

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama dari bulan Januari sampai Maret 2025 di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Farmakologi Farmasi, Program Sudi Farmasi Program Sarjana, Universitas Bhamada Slawi.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini, antara lain oven (Gentra), timbangan analitik (aeADAM), blender, lampu UV, *water bath* (dss), corong kaca, bejana/toples kaca, batang pengaduk, mangkok, mortir & stemper, erlenmayer (pyrex), labu ukur (pyrex), labu ukur (pyrex), gelas beaker (pyrex), tabung reaksi (pyrex), rak tabung reaksi, gunting, bunsen, spuit 1 ml, sonde oral, glukometer (Easy touch), strip glukometer, kandang, dan tempat air minum.

3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah rimpang temu blenyeh, buah pare, etanol 96%, glibenklamid, aloksan monohidrat, aquades, CMC Na 1%, NaCl 0,9%, mencit putih, HCl 2%, reagen mayer, reagen dragendroff, Mg, metanol 50%, HCl pekat, FeCl₃ 1%, HCl 1N, asam asetat anhidrat, H₂SO₄ pekat, metanol, kloroform, kurkumin 0,02%, dan plat KLT silika gel F₂₅₄.

3.2.3. Sampel Penelitian

Mencit putih jantan sebanyak 35 ekor dengan umur 2-3 bulan dengan berat badan sebesar 20-35 gram.

1) Kriteria Inklusi

- a. Mencit putih jantan dengan berat badan antara 20-35 gram.
- b. Mencit berusia 2-3 bulan.
- c. Mencit dengan kondisi sehat tanpa penyakit lain.
- d. Mencit yang mencapai kadar glukosa darah tinggi setelah diinduksi aloksan.

2) Kriteria Eksklusi

- a. Mencit yang menunjukkan tanda-tanda stres berat atau sakit parah selama penelitian.
- b. Mencit yang tidak berhasil mencapai kadar glukosa darah tinggi setelah diinduksi aloksan.
- c. Mencit yang mengalami perubahan kondisi fisik yang signifikan selama penelitian.

3.3. Rancangan Penelitian

Menurut Soesilo (2019), variabel penelitian merupakan objek yang menempel pada diri subjek berupa suatu data yang dikumpulkan dan menggambarkan suatu kondisi atau nilai masing-masing subjek penelitian.

- 1) Variabel bebas dalam penelitian ini adalah seri dosis ekstrak etanol temu blenyeh dan buah pare.
- 2) Variabel terikat dalam penelitian ini adalah penurunan kadar gula darah dari mencit.
- 3) Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kondisi fisiologis mencit, pola makan dan minum mencit, kondisi lingkungan, proses ekstraksi, dan waktu pengambilan darah.

3.4. Prosedur Penelitian

Penelitian uji aktivitas antidiabetes kombinasi ekstrak temu blenyeh dan buah pare pada mencit jantan meliputi:

3.4.1. Pengumpulan Sampel

Rimpang temu blenyeh yang diambil dari Wisata Kesehatan Jamu (WKJ) Kalibakung, Kabupaten Tegal, dan buah pare yang diambil dari kebun pare di Desa Margasari, Kecamatan Margasari, Kabupaten Tegal.

3.4.2. Determinasi Tanaman

Rimpang temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) dan buah pare (*Momordica charantia* L.) dideterminasi dengan tujuan mengetahui kesesuaian bahan yang diteliti dan kesesuaian nama latin. Determinasi dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Bhamada Slawi.

3.4.3. Determinasi Hewan Uji

Mencit putih (*Mus musculus*) dideterminasi dengan tujuan mengetahui kesesuaian hewan uji yang diteliti dan kesesuaian nama latin. Determinasi dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Bhamada Slawi.

3.4.4. Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Temu Blenyeh dan Buah Pare

Rimpang temu blenyeh dan buah pare masing-masing sebanyak 5 kg dicuci dengan air mengalir untuk dihilangkan kotoran dan cemarannya. Rimpang temu blenyeh dan buah pare yang telah bersih dilakukan perajangan, lalu dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 4 jam. Simplisia yang telah kering dapat dilihat dari ciri

yang mudah diremas dan dipatahkan. Selanjutnya simplisia dihaluskan hingga menjadi serbuk dan diayak dengan ayakan ukuran 60 mesh (Widodo et al., 2021).

Rimpang temu blenyeh dan buah pare sebanyak 500 g yang telah diserbuk kemudian dimaserasi dengan etanol 96% dengan perbandingan 1:5 untuk rimpang temu blenyeh dan 1:7 untuk buah pare selama 3 hari dalam wadah tertutup. Setelah maserasi selesai, dilakukan penyaringan maserat menggunakan kertas saring *Whattman* No. 1 sampai didapatkan filtrat. Kemudian hasil ekstraksi yang didapat dikumpulkan dan dipekatkan dengan menggunakan penangas air sampai didapat ekstrak kental. Randemen yang diperoleh dihitung dan siap digunakan untuk standarisasi ekstrak, uji skrining fitokimia, dan uji aktivitas antidiabetes (Afifah, 2017; Laili et al., 2023).

3.4.5. Skrining Fitokimia

Sampel yang digunakan untuk skrining fitokimia yaitu ekstrak etanol temu blenyeh dan buah pare yang sudah dikentalkan dengan *water bath*.

1) Uji Alkaloid

Ekstrak sebanyak 2 mL diuapkan di atas cawan porselin. Residu yang dihasilkan selanjutnya dilarutkan dengan 5 mL HCl 2% dan larutan dibagi menjadi 2 tabung. Tabung 1 ditambah 2-3 tetes pereaksi Mayer dan tabung 2 tambah 2-3 tetes pereaksi Dragendorff. Pada pereaksi Dragendorff akan terbentuk endapan

merah bata, merah, jingga dan pereaksi Mayer akan terbentuk endapan putih atau kekuningan (Susanti et al., 2014).

2) Uji Flavonoid

Ekstrak dalam tabung reaksi uapkan sampai kering, lalu ditambahkan 1-2 mL metanol panas 50%, kemudian ditambah Mg dan 4-5 tetes HCl pekat. Hasil positif flavonoid jika terbentuk larutan warna merah atau jingga (Wahidah et al., 2021).

3) Uji Tanin

Ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 1-2 tetes FeCl_3 1%. Hasil positif tannin jika terbentuk larutan hijau kehitaman atau biru tua (Wahid & Safwan, 2020).

4) Uji Saponin

Ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi dan tambahkan aquades (1:1), kocok kuat selama 1 menit, bila timbul busa tambahkan HCl 1N dan jika busa bertahan selama 10 menit dengan tinggi 1-3 cm, maka ekstrak positif mengandung saponin (Oktavia & Sutoyo, 2021).

5) Uji Triterpenoid dan Steroid

Ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya melalui dinding tabung tambahkan 1-2 mL H_2SO_4 pekat. Jika terbentuk cincin coklat atau violet maka positif triterpenoid, dan jika terbentuk warna hijau kebiruan maka positif steroid (Pramiastuti & Murti, 2022).

3.4.6. Identifikasi Senyawa Kurkumin dan Charantin dengan KLT

Identifikasi kurkumin menggunakan larutan baku pembanding kurkumin 0,02% dan sampel ekstrak etanol rimpang temu blenyeh. Sementara itu, identifikasi charantin menggunakan sampel ekstrak etanol buah pare. Fase diam menggunakan plat KLT silika gel F₂₅₄ dengan lebar 4 cm dan panjang 10 cm, serta batas atas dan bawah 1 cm. Fase gerak yang digunakan untuk mendeteksi kurkumin yaitu kloroform:metanol (95:5), sedangkan untuk charantin yaitu metanol dan benzena (2:8). Plat KLT yang sudah ditotol larutan baku dan larutan uji kemudian dimasukkan ke dalam chamber dan dibiarkan hingga terelusi (Shary & Mahfur, 2023). Plat KLT charantin diuapkan dengan iodine untuk menampakkan bercak.

3.4.7. Pembuatan Larutan Aloksan 1%

Sebanyak 1 gram aloksan monohidrat dilarutkan dalam 100 mL NaCl 0,9%. Aloksan diberikan secara intraperitoneal dengan dosis pada mencit yaitu 120 mg/kgBB (Nangoy et al., 2019).

3.4.8. Pembuatan Suspensi CMC Na 0,5%

Sebanyak 0,5 gram CMC Na dilarutkan dengan air hingga 100 mL. Kemudian campuran diaduk hingga membentuk larutan jernih (Utami, 2019).

3.4.9. Pembuatan Suspensi Glibenklamid

Dosis glibenklamid untuk manusia dengan BB 70 kg adalah 5 mg. Faktor konversi manusia dengan berat badan 70 kg ke mencit dengan berat badan 20 gram adalah 0,0026 (Utami, 2019). Jadi dosis

yang diberikan ke mencit yaitu 0,65 mg/kgBB mencit. Pembuatan suspensi glibenklamid dilakukan dengan mendispersikan serbuk glibenklamid ke dalam larutan CMC Na 0,5 % (Hasan et al., 2022).

3.4.10. Pembuatan Suspensi Uji Ekstrak Temu Blenyeh

Ekstrak rimpang temu blenyeh sebanyak 200 mg/kgBB didispersikan dengan CMC Na 0,5% hingga terbentuk suspensi ekstrak temu blenyeh dan dicukupkan dalam labu takar 10 mL (Padhye & Jogdand, 2019).

3.4.11. Pembuatan Suspensi Uji Ekstrak Buah Pare

Ekstrak buah pare sebanyak 200 mg/kgBB didispersikan dengan CMC Na 0,5% hingga terbentuk suspensi ekstrak buah pare dan dicukupkan dalam labu takar 10 mL (Afifah, 2017).

3.4.12. Pembuatan Suspensi Uji Kombinasi Ekstrak Temu Blenyeh dan Buah Pare

Dosis kombinasi ekstrak temu blenyeh dan buah pare dibagi menjadi 3 peringkat dosis, yaitu kombinasi ekstrak temu blenyeh 25% : buah pare 75%, kombinasi ekstrak temu blenyeh 50% : buah pare 50%, dan kombinasi ekstrak temu blenyeh 75% : buah pare 25%.

3.4.13. Tahap Pengujian

Hewan uji berjumlah 35 ekor yang dibagi menjadi 7 kelompok uji dengan masing-masing kelompok berjumlah 5 ekor. Semua mencit dipuasakan selama 16 jam tetapi tetap diberi minum. Dilakukan pengambilan darah pada ekor mencit untuk pemeriksaan kadar glukosa darah awal, masing-masing diberi tanda pengenal pada ekornya. Mencit diinduksi dengan aloksan dengan dosis 120

mg/kgBB mencit secara intraperitoneal. Kemudian mencit diberi makan seperti biasa dan minum yang mengandung glukosa 10% selama 2 hari setelah pemberian aloksan. Pada hari ke-3 dilakukan pengukuran kadar glukosa darah mencit. Mencit dinyatakan diabetes apabila kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dL (Hendrika et al., 2021). Setelah itu langsung diberi perlakuan dengan kelompok perlakuan sebagai berikut:

Tabel 3. 1 Kelompok Perlakuan

Kelompok	Perlakuan	Volume
Kontrol negatif (K-)	CMC Na 0,5%	0,2 mL/20 g BB mencit
Kontrol positif (K+)	Glibenklamid 0,65 mg/kgBB	Sesuai dosis dan BB mencit
Ekstrak temu blenyeh	Ekstrak rimpang temu blenyeh 200 mg/kgBB	Sesuai dosis dan BB mencit
Ekstrak buah pare	Ekstrak buah pare 200 mg/kgBB	Sesuai dosis dan BB mencit
Kombinasi 1 200 mg/kgBB (25:75)	Ekstrak rimpang temu blenyeh 25% : buah pare 75%	Sesuai dosis kombinasi
Kombinasi 2 200 mg/kgBB (50:50)	Ekstrak rimpang temu blenyeh 50% : buah pare 50%	Sesuai dosis kombinasi
Kombinasi 3 200 mg/kgBB (75:25)	Ekstrak rimpang temu blenyeh 75% : buah pare 25%	Sesuai dosis kombinasi

Masing-masing kelompok diberi perlakuan setiap hari selama 7 hari dengan dosis kombinasi maksimal sebesar 200 mg/kgBB. Dilakukan pengambilan darah pada tiap mencit untuk melihat kadar glukosa darah pada hari ke-3 dan ke-7 setelah pemberian sediaan. Glukosa darah diukur dengan menggunakan alat glukometer. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan dengan melukai ujung

ekor mencit dengan gunting sampai darah keluar. *Test strip* glukometer ditempelkan pada darah mencit yang hasilnya akan muncul pada layar monitor glukometer tersebut (Menteri Kesehatan Republik Indonesia, 2010). Persentase perubahan kadar glukosa darah dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut (Hendrika et al., 2021).

$$\text{Persen perubahan kadar glukosa} = \frac{K_0 - K_d}{K_0} \times 100\%$$

Keterangan:

K₀: Kadar glukosa darah pada awal diabetes (hari ke-1 dinyatakan diabetes).

K_d: Kadar glukosa darah pada hari pengamatan (hari ke-3 dan ke-7 setelah pemberian sediaan).

3.5. Analisis Data

Data yang diperoleh dari metode ini berupa persen penurunan kadar glukosa darah dari semua kelompok, baik kontrol positif, kontrol negatif, maupun kelompok uji setelah pemberian sediaan uji selama 7 hari. Data tersebut dihitung secara statistik dengan *One Way* ANOVA untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Apabila hasil uji *One Way* ANOVA memberikan hasil adanya perbedaan yang bermakna, maka dapat dilanjutkan dengan uji *Least Significance Different* (LSD) (Sudjana, 2002). Jika data berdistribusi normal tetapi tidak homogen, maka analisis dilanjutkan dengan uji *Games-Howell* untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan signifikan (Novia et al., 2021).