

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini memanfaatkan tumbuhan jati yang diperoleh di daerah Dusun Jati, Desa Malanggaten, Kec. Kebakkramat, Kab. Karanganyar.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan tumbuhan jati, yang diambil adalah daun jati muda yang segar, berwarna hijau muda, belum mengalami kerusakan fisik, dan kualitas yang bagus.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun jati yang diperoleh melalui proses maserasi serbuk daun jati menggunakan pelarut etanol 70%. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antihiperglikemik dari ekstrak etanol daun jati terhadap mencit putih jantan yang diinduksi diet tinggi fruktosa.

2. Klasifikasi variabel utama

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perlakuan yang diberikan kepada mencit, yaitu pemberian ekstrak etanol daun jati dengan berbagai dosis (150 mg/kgBB, 300 mg/kgBB, dan 600 mg/kgBB), serta pemberian metformin sebagai kontrol positif. Diet tinggi fruktosa diberikan pada semua kelompok kecuali kelompok kontrol normal.

2.2 Variabel terikat. Variabel terikat adalah kadar glukosa darah mencit putih jantan setelah perlakuan. Penurunan kadar glukosa darah digunakan sebagai indikator utama efektivitas antihiperglikemik dari ekstrak etanol daun jati.

2.3 Variabel terkendali. Variabel terkendali adalah faktor-faktor yang dijaga konstan selama penelitian, seperti spesies dan jenis kelamin hewan uji (mencit jantan), umur (2-3 bulan) dan berat badan mencit (20–30 gram), kondisi lingkungan laboratorium (suhu, kelembapan, pencahayaan), jenis pakan dan air minum, serta prosedur induksi diet tinggi fruktosa. Dengan menjaga variabel-variabel ini tetap, diharapkan hasil penelitian dapat diulang dan dibandingkan dengan penelitian lain yang serupa.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun jati adalah bagian daun tumbuhan jati yang digunakan sebagai bahan utama, dipetik dari tumbuhan sehat dan segar, kemudian dikeringkan dan digiling hingga menjadi serbuk.

Kedua, serbuk daun jati adalah hasil pengeringan dan penggilingan daun jati yang diayak untuk memperoleh ukuran seragam sebelum diekstraksi.

Ketiga, ekstrak etanol daun jati adalah hasil maserasi serbuk daun jati kering menggunakan etanol 70%, diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.

Keempat, aktivitas antihiperglikemik adalah kemampuan ekstrak daun jati dalam menurunkan kadar glukosa darah mencit putih jantan yang sebelumnya diinduksi diet tinggi fruktosa.

Kelima, penurunan kadar glukosa darah adalah selisih antara kadar glukosa darah awal (hari ke-0) dan kadar glukosa darah setelah perlakuan pada hari ke-7, 14 dan 21 diukur menggunakan glukometer.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi timbangan digital, nampan, pisau, blender, ayakan mesh nomor 40, kurs porselin, oven, bejana maserasi, corong, kertas saring, kain flanel, *rotary evaporator*, water bath, gelas beker, tabung reaksi beserta raknya, gelas ukur, pipet tetes, batang pengaduk, cawan petri, mortir dan stamper, alat Sterling–Bidwell, bunsen, sonde oral, kandang mencit lengkap dengan wadah pakan dan minum, glucometer Easy Touch beserta strip uji, spektrofotometer UV-Vis, labu tentukur, pipet volume, sonikator, dan vial.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jati (*Tectona grandis* L.), etanol 70%, metformin, fruktosa, natrium karboksimetil selulosa (Na-CMC), akuades, pakan standar mencit, strip glukosa darah, alkohol 70%, mencit jantan sebagai hewan uji, pereaksi *Dragendorff* dan *Mayer*, serbuk magnesium dan asam klorida pekat, larutan besi (III) klorida (FeCl_3), asam klorida 2 N, asam asetat anhidrat, dan asam sulfat pekat.

D. Jalanya Penelitian

1. *Ethical clearance* (EC)

Sesuai dengan ketentuan Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 2016 mengenai Komisi Etik Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Nasional, setiap penelitian di bidang kesehatan yang menggunakan subjek manusia maupun hewan percobaan diwajibkan mematuhi prinsip-prinsip etika. Penelitian ini diselenggarakan sebagai bagian dari upaya peningkatan mutu pelayanan kesehatan guna mendukung derajat kesehatan masyarakat. Persetujuan *Ethical Clearance* (EC) penelitian ini diperoleh melalui Komisi Etik RSUD Dr. Moewardi, Jebres, Kota Surakarta, Jawa Tengah.

2. Identifikasi tumbuhan jati

Pada penelitian ini, daun jati digunakan sebagai sampel. Penentuan identitas daun jati dilakukan untuk memastikan keaslian dan ketepatan spesies tanaman yang digunakan dalam penelitian. Proses identifikasi tersebut dilaksanakan di Universitas Setia Budi Surakarta.

3. Persiapan bahan

Daun jati diperoleh dari Dusun Jati, Desa Malangaten, Kec. Kebakkramat, Kab. Karanganyar. Daun jati yang diambil adalah daun yang masih segar, berwarna hijau muda dan terbebas dari hama. Daun jati dicuci bersih dengan tujuan untuk menghilangkan kotoran pada daun, selanjutnya dilakukan proses pengeringan dengan cara dijemur secara langsung dibawah sinar matahari setelah itu dimasukkan ke dalam oven pada suhu 40°C.

4. Pembuatan serbuk daun jati

Daun Jati (*Tectona grandis* L.) segar sebanyak 8 kg dicuci bersih dengan air mengalir, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruang selama 7 hari hingga kering. Daun kering dihaluskan menggunakan blender dan diayak dengan mesh 40 untuk mendapatkan serbuk halus yang homogen.

5. Pengujian susut pengeringan serbuk

Pengujian susut pengeringan menggunakan metode FHI untuk mengetahui kadar air dan senyawa mudah menguap yang hilang selama proses pengeringan, sehingga dapat memastikan kualitas dan kestabilan sampel serbuk. Pengujian dilakukan dengan menimbang 1-2g simplisia serbuk daun jati dalam kurs yang telah ditara sebelumnya. Serbuk diratakan hingga membentuk lapisan setebal $\pm 5-10$ mm, kemudian botol dimasukkan ke ruang pengering dengan tutup terbuka dan dikeringkan

pada suhu 105°C sampai bobot tetap. Setiap selesai pengeringan, botol ditutup, didinginkan dalam desikator hingga suhu ruang, lalu ditimbang kembali. Syarat susut pengeringan adalah tidak lebih dari 10%.

susut pengeringan

$$= \frac{\text{bobot serbuk awal} - \text{bobot serbuk akhir}}{\text{bobot serbuk awal}} \times 100\%$$

6. Pembuatan ekstrak etanol daun jati

Serbuk daun jati sebanyak 500g dimaserasi dengan etanol 70% 1:10 (b/v) selama 2×24 jam pada suhu ruang dengan pengadukan sesekali. Maserat disaring dan filtrat dikumpulkan. Proses maserasi diulang 2 kali dengan pelarut yang baru, masing-masing setengah dari volume pelarut pertama. Filtrat gabungan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental. Rendemen dihitung sebagai persentase bobot ekstrak terhadap bobot serbuk simplisia. Syarat rendemen ekstrak daun jati adalah tidak kurang dari 16,9%.

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

7. Pengujian kadar air ekstrak

Pengujian kadar air pada ekstrak ditentukan menggunakan metode destilasi toluen, sesuai prosedur penetapan kadar air untuk bahan yang tidak tahan pemanasan langsung. Proses diawali dengan menimbang sejumlah ekstrak ke dalam labu destilasi yang telah diketahui bobotnya. Ekstrak kemudian dicampur dengan pelarut toluen dalam jumlah yang sesuai untuk memastikan proses ko-destilasi berlangsung optimal. Campuran tersebut selanjutnya dipanaskan sehingga air yang terkandung dalam sampel ikut terdorong oleh uap toluena, naik menuju kondensor, dan terpisah dalam tabung penerima (*receiving tube*). Air yang terdestilasi kemudian mengumpul pada bagian bawah tabung karena densitasnya lebih tinggi dibandingkan toluena. Volume air yang tertampung dalam tabung penerima setelah proses destilasi selesai digunakan sebagai dasar perhitungan kadar air dalam ekstrak. Tahap ini dilakukan hingga tidak ada lagi penambahan volume air yang terukur untuk memastikan seluruh air telah terdestilasi sempurna. Kadar air ekstrak dihitung berdasarkan volume air yang diperoleh dibandingkan dengan massa sampel awal. Persyaratan kadar air ekstrak daun jati adalah tidak melebihi 8,6%. Rumus perhitungan

kadar air dengan metode destilasi toluen dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{\text{Volume air hasil destilasi (mL)}}{\text{Bobot sampel awal}} \times 100\%$$

8. Skrining fitokimia

8.1 Flavonoid. Ekstrak dipanaskan bersama bubuk magnesium dan beberapa tetes asam klorida pekat. Perubahan warna menjadi merah atau jingga mengindikasikan keberadaan flavonoid.

8.2 Tanin. Mencampurkan ekstrak dengan larutan FeCl_3 5%. Munculnya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin.

8.3 Saponin. Mengocok ekstrak sebanyak 5 mL. Terbentuknya busa stabil setinggi 1–3 cm penambahan HCl 2N busa tidak hilang yang bertahan selama 15 menit menandakan kandungan saponin.

8.4 Alkaloid. Sebanyak 2 mL ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 1–2 tetes reagen Wagner. Terbentuknya endapan berwarna merah kecoklatan menandakan keberadaan alkaloid.

8.5 Terpenoid dan steroid. Mencampurkan ekstrak dengan asam asetat glasial, lalu menambahkan beberapa tetes asam sulfat pekat. Warna coklat kemerahan menunjukkan senyawa terpenoid, sedangkan warna biru kehijauan menandakan adanya steroid.

9. Penetapan kadar flavonoid total

9.1 Pembuatan larutan baku induk kuersetin 100 ppm. Konsentrasi 100 ppm dibuat dengan cara menimbang 10 mg kuersetin lalu dilarutkan dalam 100 mL etanol pa ke dalam labu tentukur.

9.2 Pembuatan kurva baku kuersetin. Larutan standar induk kuersetin 100 ppm dipipet sebanyak 3 mL dalam labu takar 10 mL, 2 mL dalam labu takar 5 mL, 5 mL dalam labu takar 10 mL, 3 mL dalam labu takar 5 mL, dan 5 mL dalam labu takar 5 mL kemudian ditambahkan etanol pa untuk mendapatkan konsentrasi 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, dan 100 ppm.

9.3 Penentuan *operating time*. Sebanyak 0,5 mL larutan kuersetin 40 ppm dipipet, kemudian ditambahkan 0,1 mL larutan AlCl_3 10%, 1,5 mL etanol pa, 0,1 mL natrium asetat, serta 2,8 mL aquadest. Pengukuran serapan dilakukan pada panjang gelombang teoritis kuersetin, dengan pemantauan kestabilan nilai absorbansi untuk memastikan kondisi pengukuran yang optimum

9.4 Penentuan panjang gelombang maksimum. Sebanyak 0,5 mL larutan kuersetin 40 ppm dicampurkan dengan 0,1 mL AlCl_3 10%, 1,5 mL etanol pa, 0,1 mL natrium asetat serta 2,8 mL aquadest., kemudian dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400-450 nm.

9.5 Penetapan kadar flavonoid total. Penetapan kadar flavonoid total dilakukan menggunakan metode Chang dengan kuersetin sebagai standar pembanding. Kuersetin dipilih sebagai standar kurva kalibrasi dalam penetapan flavonoid total karena secara struktural representatif terhadap mayoritas flavonoid golongan flavonol dan flavon, serta memberikan reaksi warna yang stabil terhadap pereaksi aluminium klorida (AlCl_3) (Dalming *et al.*, 2011). Sejumlah 200 mg ekstrak etanol daun jati ditimbang kemudian dilarutkan dalam 25 mL etanol p.a hingga homogen. Sebanyak 0,5 mL larutan sampel dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1,5 mL etanol p.a, 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL natrium asetat, dan 2,8 mL akuades, sehingga volume campuran mencapai 5 mL. Seluruh larutan dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu kamar selama *operating time* untuk memastikan reaksi kompleksasi antara flavonoid dan aluminium klorida berlangsung sempurna. Setelah proses inkubasi, absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) kuersetin yang telah ditentukan sebelumnya. Konsentrasi flavonoid total dalam ekstrak dihitung berdasarkan persamaan regresi linier baku kuersetin dengan bentuk umum: $y=a+bx$ di mana y merupakan absorbansi, x adalah konsentrasi kuersetin (ppm), a merupakan intersep, dan b adalah nilai kemiringan garis. Persamaan regresi tersebut digunakan untuk memperoleh kadar flavonoid total sampel dalam persen (% b/b)

$$\% = \frac{C_p \times \frac{A_u}{A_p} \times V \times f}{W} \times 100\%$$

C_p = Kadar Larutan pembanding

A_u = Serapan Larutan uji

A_p = Serapan Larutan pembanding

V = Volume Larutan uji sebelum pengenceran

f = Faktor pengenceran Larutan uji

W = Bobot bahan uji

10. Larutan stok uji dan dosis

Larutan metformin dibuat dengan melarutkan 500 mg tablet metformin ke dalam 100 mL suspensi Na CMC 0,5%. Suspensi Na CMC 0,5% disiapkan terlebih dahulu dengan melarutkan 500 mg natrium karboksimetil selulosa dalam 100 mL air hangat sambil diaduk hingga terbentuk larutan yang homogen dan kental. Untuk diet tinggi fruktosa, fruktosa dilarutkan dalam air minum dengan konsentrasi 10-20% (b/b) sampai larut sempurna dan kemudian diberikan sebagai minuman selama masa perlakuan. Semua larutan dan suspensi tersebut diaduk secara menyeluruh sebelum digunakan agar homogen dan memudahkan pemberian secara oral pada mencit.

11. Pengujian aktivitas antihiperglikemik

Sebanyak 30 ekor mencit jantan sehat berumur 2–3 bulan dengan berat 20–30 g menjalani masa aklimatisasi selama 7 hari sebelum perlakuan dimulai. Mencit kemudian dibagi secara acak menjadi enam kelompok, masing-masing berisi lima ekor. Kelompok 1 sebagai kontrol normal yang tidak menerima perlakuan dan tidak diberi diet tinggi fruktosa. Kelompok 2 sampai kelompok 6 diberi diet tinggi fruktosa secara oral untuk menginduksi kondisi hiperglikemik. Kelompok 2 berperan sebagai kontrol negatif yang hanya menerima diet tinggi fruktosa tanpa ekstrak. Kelompok 3 merupakan kontrol positif yang diberikan metformin dengan dosis 500 mg/kg berat badan, disiapkan dalam suspensi Na CMC 0,5%. Kelompok 4, 5, dan 6 adalah kelompok perlakuan yang menerima ekstrak etanol daun jati dengan dosis berturut-turut 150 mg/kgBB, 300 mg/kgBB, dan 600 mg/kgBB, juga dilarutkan dalam Na CMC 0,5%. Semua perlakuan diberikan secara oral menggunakan sonde setiap hari selama 21 hari.

Sebelum perlakuan, seluruh mencit dipuasakan selama 8–12 jam dengan tetap diberikan air minum. Pengukuran kadar glukosa darah awal (T0) dilakukan dengan mengambil darah dari ujung ekor menggunakan glukometer. Pemberian diet tinggi fruktosa pada kelompok 2 hingga 6 bertujuan untuk memicu peningkatan kadar glukosa darah sebagai model hiperglikemia. Setelah mencit mencapai kadar glukosa darah di atas 126 mg/dL, perlakuan diberikan sesuai kelompok masing-masing. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan secara berkala pada hari ke-7 (T1), hari ke-14 (T2) dan hari ke-21 (T3) untuk memantau perubahan kadar glukosa darah selama masa perlakuan. Data yang diperoleh dianalisis untuk menilai efektivitas aktivitas antihiperglikemik dari

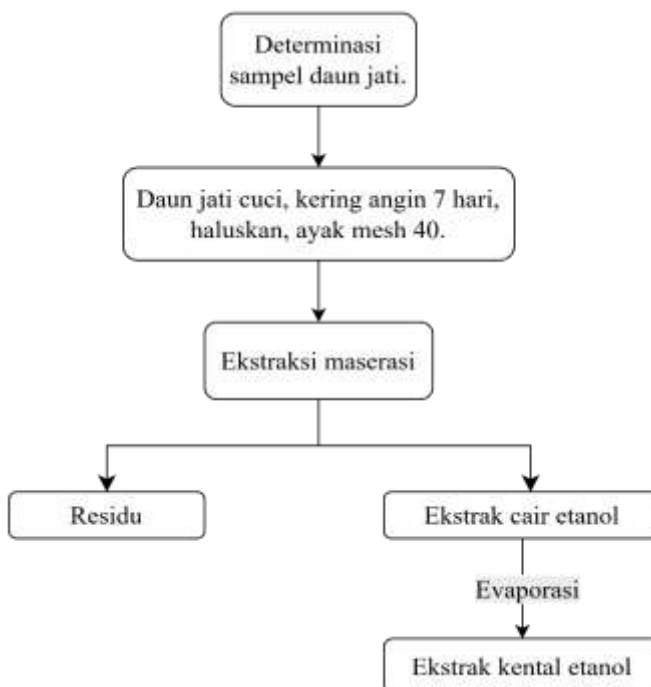
metformin dan ekstrak etanol daun jati dibandingkan dengan kontrol negatif dan kontrol normal.

E. Analisis Hasil

Data hasil penelitian dianalisis secara deskriptif untuk menggambarkan hasil pengukuran berat badan dan kadar glukosa darah mencit dalam bentuk nilai rata-rata dan simpangan baku, serta hasil skrining fitokimia ekstrak etanol daun jati secara kualitatif. Analisis deskriptif ini bertujuan memberikan gambaran umum terhadap kecenderungan data pada masing-masing kelompok perlakuan.

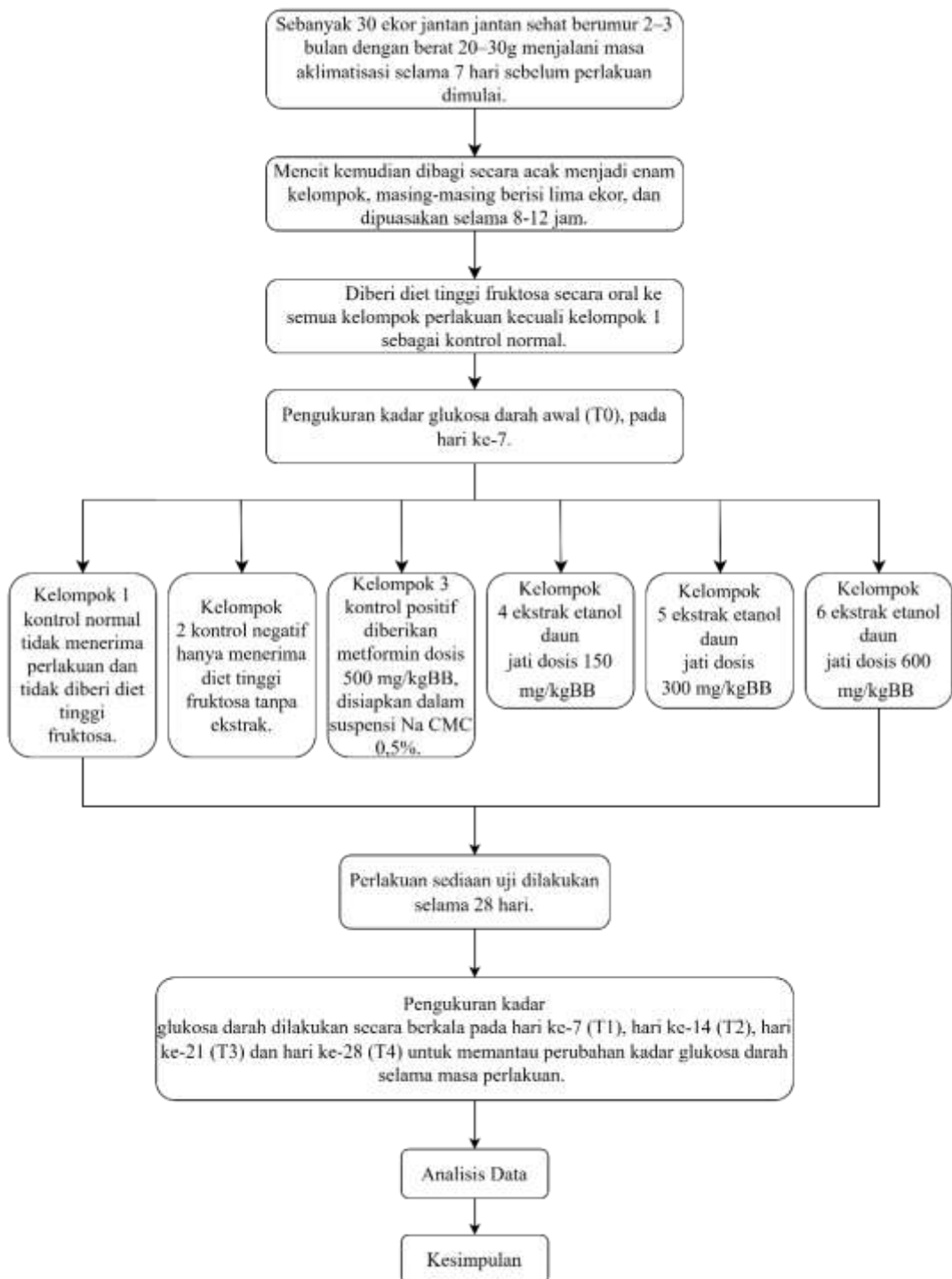
Analisis inferensial dilakukan menggunakan perangkat lunak statistik dengan uji normalitas Kolmogorov–Smirnov dan Shapiro–Wilk sebagai syarat penggunaan uji parametrik. Data yang tidak memenuhi asumsi normalitas tidak dianalisis menggunakan One Way ANOVA dan dilanjutkan dengan uji nonparametrik Kruskal–Wallis. Tingkat kemaknaan statistik ditetapkan pada nilai $p < 0,05$ untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan.

F. Skema Penelitian



Gambar 2. Pembuatan ekstrak etanol daun jati (*Tectona grandis* L)

G. Skema Pengujian Aktivitas Antihiperglikemik



Gambar 3. Pengujian aktivitas antihiperglikemik ekstrak etanol daun jati (*Tectona grandis* L.)