat menyaring metabolit sekunder yang terdapat dalam serbuk simplisia. Perendaman dilakukan selama 5 hari, kemudian saring ekstrak menggunakan kertas saring dan kain flanel sehingga menghasilkan maserat I. Ulangi kembali proses perendaman terhadap sisa ampas pelarut etanol 70% sebanyak 5 liter untuk telang dan 7,5 liter untuk biji pinang selama 3 hari sehingga akan diperoleh hasil maserat II, lalu diuapkan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental untuk di hitung rendemen dari hasil maserasi.

5. Uji susut pengeringan

Susut pengeringan merupakan penurunan berat suatu bahan setelah dikeringkan dengan proses tertentu. Kecuali disebutkan lain dalam setiap monografi, simplisia harus berbentuk bubuk dengan kehalusan 8 dan dikeringkan pada suhu 105°. Susut pengeringan dihitung dengan menimbang 2 gram pada piring tara. Ratakan bedak pada piring dan tunggu hingga alat berbunyi (Putri *et al.*, 2023).

6. Uji kadar air ekstrak

Kadar air ekstrak ditentukan untuk menentukan berapa banyak air yang ada dalam ekstrak. Metode uji gravimetri diterapkan dengan tiga ulangan. Metode ini dipilih karena tidak memerlukan agen pembanding dan merupakan metode yang paling mudah (Adawiyah, 2017). Timbang 10 gram ekstrak dalam kurs yang sudah diberi stempel.

Keringkan pada suhu 105° selama 5 jam sebelum ditimbang. Pengeringan dilanjutkan dan ditimbang hingga tercapai berat seragam. Penimbangan dilakukan dengan selang waktu satu jam hingga selisih dua penimbangan berturut-turut kurang dari 0,25 persen. Kadar air ekstrak ditentukan untuk menetapkan batas minimum kadar air yang termasuk dalam ekstrak yang diteliti, yang berfungsi sebagai parameter standar mutu ekstrak. Kadar air yang tinggi dapat menyebabkan berkembang biaknya bakteri sehingga mempengaruhi sediaan yang akan dibuat.

7. Skrining fitokimia

Uji kualitatif senyawa kimia yang terkandung dalam bunga telang dan biji pinang bertujuan untuk membuktikan kebenaran senyawa metabolit sekunder dalam sampel. Metode tabung Ketika ekstrak kasar dievaluasi dalam sistem biologis, penyaringan fitokimia dapat mengungkapkan jenis bahan kimia aktif yang menyebabkan efek berbahaya atau terapeutik (Shofi *et al.*, 2020).

7.1 Uji alkaloid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak etanol ditimbang, dilanjutkan dengan 1 mL asam klorida 2 N dan 9 mL air suling. Kombinasi tersebut kemudian dipanaskan dalam penangas air selama 2 menit sebelum didinginkan dan disaring. Ambil 0,5 mL filtrat dan tambahkan 2 tetes reagen Mayer. Akan muncul endapan putih atau kuning. Ulangi proses ini dengan reagen yang berbeda. Reagen *Dragendorf* menghasilkan endapan berwarna jingga kecoklatan, sedangkan pereaksi *Buchard* menghasilkan endapan berwarna coklat hingga kehitaman. Alkaloid positif jika sedimen atau kekeruhan muncul pada setidaknya dua dari tiga tes yang tercantum di atas (Sambode *et al.*, 2022).

7.2 Uji flavonoid. Sebanyak 200 mg sampel, kemudian serbuk atau ekstrak dengan 10 mL akuades dipanaskan selama 5 menit. Selanjutnya saring dan masukkan dalam tabung reaksi, tambahkan beberapa tetes HCL pekat, diikuti dengan 0,2 g bubuk Mg, lalu aduk rata. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau oranye (Sambode *et al.*, 2022).

7.3 Uji tanin. Sebanyak 0,5 g serbuk atau ekstrak ditimbang sebelum disaring dengan 10 mL akuades selama 15 menit. Filtratnya diencerkan dengan air suling hingga tidak berwarna. 2 mL larutan disiapkan, dan ditambahkan 1-2 tetes larutan reagen besi (III) klorida

10%. Larutan akan hijau kehitaman atau hitam menunjukkan adanya tanin (Sambode *et al.*, 2022).

7.4 Uji saponin. Sebuah tabung reaksi diisi dengan 0,5 g sampel serbuk atau ekstrak dan 10 mL air panas, kemudian disaring. Larutan atau filtrat dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan diaduk cepat selama 10 detik, jika terbentuk busa yang stabil di dalam tabung reaksi selama minimal 10 menit dengan tinggi busa 1-10 cm dan dengan penambahan sedikit saja tetes Asam Klorida (Sambode *et al.*, 2022).

7.5 Uji triterpenoid/steroid. Sebanyak 2 mL sampel serbuk atau ekstrak dicampur dengan 2 mL kloroform, dilanjutkan dengan 2 mL asam asetat anhidrat dan 2 mL asam sulfat murni melalui dinding tabung. Cincin hijau kebiruan menunjukkan adanya sterol, namun cincin kecoklatan atau ungu muncul pada antarmuka kedua pelarut, menunjukkan adanya triterpenoid (La *et al.*, 2021).

8. Pembuatan larutan uji

8.1 Larutan aloksan 1%. Larutkan 1 gram aloksan kedalam larutan fisiologis NaCl 0,9% sebanyak 100 mL, kemudian diinjeksikan kepada mencit dengan cara intraperitoneal dengan dosis 150 mg/KgBB.

8.2 Larutan CMC Na 0,5%. Timbang 500 mg CMC Na dan campurkan ke dalam akuades panas sebanyak 30 mL, selama 30 menit diaduk sampai terbentuk larutan koloidal dan tambahkan akuades hingga 1000 mL.

8.3 Pembuatan sediaan dosis tunggal bunga telang. Timbang ekstrak bunga telang 2 gram masukkan kedalam mortar. Tambahkan sedikit demi sedikit larutan CMC Na 0,5% panas sebanyak 30 mL aduk selama 30 menit hingga menjadi homogen dan terbentuk larutan koloidal, kemudian tambahkan akuades hingga 100 mL.

8.4 Pembuatan sediaan dosis tunggal biji pinang. Timbang ekstrak pinang 2 gram masukkan kedalam mortar. Tambahkan sedikit demi sedikit larutan CMC Na 0,5% panas sebanyak 30 mL aduk selama 30 menit hingga menjadi homogen dan terbentuk larutan koloidal, kemudian tambahkan akuades hingga 100 mL.

8.5 Glibenklamid. Larutan ini digunakan sebagai pembanding dari sediaan kombinasi ekstrak yang akan diujikan. Masukkan glibenklamid 5 mg ke dalam mortir lalu digerus. Tambahkan sedikit demi sedikit larutan CMC Na 0,5% panas sebanyak 30 mL aduk selama

30 menit hingga menjadi homogen dan terbentuk larutan koloidal, kemudian tambahkan akuades hingga 100 mL.

9. Perlakuan hewan uji

Mencit (*Mus musculus*) putih jantan adalah hewan yang akan digunakan dalam pengujian antihiperglikemik ini. Pemilihan mencit dilakukan 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 di aklimasikan selama seminggu. Penimbangan bobot mencit dilakukan agar tidak adanya bobot yang kurang atau lebih dari target yang telah ditentukan, hewan uji akan dikelompokkan menjadi 8 kelompok yaitu: kelompok normal, kelompok kontrol positif, kontrol negatif, dan 3 kelompok yang akan diberikan ekstrak kombinasi dan 2 kelompok pemberian dosis tunggal. Mencit (*Mus musculus*) putih jantan akan dipuaskan selama 12 jam sebelum perlakuan untuk diambil sampel darah. Pengambilan darah dilakukan dengan jarum yang akan dimasukkan pada bagian vena ekor mencit. Sampel darah yang telah diperoleh akan digunakan untuk mengukur kadar gula darah waktu puasa menggunakan alat *easy touch* pada hari pertama atau sebelum perlakuan sediaan uji (T0). Setiap kelompok akan diinduksikan aloksan secara intraperitoneal untuk mendapatkan keadaan mencit yang sedang hiperglikemia, lalu dilakukan pemberian sediaan uji sesuai variasi dosis yang telah ditentukan. Pengukuran kadar gula darah kembali dilakukan pada hari ke-4 untuk mendapatkan nilai dari (T1), hari ke-11 (T2), hari ke-18 (T3) dan hari ke-21(T4). Mencit akan di timbang berat badannya setiap pengukuran kadar gula darah untuk mengetahui apakah ada penurunan atau kenaikan baik gula darah maupun berat badannya.

10. Pengujian aktivitas antihiperglikemia

Penelitian ini menggunakan 40 ekor mencit yang dibagi menjadi 8 kelompok, terdiri dari 5 ekor mencit dari tiap kelompoknya. Dosis acuan ekstrak bunga telang berdasarkan Adil *et al.*, (2020) dan dosis ekstrak pinang berdasarkan Ludong *et al.*, (2019) yaitu masing-masing dosis efektif 400 mg/KgBB untuk tikus kemudian dikonversikan dengan dosis mencit seperti berikut :

Kelompok I : kelompok normal/tidak diberikan perlakuan.

Kelompok II : kontrol negatif yang diinduksikan aloksan dan diberi larutan CMC 0,5%.

Kelompok III : kontrol positif yang diinduksikan aloksan dan diberi larutan glibenklamid dosis 0,65 mg/KgBB mencit.

Kelompok IV : diinduksikan aloksan dan larutan ekstrak telang dengan dosis 560 mg/KgBB mencit.

Kelompok V : Diinduksikan aloksan dan diberi larutan ekstrak pinang dosis 560 mg/KgBB mencit.

Kelompok VI : Diinduksikan aloksan dan diberi larutan kombinasi ekstrak bunga telang dengan dosis 140 mg/KgBB dan pinang 420 mg/KgBB.

Kelompok VII: Diinduksikan aloksan dan diberi larutan kombinasi ekstrak telang dengan dosis 420 mg/KgBB dan pinang 140 mg/KgBB.

Kelompok VIII : Diinduksikan aloksan dan diberi larutan kombinasi ekstrak bunga telang dengan dosis 280 mg/KgBB mencit dan pinang 280 mg/KgBB mencit.

11. Pengukuran berat badan

Pada penelitian ini, berat badan mencit dinilai pada hari pertama sebelum diinduksi aloksan, kemudian sebelum diambil darah untuk diperiksa kadar glukosa darahnya.

12. Pengukuran kadar glukosa darah mencit

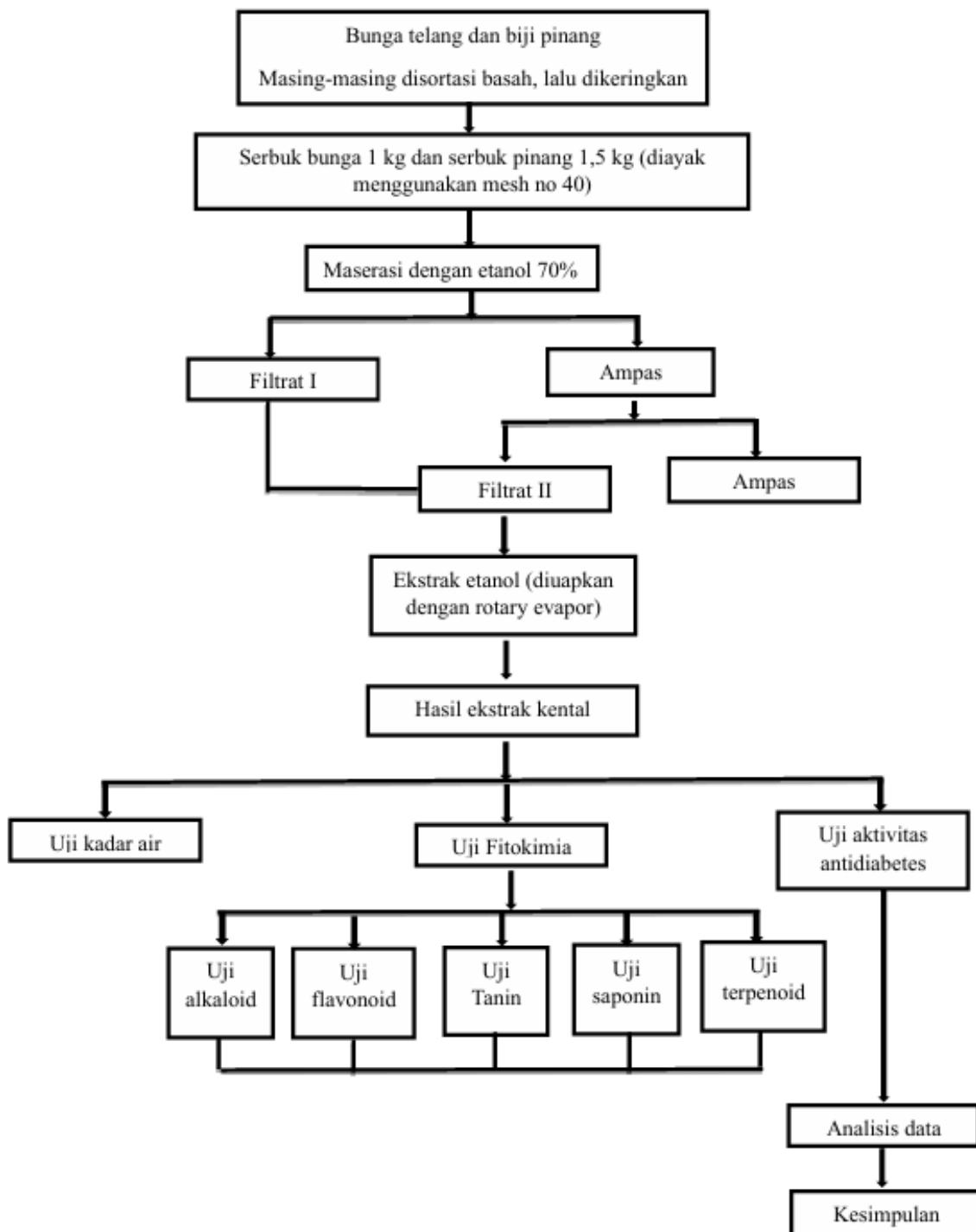
Glukometer digunakan untuk memantau kadar gula darah mencit. Metode ini digunakan untuk menilai kadar glukosa darah mencit dengan mengambil darah dari ujung ekornya pada hari keempat, kesebelas, kedelapan belas dan kedua puluh satu. Darah diambil ke dalam tabung kapiler pada hari ke-1 (T0) untuk menilai kadar glukosa darah awal, dan dilakukan pengukuran pada hari ke-4 (T1) untuk mengetahui status mencit yang telah mendapat induksi aloksan. Pemeriksaan glukosa darah pada hari ke-11 (T2), 18 (T3), dan 21 (T4) dimaksudkan untuk mengevaluasi penurunan kadar glukosa darah yang terbaik setelah pemberian kombinasi ekstrak bunga telang dan pinang dengan variasi dosis dan perbandingan kontrol obat. Data yang diperoleh secara statistik antara setelah perlakuan dari ekstrak kombinasi bunga telang dan pinang dengan pembanding obat yaitu glibenklamid.

F. Analisis Data

Penelitian ini menemukan adanya penurunan kadar gula darah pada mencit putih jantan hiperglikemik. Uji *Shapiro-Wilk* menguji apakah data terdistribusi normal. Data normal ditandai dengan $p > 0,05$. Jika data tidak berdistribusi normal maka dilakukan pengujian nonparametrik. Jika data berdistribusi normal maka dilakukan uji homogenitas untuk memastikan variansnya merata. Data dianggap homogen jika $p > 0,05$, begitu pula sebaliknya. Data berdistribusi normal dan homogen, sehingga peneliti menggunakan uji parametrik *One Way Anova* untuk melihat apakah terdapat perubahan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Uji *post hoc Tukey* dilakukan untuk membandingkan kelompok perlakuan dengan tingkat signifikansi $<0,05$.

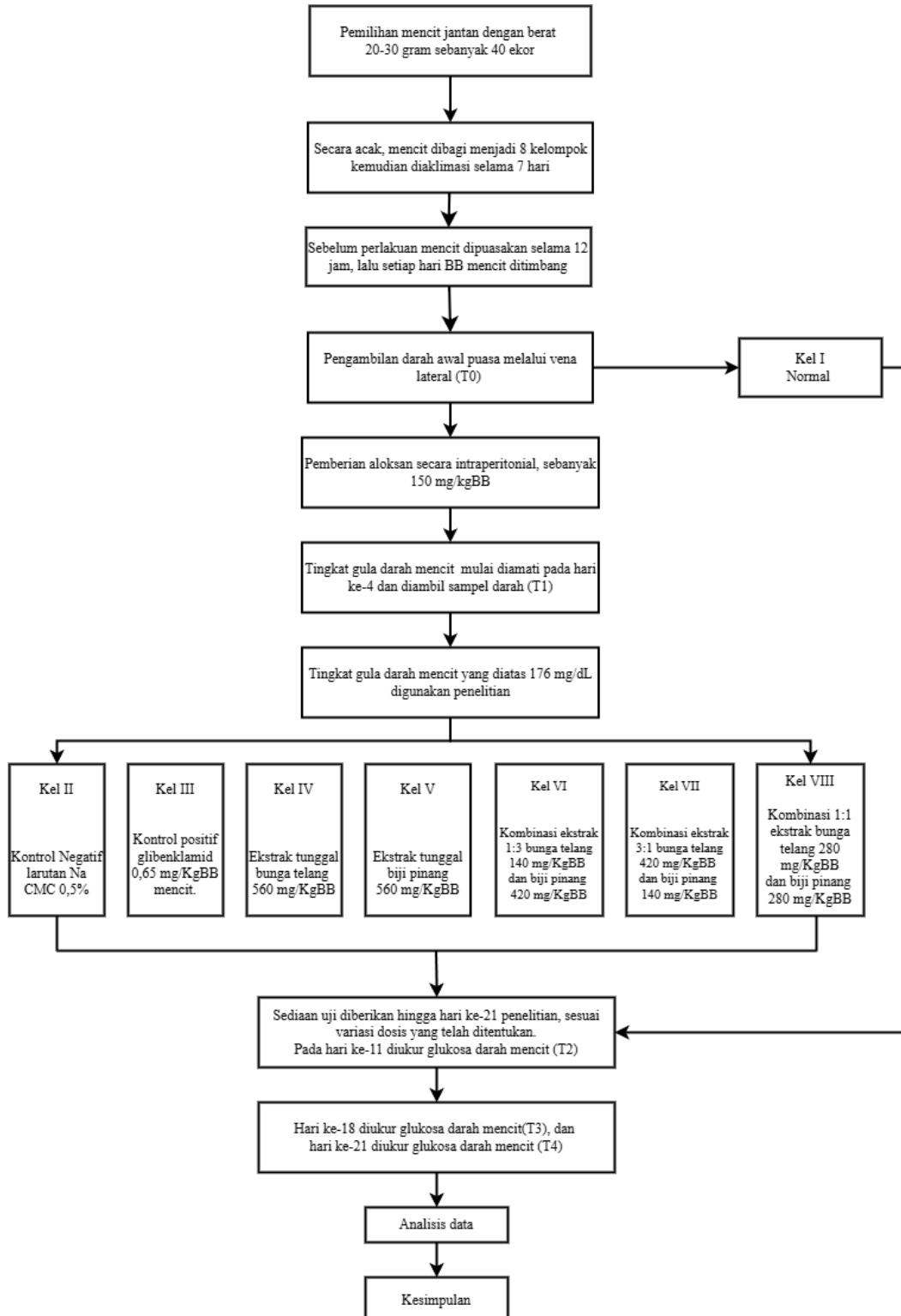
G. Skema Penelitian

1. Ekstraksi maserasi bunga telang dan pinang



Gambar 7. Ekstraksi maserasi bunga telang dan pinang.

H. Perlakuan hewan uji



Gambar 8. Skema pengujian antidiabetes.