

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian eksperimen.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Farmakognosi Prodi DIII Farmas Poltekkes Kemenkes Kupang.

2. Waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari sampai April tahun 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tanaman brokoli yang berada di Kecamatan Kupang Barat, Tablolong, Nusa Tenggara Timur (NTT).

2. Sampel dan teknik sampling

a. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah brokoli (*Brassica oleracea var. italica*) yang diambil dari Kecamatan Kupang Barat, Tablolong, Nusa Tenggara Timur (NTT).

b. Teknik sampling

Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian ini adalah *purposive sampling*, dengan kriteria bunga kecamba brokoli berwarna hijau dan segar.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah dosis efektif infusa brokoli dengan dosis 25% b/v, 50% b/v, dan 75% b/v.

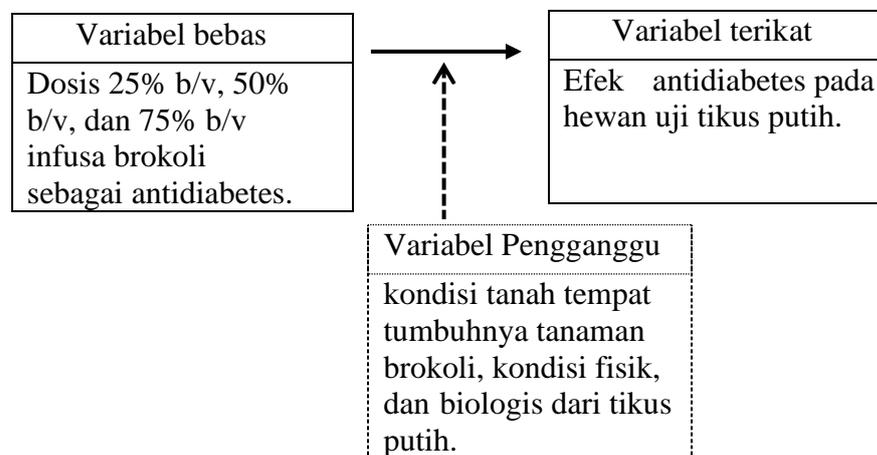
2. Variabel terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah efek antidiabetes infusa brokoli (*Brassica oleracea var. italica*) memiliki aktivitas antidiabetes terhadap tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*).

3. Variabel pengganggu

Variabel pengganggu adalah kondisi tanah tempat tumbuhnya tanaman brokoli, kondisi fisik, dan biologis dari tikud putih jantan.

E. Kerangka Konsep



Keterangan : ———— Yang diteliti
----- Tidak diteliti

F. Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

No	Variabel	Defenisi Operasional	Alat ukur	Skala
1.	Tikus Putih Jantan Diabetes	Tikus putih jantan yang mengalami peningkatan kadar glukosa darah melebihi 110 mg/dl, maka tikus tersebut sudah mengalami diabetes yang diukur menggunakan alat ukur diabetes (glukometer).		Nominal
2.	Infusa Brokoli	Hasil rebusan brokoli (<i>Brassica oleracea var. italica</i>) yang diperoleh menggunakan metode infusa dengan pelarut air pada suhu 90 ⁰ C masing-masing dibuat dosis 25%, 50% dan 75% dipertahankan suhunya hingga 15 menit.		Nominal
3.	Tikus Putih Jantan	Salah satu hewan uji yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antidiabetes infusa brokoli. Tikus putih jantan yang di pakai berumur 2-3 bulan dengan berat badan rata-rata berkisar dari 100 gram dengan kondisi yang sehat sebanyak 15 ekor.	Timbangan	Rasio
4.	Efek Antidiabetes	Penurunan kadar glukosa tikus yang dihitung setiap 30 menit sampai pengukuran pada menit ke 120 setelah dilakukan tikus mengalami diabetes dan diukur menggunakan glukometer.	Glukometer	Rasio

G. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus, bejana infusa, kain flanel, wadah infusa, batang pengaduk, beaker glass (*pyrex*), erlenmeyer (*pyrex*), gelas ukur (*pyrex*), labu ukur (*pyrex*), pipet tetes (*pyrex*), tabung reaksi (*pyrex*), corong kaca (*pyrex*), kertas perkamen, sendok tanduk, timbangan analitik (*pyrex ew 220-3 nm*), aluminium foil, hot plate, stopwatch, sarung tangan, glukometer (gluko Dr), disposable 5 cc, jarum sonde oral, gunting bedah, kapas, termometer, stopwach, kamera handphone.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain simplisia brokoli, aquadest, metformin, Na Cmc 1%, alkohol 95%, glukosa (sukrosa), pereaksi mayer, bouchardat, serbuk Mg, HCl pekat, FeCl₃, H₂SO₄ pekat, air panas, etanol 70%.

H. Prosedur Penelitian

1. Persiapan bahan uji

Sampel brokoli diambil di Kecamatan Kupang Barat, Tablolong, Nusa Tenggara Timur. Pengambilan sampel dilakukan pada pagi hari. Brokoli yang diambil adalah sebanyak 4 kg, lalu bahan disortasi basah dengan bahannya dicuci hingga bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang masih melekat pada daunnya. Didapatkan simplisia brokoli kering sebanyak 325 gram.

2. Pembuatan simplisia brokoli

Pengumpulan brokoli segar berwarna hijau sebanyak 4 kg, lalu dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran-kotoran dari brokoli, dan dilakukan pencucian, setelah itu perajangan brokoli untuk mempermudah proses pengeringan, dan langkah berikutnya dilakukan pengeringan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, dan dapat bertahan lama, setelah kering dilakukan sortasi kering untuk memisahkan bagian tanaman yang tidak dibutuhkan seperti daun yang tertinggal, setelah kering simplisia di simpan pada wadah tertutup rapat dan simplisia siap diolah.

3. Pembuatan infusa brokoli

a. Konsentrasi 25% b/v

Ditimbang brokoli sebanyak 25 gram, kemudian dimasukkan ke dalam panci infus bagian atas, selanjutnya tambahkan aquades sebanyak 100 ml dan dipanaskan hingga mendidih. Pada saat mencapai suhu 90°C, dihitung selama 15 menit sambil di aduk-aduk, di saring selagi panas menggunakan kain flanel bersih dan ditambahkan air panas secukupnya melalui ampas sampai mencapai volume 100 ml. Kemudian dimasukkan dalam botol kaca yang sudah diberi label.

b. Konsentrasi 50% b/v

Ditimbang brokoli sebanyak 50 gram, kemudian dimasukkan ke dalam panci infus bagian atas, selanjutnya tambahkan aquades

sebanyak 100 ml dan dipanaskan hingga mendidih. Pada saat mencapai suhu 90°C, dihitung selama 15 menit sambil di aduk-aduk, di saring selagi panas menggunakan kain flanel bersih dan ditambahkan air panas secukupnya melalui ampas sampai mencapai volume 100 ml. Kemudian dimasukkan dalam botol kaca yang sudah diberi label.

c. Konsentrasi 75% b/v

Ditimbang brokoli sebanyak 75 gram, kemudian dimasukkan ke dalam panic infus bagian atas, selanjutnya tambahkan aquades sebanyak 100 ml dan dipanaskan hingga mendidih. Pada saat mencapai suhu 90°C, dihitung selama 15 menit sambil di aduk-aduk, di saring selagi panas menggunakan kain flanel bersih dan ditambahkan air panas secukupnya melalui ampas sampai mencapai volume 100 ml. Kemudian dimasukkan dalam botol kaca yang sudah diberi label.

4. Penentuan dosis infusa brokoli

- a. Infusa brokoli dibuat dengan dosis 25%. Sebanyak 25 gram serbuk simplisia dalam 100 ml air.

$$\frac{100 \text{ ml} \times 0,018}{200 \text{ g BB}} = 1,8 \text{ ml/ } 200 \text{ g BB}$$

Volume pemberian terhadap tikus yakni 1,8 ml

- b. Infusa brokoli dibuat dengan dosis 50%. Sebanyak 50 gram serbuk simplisia dalam 100 ml air.

$$\frac{100 \text{ ml} \times 0,018}{200 \text{ g BB}} = 1,8 \text{ ml/ } 200 \text{ g BB}$$

Volume pemberian terhadap tikus yakni 1,8 ml

- c. Infusa brokoli dibuat dengan dosis 75%. Sebanyak 75 gram serbuk simplisia dalam 100 ml air.

$$\frac{100 \text{ ml} \times 0,018}{200 \text{ g BB}} = 1,8 \text{ ml/ 200 g BB}$$

Volume pemberian terhadap tikus yakni 1,8 ml

5. Identifikasi kandungan senyawa kimia

- a. Identifikasi alkaloid

Sebanyak 5 ml, ditambahkan 5 mL HCl 2 N, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan, dan disaring. Filtrat ditambah 3 tetes reagen mayer, jika terbentuk endapan atau keruh menandakan adanya alkaloid pada infus tersebut. Selanjutnya untuk uji dengan reagen bouchardat, 5 ml infusa diuapkan di atas penangas air sampai pekat, ditambahkan 1 ml HCl 2N, dipanaskan di atas tangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring, dipindahkan 3 tetes filtrat pada kaca arloji tambahkan 2 tetes Bouchardat. Jika terjadi endapan coklat sampaihitam maka infusa mengandung alkaloid (Khafid dkk. 2023).

- b. Identifikasi flavonoid

Sebanyak 5 mL infusa brokoli ditambah 2 ml etanol 70% kemudian diaduk, ditambahkan serbuk magnesium 0,5 gram dan 3 tetes HCl pekat. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna jingga sampai merah (Khafid dkk. 2023).

c. Identifikasi saponin

Sebanyak 3 ml infusa brokoli dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 ml air panas. Setelah dingin dikocok kuat selama 15 menit dan ditetesi asam klorida 2 N, jika terbentuk buih yang mantap selama 10 menit, dan buih setinggi 1-10 cm maka sampel tersebut mengandung senyawa saponin (Khafid dkk. 2023).

d. Identifikasi tannin

Sebanyak 3 mL diambil 2 mL larutan, ditambahkan dengan 1-2 tetes pereaksi FeCl_3 . Diamati perubahan warna yang terjadi, apabila warna berubah menjadi biru atau hijau kehitaman maka sampel mengandung tannin (Khafid dkk. 2023).

e. Identifikasi terpenoid dan steroid

Sebanyak 5 mL sampel dimasukkan dalam gelas kimia, kemudian ditambah 2 mL kloroform, dan diaduk. Selanjutnya ditambahkan pereaksi Salkowsky (H_2SO_4 pekat). Apabila terbentuk warna merah menunjukkan adanya steroid/terpenoid (Khafid dkk. 2023).

6. Pembuatan Na Cmc 1%

Larutan Na Cmc konsentrasi 1% dibuat dengan cara melarutkan 1 gram Na Cmc dalam aquadest sampai volume 100 ml. Timbang sebanyak 1 gram Na Cmc, yang kemudian ditaburkan secara merata kedalam mortir yang telah berisi air suling panas sebanyak 50 ml. Didiamkan selama 15 menit hingga diperoleh warna transparan, lalu digerus hingga terbentuk gel kemudian diencerkan dengan sedikit

aquadest, dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml, lalu tambahkan aquadest samapai garis batas (Lengkey, 2022).

7. Penentuan dosis metformin

Dosis metformin yang biasa dikonsumsi orang dewasa adalah 500 mg, jadi dosis metformin yang diberikan pada tikus putih jantan dengan berat rata-rata 100 sampai 200 gram yaitu :

$$\begin{aligned} \text{Dosis metformin untuk tikus 200 g} &= 500 \text{ mg} \times 0,018 \\ &= 0,045 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

Dibuat larutan stok 100 ml dengan konsentrasi = 0,045 mg/ml

$$\text{Jumlah metformin } \frac{100 \text{ ml}}{2 \text{ ml}} \times 0,045 \text{ mg} = 2,25 \text{ mg}$$

Karena menggunakan tablet maka :

$$\text{Berat 20 tablet metformin} = 11,88 \text{ g} = 11.880 \text{ mg}$$

$$\text{Berat rata-rata} = \frac{11.880 \text{ mg}}{20 \text{ tab}} = 594 \text{ mg}$$

$$\text{Berat metformin yang ditimbang} = \frac{594 \text{ mg}}{500 \text{ mg}} \times 2,25 \text{ mg} = 2,67 \text{ mg}$$

8. Pembuatan larutan suspensi metformin

Ditimbang bobot rata-rata 20 tablet metformin 500 mg kemudian digerus hingga halus, ditimbang serbuk metformin sebanyak 2,67 mg. Masukkan Na Cmc kedalam mortir yang berisi 50 ml air panas, diamkan selama 15 menit hingga diperoleh Na Cmc dengan masa yang mengembang dan transparan, digerus hingga membentuk suspensi, taburkan metformin yang telah ditimbang lalu digerus hingga homogen kemudian ditambahkan dengan aquadest hingga tanda batas.

9. Pemeliharaan hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan dengan berat rata-rata 100 gram sebanyak 15 ekor yang dibagi dalam 5 kelompok yang terdiri dari 3 ekor tikus putih jantan. Sebelumnya hewan uji dipelihara selama 1 minggu pada kandangnya dan selalu dijaga kebersihannya. Tikus putih jantan yang digunakan adalah tikus putih jantan yang sehat yang ditandai dengan memperlihatkan gerakannya yang lincah.

10. Pengelompokan hewan uji

Pada pengelompokan hewan uji ini digunakan rumus Federer untuk menghitung berapa hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini. Rumus yang digunakan yaitu $(n-1)(t-1) \geq 15$, dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan. Perhitungan jumlah tikus putih jantan yang digunakan dengan rumus Federer adalah sebagai berikut :

$$(n-1)(t-1) = 15$$

$$(n-1)(5-1) = 15$$

$$(n-1)(4) = 15$$

$$n-1 = 15:4$$

$$n = 3,75 + 1 = 4,75 = 5 \text{ ekor}$$

11. Uji aktivitas antidiabetes

- a. Tikus putih jantan dipuasakan selama ± 8 jam setelah diadaptasikan selama 7 hari di tempat penelitian. Kemudian tikus putih jantan sebanyak 15 ekor dikelompokkan menjadi 5 kelompok yaitu K1, K2, K3, K4 dan K5 dengan cara diacak, dan masing-masing kelompok terdiri atas 3 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*).
- b. Tiap-tiap tikus sebelum diberi perlakuan diukur kadar glukosa dalam darah sebelum diberikan metformin dan 30 menit setelah diberikan metformin untuk mengetahui derajat peningkatan kadar glukosa dalam darah setelah pemberian metformin.
- c. Tikus diberikan metformin secara oral dengan dosis sesuai konversi dari mulut.
- d. 30 menit setelah diberikan sukrosa (gula pasir), ketika terjadi peningkatan kadar glukosa dalam darah, masing-masing kelompok diberi perlakuan dengan cara oral dalam bentuk larutan. K1 diberi metformin sebagai kontrol positif, K2 diberi Na Cmc 1% sebagai kontrol negatif, K3 diberi infusa brokoli (IB) dengan dosis 25% b/v, K4 diberi infusa brokoli (IB) dengan dosis 50% b/v, dan K5 diberi infusa brokoli (IB) dengan dosis 75% b/v.
- e. 30 menit setelah perlakuan, kadar glukosa diukur lagi sampai percobaan pada menit ke-120 dengan interval waktu 30 menit.

I. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan *Paired T Test* untuk melihat perbedaan antara sebelum dan sesudah perlakuan dan dilanjutkan dengan menggunakan uji *one way anova* untuk melihat perbandingan antara setiap konsentrasi hewan uji.