

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Jenis penelitian ini menggunakan pendekatan kuantitatif dengan metode eksperimental. Pada penelitian ini tahapan yang akan dilakukan diantaranya ekstraksi daun tanaman buah ajaib (*Synsepalum dulcificum*), pengujian kadar air, skrining fitokimia, pembuatan larutan uji, pemberian perlakuan pada hewan uji secara intraperitoneal dan per oral, pengukuran kadar GDS tikus sebelum diberi perlakuan (*pre*), pengukuran GDS tikus setelah diinduksi, dan pengukuran GDS tikus setelah diberi ekstrak (*post*).

#### **B. Lokasi Penelitian**

1. Proses ekstraksi, skrining fitokimia, dan pembuatan larutan uji dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo
2. Pemberian perlakuan dan pengukuran GDS penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo

#### **C. Subjek Penelitian**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun tanaman buah ajaib (*Synsepalum dulcificum*) yang didapatkan dari hasil budidaya warga di dusun Gintungan, Ungaran, Jawa Tengah. Sampel daun yang digunakan adalah daun tua sebanyak 1 kg. Pelarut etanol 70% digunakan sebagai pelarut untuk maserasi. Untuk pengujian antidiabetik secara *in vivo* menggunakan tikus putih

galur wistar dipilih dengan jenis kelamin jantan dan rata-rata berat 150 - 200 gram. Untuk menghasilkan tikus yang diabetik, maka tikus diinduksi menggunakan aloksan dengan dosis 150 mg/kgBB secara intraperitoneal untuk meningkatkan kadar gula darah tikus (Ojewale *et al.*, 2020).

Jumlah tikus yang digunakan dalam penelitian sebanyak minimal 5 ekor per kelompok. Hasil tersebut didapatkan berdasarkan perhitungan berikut:

Rumus Federer (Arfan *et al.*, 2020):

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 5$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok

n = jumlah sampel

Pada penelitian ini hewan uji diambil dari peternakan di area Doplang, Ambarawa, Kabupaten Semarang.

#### D. Definisi Operasional Variabel

No.	Variabel	Definisi Operasional	Metode Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur
1.	Dosis ekstrak etanol daun tanaman buah ajaib ( <i>Synsepalum dulcificum</i> )	Ekstrak etanol daun buah ajaib	-	-	-
-2.	Kadar glukosa darah	Kadar glukosa darah didapatkan berdasarkan hasil data <i>pre</i> dan <i>post test</i> pengukuran kadar glukosa darah sewaktu tikus.	Metode Enzimatik	Glukometer	mg/dl

#### E. Variabel Penelitian

##### 1. Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel penelitian yang akan mempengaruhi variabel terikat. Dosis ekstrak etanol daun tanaman buah ajaib (*Synsepalum dulcificum*) adalah variabel bebas pada penelitian ini.

##### 2. Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang dapat berubah akibat adanya variabel bebas. Analisis kandungan metabolit sekunder dan adanya pengaruh dosis ekstrak etanol daun tanaman buah ajaib (*Synsepalum dulcificum*) merupakan variabel tergantung pada penelitian ini.

##### 3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah suhu, cahaya, waktu, jenis kelamin, berat badan, umur.

#### F. Alat dan Bahan

##### 1. Alat-alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya neraca analitik (OHAUS), ayakan mesh 40, blender (Philips), tabung reaksi (Iwaki), cawan porselen, toples kaca, kain flanel, moisture analyzer (OHAUS), rotary evaporator (RE 2000E), pipet tetes, waterbath (XMTD 204), oven (Binder), syringe, sonde oral, strip gula (Easytouch), alcohol swab (Cosmo Med), lancet (Onemed).

## 2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tanaman buah ajaib (*Synsepalum dulcificum*), aquadest, metformin (Hexpharm), aloksan (Sigma Aldrich), etanol teknis 70%, alumunium foil, asam klorida 2N, pereaksi dragendorff, pereaksi mayer, pereaksi bouchardat, serbuk magnesium, alumunium klorida 1%, besi (III) klorida 5%, asam asetat anhidrat (PA), asam asetat glassial(PA), asam sulfat pekat(PA), NaCl.

## G. Prosedur Kerja

### 1. Ekstraksi

Sebanyak 300 gram serbuk daun dimasukkan ke dalam toples kaca dan ditambahkan dengan etanol 70% dengan perbandingan ekstraksi 1:15 dengan perincian 1:10 untuk maserasi selama 3 hari dan dilanjutkan dengan remaserasi menggunakan pelarut etanol 70% 1:5 selama 3 hari. Campuran ekstrak dan pelarut diaduk secara konsisten dan setelah 72 jam, campuran dipisahkan dengan penyaringan menggunakan kain flanel. Hasi maserasi dan remaserasi dicampurkan kemudian dilakukan pemekatan pada suhu 40°C menggunakan *rotary evaporator*. Hasil ekstrak dipindahkan dalam

wadah kedap udara dengan penyimpanan pada suhu kamar dan dihindarkan dari paparan cahaya matahari langsung (Anggono, 2024).

## 2. Kadar Air

### a. Kadar Air Simplisia

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia dimasukkan dalam *moisture analyzer* yang telah ditara, kemudian ditutup *moisture analyzer* dan ditunggu hingga hasil kadar air keluar.

### b. Kadar Air Ekstrak

Sebanyak 2 gram ekstrak simplisia dimasukkan dalam *moisture analyzer* yang telah ditara, kemudian ditutup *moisture analyzer* dan ditunggu hingga hasil kadar air keluar

## 3. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia ekstrak etanol daun tanaman buah ajaib (*Synsepalum dulcificum*) dilakukan secara kualitatif dengan uji tabung. Pengujian yang dilakukan meliputi uji flavonoid, alkaloid, tannin, saponin, dan steroid. Berikut prosedur kerja skrining fitokimia:

### a. Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak etanol daun tanaman buah ajaib ditambahkan dengan 10 mL aquadest dan kemudian campuran dididihkan selama 5 menit dan disaring. Sebanyak 5 ml filtrat ditambahkan dengan 0,1 gram serbuk magnesium dan asam klorida pekat 1 mL, dan dihomogenkan larutan. Hasil positif ditunjukkan

dengan adanya perubahan warna menjadi merah, kuning, atau jingga (Sari, 2023).

b. Alkaloid

Sebanyak 0,5 g ekstrak ditimbang dan ditambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml air suling. Selanjutnya dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit dan disaring untuk diambil filtratnya. Filtrat hasil penyaringan dibagi dalam 3 tabung sebanyak 0,5 ml dan disiapkan masing-masing pereaksi. Sebanyak 2 tetes pereaksi mayer ditambahkan pada tabung pertama dan diamati perubahan warnanya, hasil dinyatakan positif apabila filtrat berubah warna menjadi kuning. Sebanyak 2 tetes pereaksi bouchardat ditambahkan pada tabung kedua dan diamati perubahan warnanya, perubahan warna filtrat menjadi kecoklatan menunjukkan hasil yang positif. Sebanyak 2 tetes pereaksi dragendorff ditambahkan pada tabung ketiga dan diamati perubahan warnanya, hasil dinyatakan positif apabila terjadi perubahan warna filtrat menjadi jingga (Sari, 2023).

c. Tannin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan 10 ml air panas dan ditambahkan FeCl. Hasil dinyatakan positif bila terbentuk warna hijau kehitaman (Surbakti *et al.*, 2018).

d. Steroid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditimbang dan ditambahkan 10 tetes CH<sub>3</sub>COOH. Sebanyak 2 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat ditambahkan dan

dicampurkan secara perlahan. Hasil dinyatakan positif apabila larutan berwarna biru atau kehijauan (Surbakti *et al.*, 2018).

e. Saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL aquadest. Pengocokan kuat larutan selama 1 menit dan didiamkan selama 10 menit dan diamati terbentuk atau tidaknya busa. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya busa stabil selama 1-3 menit (Surbakti *et al.*, 2018).

## H. Pengujian Aktivitas Antidiabetik Secara In-Vivo

### 1. Perlakuan Hewan

Pada penelitian ini, hewan uji yang digunakan adalah tikus jantan galur wistar yang sehat dengan bobot badan 150 sampai 200 gram sebanyak 30 ekor dan dibagi dalam 5 kelompok, tiap kelompok terdiri atas 6 ekor tikus. Tikus diaklimatisasi selama 7 hari dan diberikan pakan standart BR-1. Tikus diinduksi dengan aloksan secara intraperitoneal dengan dosis 150 mg/kgBB (Ojewale *et al.*, 2020). Pada kadar glukosa darah sewaktu >200 mg/dl tikus dinyatakan diabetes (Rehman *et al.*, 2023).

Pembagian kelompok perlakuan sebagai berikut:

**Tabel 3. 1 Kelompok perlakuan hewan uji**

<b>Kelompok</b>	<b>Jumlah</b>	<b>Jenis perlakuan</b>
Kontrol negatif	6 ekor	Diberikan aquadest sebanyak 2,5 ml
Kontrol positif	6 ekor	Diberikan larutan metformin 5,04 g/ 200 g BB
Perlakuan 1	6 ekor	Diberikan ekstrak etanol daun tanaman buah ajaib dengan dosis 200 mg/kgBB
Perlakuan 2	6 ekor	Diberikan ekstrak etanol daun tanaman buah ajaib dengan dosis 400 mg/kgBB

---

Perlakuan 3	6 ekor	Diberikan ekstrak daun tanaman buah ajaib dengan dosis 600 mg/kgBB
-------------	--------	--

---

## 2. Penentuan Dosis Aloksan

Aloksan digunakan sebagai induktor untuk membuat tikus diabetik. Dosis aloksan pada hewan uji adalah 150 mg/kgBB secara intraperitoneal (Wulandari *et al.*, 2024). Faktor konversi manusia ke tikus sebesar 0,018 maka perhitungan stok aloksan untuk tikus dengan berat badan 200 gram dengan volume pemberian 2,5 ml adalah sebagai berikut:

$$\begin{aligned}
 \text{Dosis} &= 150 \text{ mg} \times 0,018 \\
 &= 2,7 \text{ mg}/200 \text{ g BB} \\
 \text{Stok} &= \frac{\text{Dosis}}{\text{Volume Pemberian}} \\
 &= \frac{2,7 \text{ mg}}{2,5 \text{ ml}} \\
 &= 1,08 \text{ mg/ml}
 \end{aligned}$$

Aloksan akan diberikan pada 30 ekor tikus dengan masing-masing volume pemberian setiap tikus sebesar 2,5 ml dengan induksi selama 1 hari. Maka kebutuhan aloksan yang ditimbang:

$$\begin{aligned}
 \text{Kebutuhan larutan} &= \text{jumlah tikus} \times \text{volume pemberian} \\
 &= 30 \text{ ekor} \times 2,5 \text{ ml} \\
 &= 75 \text{ ml} \\
 \text{Lama pemberian} &= 75 \text{ ml} \times 1 \text{ hari} \\
 &= 75 \text{ ml} = 100 \text{ ml} \\
 \text{Kebutuhan aloksan} &= 1,08 \text{ mg} \times 100 \text{ ml} \\
 &= 108 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

Cara Pembuatan:

Sebanyak 108 mg aloksan ditimbang dan dilarutkan dalam 50 ml cairan NaCl steril 0,9% dimasukkan larutan ke dalam labu takar dan ditambahkan dengan NaCl 0,9% hingga 100 ml (Indah *et al.*, 2023).

### 3. Penentuan Dosis Metformin

Metformin digunakan sebagai kontrol positif untuk menurunkan kadar GDS. Dosis metformin untuk manusia 50 kg adalah 500 mg, faktor konversi dari manusia 70 kg ke tikus 200 g adalah 0,018. Maka perhitungan dosis metformin untuk tikus (200 g) dengan volume pemberian 2,5 ml adalah sebagai berikut:

$$\text{Konversi} = \frac{70}{50} \times 500 \text{ mg} = 280 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis} &= 0,018 \times 280 \text{ mg} \\ &= 5,04 \text{ mg/ 200 g BB} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Stok} &= \frac{\text{Dosis}}{\text{Volume Pemberian}} \\ &= \frac{5,04 \text{ mg}}{2,5 \text{ ml}} \\ &= 2,016 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

Jumlah tikus yang akan diberikan metformin sebanyak 6 ekor tikus dengan masing-masing volume pemberian setiap tikus sebesar 2,5 ml. Metformin diberikan dalam kurun waktu 7 hari, maka kebutuhan metformin yang ditimbang:

$$\begin{aligned} \text{Kebutuhan larutan} &= \text{jumlah tikus} \times \text{volume pemberian} \\ &= 6 \text{ ekor} \times 2,5 \text{ ml} \\ &= 15 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Lama pemberian} &= 15 \text{ ml} \times 7 \text{ hari} \\ &= 105 \text{ ml} = 150 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\text{Kebutuhan metformin} = 2,016 \text{ mg} \times 150 \text{ ml}$$

$$= 302,4 \text{ mg}$$

#### Cara Pembuatan:

Sebanyak 302,4 mg metformin dibagi menjadi 3x pengenceran menggunakan labu takar 50 ml. Sebanyak 100,8 mg metformin ditimbang dan dilarutkan dengan 25 ml aquadest. Larutan dimasukkan dalam labu takar dan ditambahkan aquadest hingga mencapai volume 50 ml. Selanjutnya larutan dihomogenkan dan kemudian dipindahkan dalam botol gelap.

#### 4. Penentuan Dosis Ekstrak

Ekstrak etanol daun tanaman buah ajaib dibuat dalam 3 dosis, yakni 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 600 mg/kgBB. Berdasarkan penelitian (Onuminya *et al.*, 2023), disebutkan bahwasannya ekstrak daun tanaman buah ajaib dengan dosis 400 mg/kgBB (kuat) dan 200 mg/kgBB (sedang) memiliki efektivitas yang baik terhadap penurunan glukosa darah.

##### a. Dosis I

$$\text{Dosis ekstrak} = 200 \text{ mg/kgBB}$$

$$\text{Berat tikus} = 200 \text{ gram} = 0,2 \text{ kg}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis} &= \text{Dosis Ekstrak} \times \text{Berat Tikus} \\ &= 200 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 40 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Stok} &= \frac{\text{Dosis}}{\text{Volume Pemberian}} \\ &= \frac{40 \text{ mg}}{2,5 \text{ ml}} \\ &= 16 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

Jumlah tikus yang akan diberikan ekstrak dosis I sebanyak 6 ekor tikus dengan masing-masing volume pemberian setiap tikus sebesar

2,5 ml. Ekstrak diberikan dalam kurun waktu 7 hari, maka kebutuhan ekstrak yang ditimbang:

$$\begin{aligned} \text{Kebutuhan larutan} &= \text{jumlah tikus} \times \text{volume pemberian} \\ &= 6 \text{ ekor} \times 2,5 \text{ ml} \\ &= 15 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Lama pemberian} &= 15 \text{ ml} \times 7 \text{ hari} \\ &= 105 \text{ ml} = 150 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kebutuhan ekstrak} &= 16 \text{ mg} \times 150 \text{ ml} \\ &= 2.400 \text{ mg} = 2,4 \text{ gram} \end{aligned}$$

Cara Pembuatan:

Sebanyak 2,4 gram ekstrak dibagi menjadi 3x pengenceran menggunakan labu takar 50 ml. Sebanyak 800 mg ekstrak ditimbang dan dilarutkan dengan 25 ml aquadest. Larutan dimasukkan dalam labu takar dan ditambahkan aquadest hingga mencapai 50 ml. Selanjutnya larutan dihomogenkan dan kemudian dipindahkan dalam botol gelap.

b. Dosis II

$$\text{Dosis ekstrak} = 400 \text{ mg/kgBB}$$

$$\text{Berat tikus} = 200 \text{ gram} = 0,2 \text{ kg}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis} &= \text{Dosis Ekstrak} \times \text{Berat Tikus} \\ &= 400 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 80 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Stok} &= \frac{\text{Dosis}}{\text{Volume Pemberian}} \\ &= \frac{80 \text{ mg}}{2,5 \text{ ml}} \\ &= 32 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

Jumlah tikus yang akan diberikan ekstrak dosis II sebanyak 6 ekor tikus dengan masing-masing volume pemberian setiap tikus sebesar 2,5 ml. Pemberian ekstrak akan dilakukan selama 7 hari, maka kebutuhan ekstrak yang ditimbang:

$$\begin{aligned}
 \text{Kebutuhan} &= \text{jumlah tikus} \times \text{volume pemberian} \\
 &= 6 \text{ ekor} \times 2,5 \text{ ml} \\
 &= 15 \text{ ml} \\
 \text{Lama pemberian} &= 15 \text{ ml} \times 7 \text{ hari} \\
 &= 105 \text{ ml} = 150 \text{ ml} \\
 \text{Kebutuhan ekstrak} &= 32 \text{ mg} \times 150 \text{ ml} \\
 &= 4.800 \text{ mg} = 4,8 \text{ gram}
 \end{aligned}$$

Cara Pembuatan:

Sebanyak 4,8 gram ekstrak dibagi menjadi 3x pengenceran menggunakan labu takar 50 ml. Sebanyak 1,6 gram ekstrak ditimbang dan dilarutkan dengan 25 ml aquadest. Larutan dimasukkan dalam labu takar dan ditambahkan aquadest hingga mencapai 50 ml. Selanjutnya larutan dihomogenkan dan kemudian dipindahkan dalam botol gelap.

c. Dosis III

$$\begin{aligned}
 \text{Dosis ekstrak} &= 600 \text{ mg/kgBB} \\
 \text{Berat tikus} &= 200 \text{ gram} = 0,2 \text{ kg} \\
 \text{Dosis} &= 600 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 120 \text{ mg} \\
 \text{Stok} &= \frac{\text{Dosis}}{\text{Volume Pemberian}} \\
 &= \frac{120 \text{ mg}}{2,5 \text{ ml}} \\
 &= 48 \text{ mg/ml}
 \end{aligned}$$

Jumlah tikus yang akan diberikan ekstrak dosis III sebanyak 6 ekor tikus dengan masing-masing volume pemberian setiap tikus sebesar 2,5 ml. Pemberian ekstrak akan dilakukan selama 7 hari, maka kebutuhan ekstrak yang ditimbang:

$$\begin{aligned}\text{Kebutuhan} &= \text{jumlah tikus} \times \text{volume pemberian} \\ &= 6 \text{ ekor} \times 2,5 \text{ ml} \\ &= 15 \text{ ml} \\ \text{Lama pemberian} &= 15 \text{ ml} \times 7 \text{ hari} \\ &= 105 \text{ ml} = 150 \text{ ml} \\ \text{Kebutuhan ekstrak} &= 48 \text{ mg} \times 150 \text{ ml} \\ &= 7.200 \text{ mg} = 7,2 \text{ gram}\end{aligned}$$

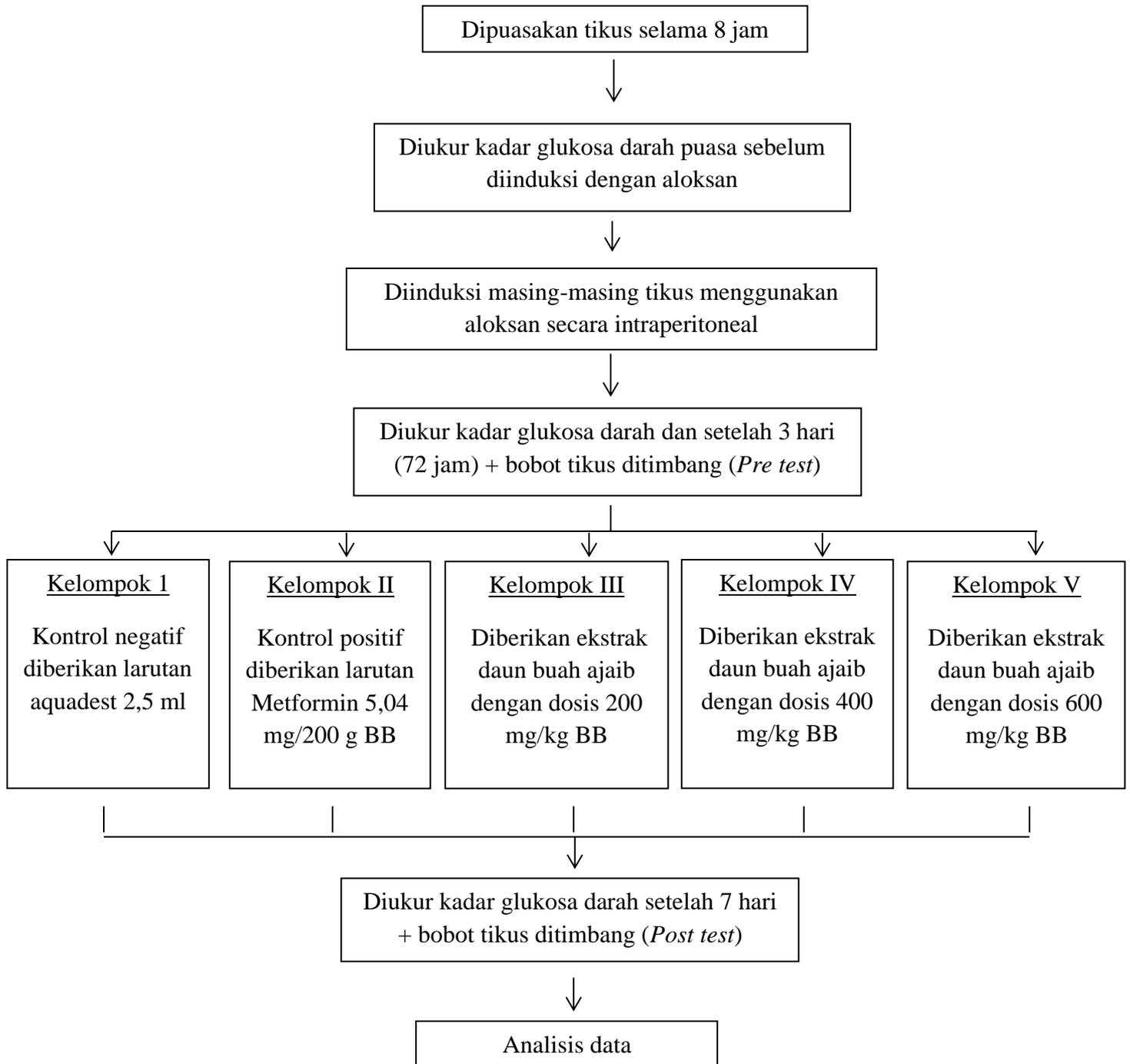
Cara Pembuatan:

Sebanyak 7,2 gram ekstrak dibagi menjadi 3x pengenceran menggunakan labu takar 50 ml. Sebanyak 2,4 gram ekstrak ditimbang dan dilarutkan dengan 25 ml aquadest. Larutan dimasukkan dalam labu takar dan ditambahkan hingga mencapai 50 ml. Selanjutnya larutan dihomogenkan dan kemudian dipindahkan dalam botol gelap.

#### 4. Uji Aktivitas Antidiabetik

Tikus dipuasakan selama 8 jam sebelum penelitian, kemudian dilakukan penandaan pada masing-masing tikus. Ekor tikus dibersihkan menggunakan *alcohol swab* kemudian dilukai ekor tikus menggunakan scalpel dan dilakukan pengukuran kadar glukosa darah sewaktu tikus sebelum diberikan perlakuan. Berat badan tikus juga ditimbang saat awal sebelum diberikan perlakuan. Pada hari berikutnya, seluruh kelompok tikus diberikan induksi aloksan dengan pemberian secara intraperitoneal tunggal

dengan dosis 150 mg/kgBB. Setelah 72 jam kadar gula darah tikus dicek kembali menggunakan glukometer sebagai data *pre test* (Ojewale *et al.*, 2020). Kadar glukosa darah tikus >200 mg/dl maka tikus dinyatakan diabetes mellitus (Mulyani *et al.*, 2023). Selanjutnya seluruh kelompok diberikan perlakuan sesuai dengan tabel Tabel 3. 1. Kadar GDS dan bobot tikus setelah pemberian larutan kontrol positif dan ekstrak selama 7 hari diukur kembali sebagai data *post test*.

**Skema Penelitian**

Gambar 3. 1 Skema Penelitian

## 5. Analisis Data

Data dianalisis secara deskriptif pada hasil skrining fitokimia ekstrak, aktivitas antidiabetik ekstrak etanol daun tanaman buah ajaib (*Synsepalum dulcificum*) dianalisis menggunakan uji normalitas *Shapiro Wilk* untuk melihat data terdistribusi normal atau tidaknya menggunakan *software SPSS* dengan nilai signifikansi  $p > 0,05$ . Apabila data terdistribusi normal dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Levene*. Hasil data yang homogen dapat dilanjutkan dengan menggunakan analisis *One-Way ANOVA* sedangkan apabila dihasilkan data yang tidak homogen, maka dapat dilakukan analisis non parametrik dengan uji *Kruskal-Wallis*. Apabila hasil analisis menggunakan *One-Way Anova* atau *Kruskal Wallis* menghasilkan perbedaan yang signifikan, dapat dilanjutkan dengan uji *post hoc*.