

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang diperoleh di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan tanaman dari jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), yang diambil adalah bagian daunnya dengan ciri khas segar, hijau, utuh dan tidak mengalami kerusakan.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah ekstrak etanol dari daun jeruk nipis dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan pelarut air, *n*-heksana, dan etil asetat.

Variabel kedua adalah aktivitas antihiperglikemik dari fraksi air, *n*-heksana dan etil asetat ekstrak etanol daun jeruk nipis terhadap penurunan kadar glukosa darah pada tikus putih jantan yang diinduksi aloksan.

2. Klasifikasi variabel utama

Setelah tahap identifikasi yang ditetapkan, maka dapat dibagi menjadi kelompok variabel bebas, variabel tergantung, dan terkendali.

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas adalah variabel yang dimanipulasi untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol daun jeruk nipis dan fraksi yang terdiri dari fraksi air, fraksi *n*-heksana, dan fraksi etil asetat, yang masing-masing diberikan dengan dosis yang setara dengan dosis ekstrak.

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung adalah variabel yang menjadi fokus utama dari penelitian, yaitu penurunan kadar glukosa darah pada tikus putih jantan yang telah diinduksi aloksan. Penurunan kadar glukosa ini diukur secara berkala pada hari ke-0 (sebelum perlakuan), hari ke-3, hari ke-7, 14, 21, dan hari ke-28 (setelah perlakuan)

2.3 Variabel terkendali. Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi hasil dari variabel tergantung, sehingga harus dibuat tetap atau dinetralisir agar hasil penelitian tidak menyimpang dan dapat

diulang oleh peneliti lain dengan hasil yang dapat dibandingkan. Variabel terkontrol dalam penelitian ini mencakup spesies dan jenis kelamin hewan uji, berat badan, usia, kondisi laboratorium, jenis pakan dan minuman hewan uji, serta kondisi penelitian.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang diambil dalam kondisi segar, berwarna hijau, utuh dan tidak mengalami kerusakan yang langsung dipetik di Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun jeruk nipis adalah hasil pengeringan dari daun jeruk nipis yang kemudian digiling dan diayak menggunakan ayakan nomor 40 mesh untuk memperoleh ukuran seragam sebelum dilakukan ekstraksi.

Ketiga, ekstrak etanol daun jeruk nipis adalah hasil maserasi serbuk kering daun jeruk nipis dengan menggunakan pelarut etanol 96%, yang kemudian diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dan dikentalkan dengan *waterbath* pada suhu 60°C hingga menjadi ekstrak kental.

Keempat, fraksi ekstrak daun jeruk nipis adalah hasil fraksinasi dari ekstrak etanol daun jeruk nipis dengan menggunakan pelarut air, *n*-heksana, dan etil asetat yang masing-masing diberikan secara oral pada tikus uji dengan dosis yang setara dengan dosis ekstrak selama 28 hari.

Kelima, aktivitas antihiperglikemia adalah kemampuan fraksi ekstrak daun jeruk nipis pada dosis setara dengan dosis ekstrak daun jeruk nipis dalam menurunkan kadar glukosa darah tikus putih jantan yang sebelumnya diinduksi aloksan dengan pengukuran kadar glukosa darah setelah perlakuan pada hari ke 3, 7, 14, 21, dan 28 menggunakan alat glukometer.

Kedelapan, kadar glukosa darah (mg/dL) adalah kadar glukosa darah tikus putih jantan yang diperoleh dari hasil pengukuran menggunakan *glukometer*.

Kesembilan, tikus putih jantan adalah tikus putih jantan galur wistar dengan usia tikus 2-3 bulan dengan berat badan tikus 180-200 gram.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Ayakan berukuran 40 grit, blender, wadah maserasi, gelas ukur, kain flanel, *rotary vacuum evaporator*, penangas air, kandang tikus,

botol minum tikus, wadah makanan tikus, glukometer, strip uji glukosa, jarum suntik, tabung reaksi, jarum suntik oral, timbangan analitik, dan timbangan gram termasuk di antara alat yang digunakan.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi daun jeruk nipis, aloksan, air suling, asam klorida, besi (III) klorida, Dragendorf LP, etanol absolut 96%, glibenklamid, Liebermann Burchard, bubuk magnesium, Na CMC, natrium hidroksida, kloroform, natrium klorida, hewan percobaan, serta pakan dan minuman standar.

D. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan *Ethical Clearance*

Ethical Clearance adalah dokumentasi tertulis yang bertujuan untuk memperbaiki standar etika dalam pemanfaatan serta melindungi hewan uji dari perlakuan yang tidak memanusiawi yang dilakukan oleh penelitian. Pembuatan *Ethical Clearance* dilakukan di RSUD Dr. Moewardi, Surakarta.

2. Determinasi Tanaman

Daun jeruk nipis digunakan sebagai sampel. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan keabsahan dan keaslian tanaman jeruk nipis yang digunakan sebagai sampel penelitian. Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi di Surakarta menjadi tempat pelaksanaan prosedur penentuan tersebut.

3. Pengambilan dan Pembuatan Simplisia

Daun jeruk nipis yang telah dipanen dilakukan sortasi basah yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran pada daun, kemudian dibersihkan dengan air mengalir. Daun jeruk nipis kemudian dipanggang atau dikeringkan pada suhu 40°C hingga benar-benar kering. Serbuk daun jeruk nipis yang dibutuhkan kemudian dibuat dengan menghaluskan daun jeruk nipis kering dan menyaringnya melalui ayakan 40 mesh.

$$\text{Rendemen serbuk (\%)} = \frac{\text{Bobot serbuk}}{\text{Bobot kering}} \times 100\%$$

4. Pengujian Susut Pengeringan Serbuk

Susut pengeringan adalah penentuan berat suatu bahan setelah pengeringan. Simplisia yang digunakan untuk susut pengeringan berbentuk serbuk dengan kehalusan 8 dan suhu pengeringan 105°C, kecuali dinyatakan lain dalam monografi. Pengujian dilakukan

penimbangan 1 sampai 2 gram simplisia ke dalam botol timbang dangkal bertutup yang telah dipanaskan pada suhu penetapan dan ditara. Meratakan bahan dengan cara mengocokkan botol hingga lapisannya lebih tebal sekitar 5 hingga 10 mm dan kemudian masukkan ke dalam pengering sampai kering pada suhu penetapan hingga botol konstan. Setelah itu botol kemudian dinginkan hingga suhu ruang menggunakan desikator. Syarat umum susut pengeringan untuk simplisia yaitu tidak lebih dari 10% (Kemenkes RI, 2017).

5. Penetapan Kadar Air Serbuk Daun Jeruk Nipis

Penetapan kadar air serbuk dengan menggunakan metode destilasi, dengan menimbang 20 gram serbuk, kemudian masukkan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan toluen yang sudah dijenuhkan hingga seluruh simplisia terendam. Alat destilasi *Bidwell-Sterling* kemudian dipasang dan pemanasan dilakukan sehingga tidak lagi terjadi penetasan air. Volume air yang terkumpul dibaca melalui skala pada tabung *Receiver*, selanjutnya dinyatakan dalam bentuk persen sebagai kadar air dalam sampel. Perhitungan kadar air dilakukan dengan rumus sebagai berikut.

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{\text{Volume air}}{\text{Bobot sampel}} \times 100\%$$

6. Pembuatan Ekstrak Daun Jeruk Nipis

Pembuatan ekstrak dengan menggunakan metode maserasi, buatlah ekstrak daun jeruk nipis dengan perbandingan 1:10. Bubuk simplisia ditimbang sebanyak 1000 gram, kemudian ditambahkan 10 liter pelarut etanol 96% ke dalam bejana maserasi. Bejana ditutup, dijauhkan dari cahaya selama 6 jam, kemudian diaduk sesekali selama 18 jam sebelum disaring melalui kain flanel. Proses maserat sebanyak 2 kali dengan menggunakan pelarut setengah dari penyaringan awal, selanjutnya dievaporasi atau memisahkan larutan menggunakan *Rotary Vacuum Evaporator* pada suhu 40°C dan dilanjutkan dengan pengentalan yang dilakukan sehingga memperoleh ekstrak kental.

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental}}{\text{Bobot serbuk}} \times 100\%$$

7. Penetapan Kadar Air Ekstrak Daun Jeruk Nipis

Penetapan kadar air serbuk dengan menggunakan metode destilasi, dengan menimbang 20 gram ekstrak, kemudian masukkan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan toluen yang sudah dijenuhkan hingga seluruh simplisia terendam. Alat destilasi *Bidwell-Sterling* kemudian dipasang dan pemanasan dilakukan sehingga tidak lagi

terjadi penetesan air. Volume air yang terkumpul dibaca melalui skala pada tabung *Receiver*, selanjutnya dinyatakan dalam bentuk persen sebagai kadar air dalam sampel. Perhitungan kadar air dilakukan dengan rumus sebagai berikut.

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{\text{Volume air}}{\text{Bobot sampel}} \times 100\%$$

8. Pembuatan Fraksi Dari Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis

Fraksinasi dilakukan menggunakan teknik ekstraksi cair-cair. Ditimbang 10 g ekstrak daun jeruk nipis dilarutkan dengan menggunakan etanol 96% sebanyak 10 ml, 65 ml aquades dimasukkan ke dalam corong terpisah dan menambahkan 75 mL *n*-heksana, kemudian dipartisi sampai 15 kali. Fase *n*-heksana terkonsentrasi dengan penguapan evaporator pada suhu 50°C. Hasilnya ditimbang dan bagian ini disebut fraksi *n*-heksana. Residu yang diperoleh dari partisi *n*-heksana dimasukkan ke dalam corong pemisahan, ditambah 75 mL etil asetat, kemudian dipartisi dalam fase etil asetat sampai 15 kali. Fase etil asetat dipekatkan dengan perangkat penguapan pada suhu 50° C. Hasilnya ditimbang dan bagian ini disebut bagian dari etil asetat. Residu yang diperoleh dari partisi etil asetat terkonsentrasi dengan tangki air pada suhu 50°C. Hasilnya ditimbang dan bagian ini disebut fraksi air (Mulangsri *et al.*, 2019).

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat Fraksi}}{\text{Bobot ekstrak daun jeruk nipis}} \times 100\%$$

9. Identifikasi Kandungan

9.1 Identifikasi Flavonoid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan HCl pekat, serbuk Mg, dan 1 ml amil alkohol. Gojog kuat dan biarkan larutan mengalami pemisahan. Hasil positif mengandung flavonoid menunjukkan dengan terbentuknya warna kuning, merah atau jingga pada lapisan amil alkohol (Ergina *et al.*, 2014)

9.2 Identifikasi Saponin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml air panas dan dikocok kuat 10 detik. Hasil positif saponin menunjukkan oleh pembentukan busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit (Kemenkes, 2017).

9.3 Identifikasi Alkaloid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan amonia dan kloroform kembali. Setelah disaring, filtrat ditambahkan asam sulfat 2N dan dikocok hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan kemudian diuji

menggunakan pereaksi Mayer, Dragendorff, dan Wagner. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan: putih (Mayer), merah jingga (Dragendorff), dan coklat (Wagner), yang menandakan adanya kandungan alkaloid (Sangi *et al.*, 2008)

9.4 Identifikasi Steroid dan Terpenoid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 20 ml kloroform dan diletakkan di dalam tabung reaksi yang kering, kemudian tambahkan reagen Lieberman Burchard (asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat). Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin berwarna jingga atau ungu yang menunjukkan adanya triterpenoid dan steroid dengan warna hijau kebiruan (Hasibuan *et al.*, 2020).

9.5 Identifikasi Fenolik. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan reagen FeCl_3 5%. Hasil positif fenolik menunjukkan terbentuknya warna kebiruan atau hijau kehitaman (Yumita *et al.*, 2024).

9.6 Identifikasi Tanin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian sebanyak 1 ml larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl_3 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau (Sangi *et al.*, 2008).

10. Uji Kromatografi Lapis Tipis

Pengujian KLT pada ekstrak dan fraksi dalam metode KLT yang digunakan dalam penelitian ini mengacu pada literatur dari Eskundari *et al.* (2024) yang menggunakan campuran fase gerak nonpolar-semipolar untuk identifikasi flavonoid. Fase gerak yang digunakan merupakan campuran *n*-heksana : etil asetat : asam formiat (6 : 4 : 0,1) sesuai metode yang dilaporkan dalam penelitian tersebut. Baku pembanding yang digunakan yaitu Rutin. Campuran fase gerak dimasukkan ke dalam chamber dan ditutup rapat hingga mencapai kondisi jenuh. Fase diam berupa plat KLT Silika gel 60 F diberi tanda garis awal pada jarak 1 cm dari bagian bawah dan batas atas pada jarak 0,5 cm. Larutan sampel ditotolkan pada garis awal dengan jarak yang teratur kemudian dikeringkan. Selanjutnya plat dimasukkan ke dalam chamber yang telah jenuh fase gerak untuk proses pengembangan hingga mencapai batas atas. Setelah pengembangan selesai, plat dikeluarkan dan dikeringkan. Deteksi menggunakan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, kemudian disemprot menggunakan reagen sitroborat LP dan dipanaskan pada suhu $\pm 100^\circ\text{C}$

selama 5–10 menit, kemudian dihitung nilai Rf bercak yang terbentuk (Eskundari *et al.*, 2024).

11. Pembuatan Larutan Stok Uji dan Dosis

11.1 Aloksan. Sebanyak 1,2 gram aloksan digunakan, kemudian ditambahkan menggunakan Na-CMC 0,5% pada volume 100 ml hingga memperoleh konsentrasi 1%.

11.2 Na-CMC 0,5%. Sebanyak 0,5 gram kemudian Na-CMC 0,5% ditambahkan dengan *aquadest* hangat 50 ml diaduk hingga terbentuk suspensi kental bening. Setelah itu, ditambahkan 50 ml *aquadest* hangat dan diaduk hingga larut dan homogen.

11.3 Glibenklamid. Tablet glibenklamid 5 mg kemudian ditambahkan dengan Na-CMC hingga 100ml.

11.4 Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis. Sebanyak 2000 mg ekstrak daun jeruk nipis, kemudian ditambahkan menggunakan Na-CMC hingga volume 100 ml.

11.5 Larutan Fraksi Air. Sebanyak 1200 mg fraksi air, kemudian ditambahkan Na-CMC 0,5 % pada volume 100 ml secara bertahap hingga homogen dan memperoleh konsentrasi 1%.

11.6 Larutan Fraksi *n*-Heksana. Sebanyak 266,8 mg fraksi *n*-heksana, kemudian ditambahkan dengan volume 100 ml Na-CMC 0,5% secara bertahap dan homogen.

11.7 Larutan Fraksi Etil Asetat. Sebanyak 266,8 mg fraksi etil asetat, kemudian ditambahkan ke dalam Na-CMC 0,5% pada volume 100 ml secara bertahap dan homogen.

12. Persiapan Hewan Uji

Tikus *Rattus norvegicus* merupakan hewan percobaan pada penelitian antihiperglikemik, Pada penelitian ini, 30 ekor tikus dengan berat 180–200 gram dan usia 2–3 bulan dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan: kelompok ekstrak, kelompok positif, kelompok negatif, dan 3 kelompok yang diberi fraksi air, fraksi *n*-heksana, dan fraksi etil asetat. Hewan uji diaklimatisasi selama tujuh hari sebelum perlakuan untuk memberi waktu bagi tikus menyesuaikan diri dengan lingkungannya.

13. Pengelompokan dan Prosedur Pengujian

Hewan uji yang digunakan yaitu tikus putih jantan dengan berat 180-200 gram dengan kondisi tikus sehat, Hewan uji diaklimatisasi selama 7 hari, kemudian dikelompokkan menjadi 6 kelompok yang terdiri dari 5 ekor tikus tiap setiap kelompok. Sebelum percobaan tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 12 jam (tetapi diberi minum). Pada

hari pertama dilakukan pengukuran kadar glukosa awal (T_0). Setiap kelompok diinduksi aloksan secara intraperitoneal dengan dosis 40 mg/kg BB.

Perlakuan sesuai kelompok selama 28 hari dengan pembagian kelompok perlakuan pengujian sebagai berikut :

Kelompok I : Kontrol negatif Na. CMC 0,5%

Kelompok II : Kontrol positif Glibenklamid 0,09 mg/200 g BB tikus

Kelompok III : Ekstrak etanol daun jeruk nipis dosis 250 mg/kgBB

Kelompok IV : Fraksi air dengan dosis 30 mg/200 g BB tikus

Kelompok V : Fraksi *n*-heksana dengan dosis 6,67 mg/200 g BB tikus

Kelompok VI : Fraksi etil asetat dengan dosis 6,67 mg/ 200 g BB tikus

Setelah pemberian tikus hiperglikemik pada masing-masing kelompok yang diberi aloksan, uji oral diberikan setiap hari dengan dosis yang telah ditentukan. Kadar glukosa darah ditentukan pada hari ketiga (T_1), ketujuh (T_2), keempat belas (T_3), kedua puluh satu (T_4), dan kedua puluh delapan (T_5). Gambar 5 menunjukkan rencana uji antihiperglikemik.

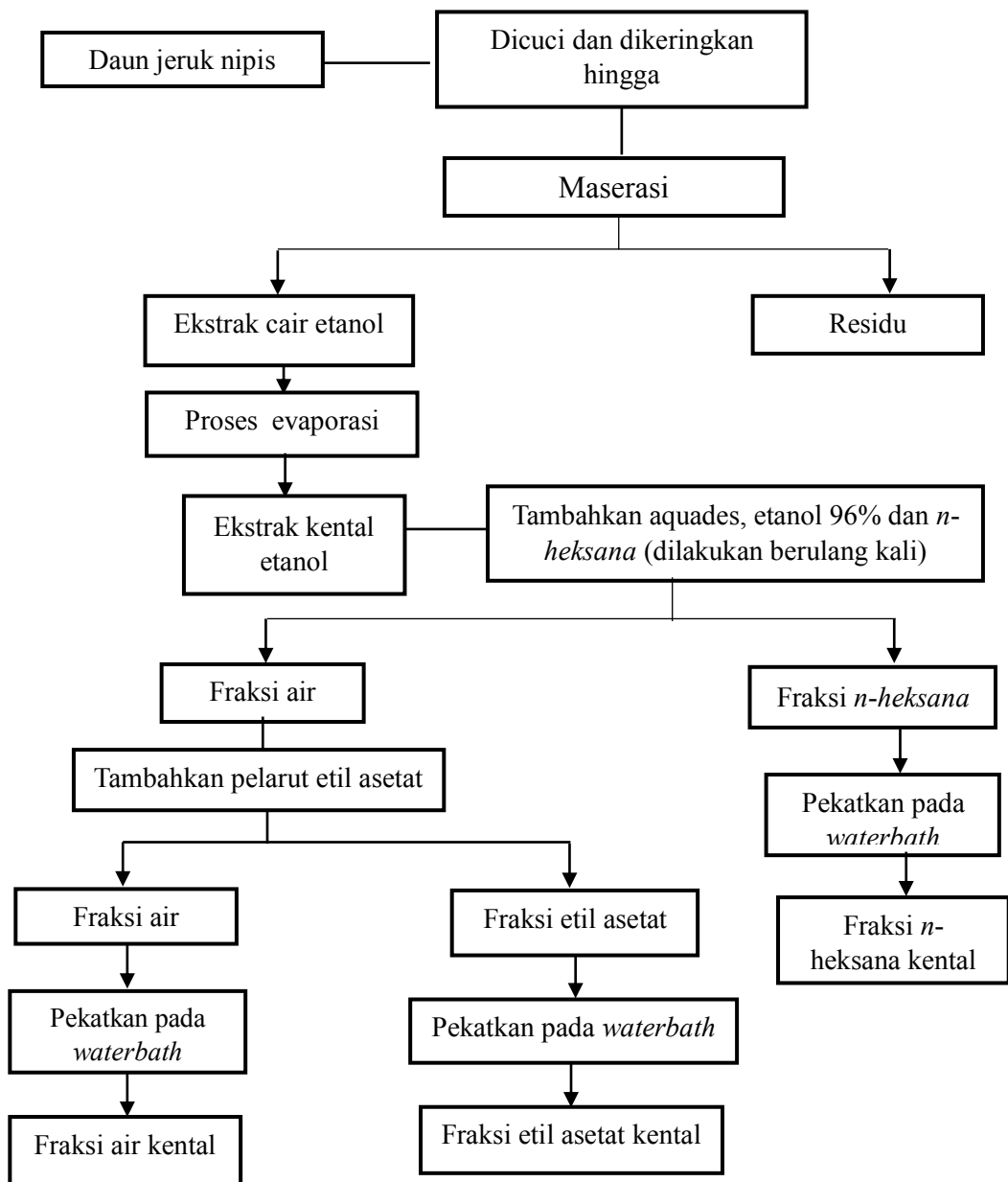
E. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini berupa penurunan kadar glukosa darah terhadap tikus putih jantan hiperglikemia. Uji *T-test Paired* digunakan untuk perbedaan kadar gula darah sebelum dan sesudah diinduksi. Uji *Shapiro-Wilk* digunakan untuk memastikan apakah data terdistribusi secara normal. Data dianggap normal jika $p > 0,05$ dan bila $p < 0,05$ maka data dianggap abnormal. Uji selanjutnya adalah uji homogenitas untuk mengetahui homogenitas varians. Jika $p > 0,05$, data memiliki varians homogen; jika $p < 0,05$, data dianggap tidak homogen. Hasil data berdistribusi normal dengan varians homogen dianalisis menggunakan uji parametrik (*ANOVA*), sedangkan metode nonparametrik digunakan untuk data dengan distribusi abnormal dan varians tidak homogen.

Data berdistribusi normal dengan varians homogen dianalisis menggunakan *ANOVA* satu arah untuk mengetahui apakah ada perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan. Jika $p > 0,05$, tidak ada perbedaan signifikan antara kelompok; jika $p < 0,05$, ada perbedaan signifikan antara kelompok. Uji *post-hoc Tukey HSD* juga digunakan untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang memiliki perbedaan signifikan paling kecil dengan mempertimbangkan kolom subset.

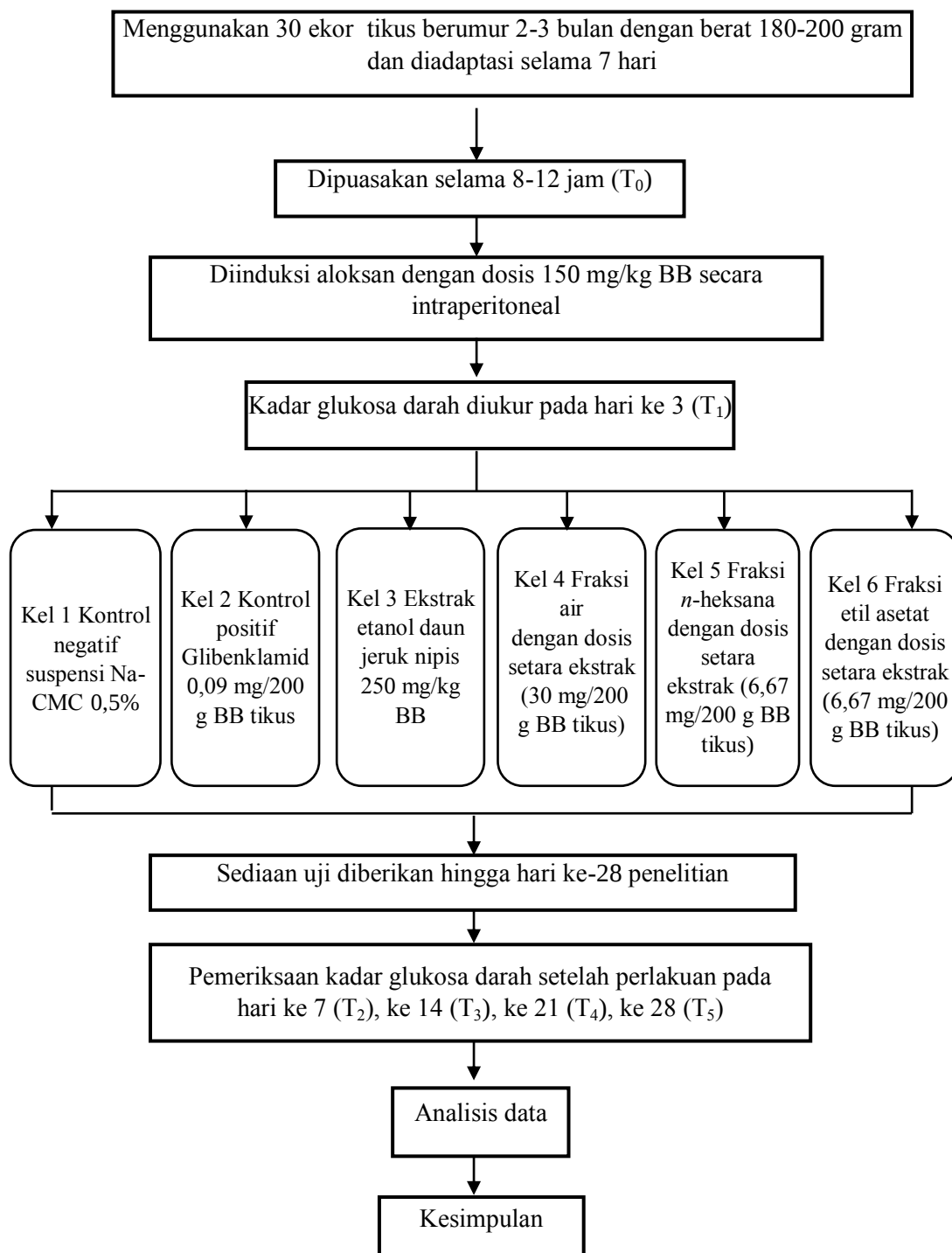
Data yang berdistribusi abnormal dan tidak menunjukkan varians homogen dianalisis menggunakan uji *Kruskal Wallis* untuk mengidentifikasi perbedaan antara kelompok. Uji *Mann-Whitney* kemudian digunakan untuk mengetahui apakah perbedaan antar kelompok signifikan.

F. Skema Penelitian



Gambar 4. Pembuatan Ekstrak Etanol dan Fraksinasi Daun Jeruk Nipis

G. Skema Pengujian Antihiperglikemik



Gambar 5. Skema Pengujian Antihiperglikemik