

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan penelitian *true ekperimental*. Penelitian ini menggunakan mencit sebanyak 27 ekor dengan masing-masing perlakuan 9 kali replikasi. Kelompok kontrol negatif digunakan untuk mengetahui berat badan mencit tanpa diberi perlakuan. Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini meliputi pembuatan seduhan daun tin, pembuatan seduhan kombucha, kemudian dilakukan fermentasi menggunakan kultur *kombucha*, identifikasi senyawa flavonoid, steroid dan tanin, pemberian seduhan serta kombucha kepada hewan uji (mencit), dan penimbangan berat badan hewan uji (mencit).

Tabel 3.1 Rancangan Penelitian Perlakuan

	Pakan pelet	Seduhan daun tin	Kombucha daun tin
Kontrol	√	-	-
Perlakuan 1 (P1)	√	√	-
Perlakuan 2 (P2)	√	-	√

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah daun tin dengan sampel seduhan daun tin dan kombucha daun tin.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal dan tempat sebagai berikut: Pada Noember 2018 - April 2019 dilakukan persiapan pembuatan Kombucha di Laboratorium Farmakologi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Pada penelitian ini terdapat dua variabel, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Seduhan dan Kombucha daun tin sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah penurunan berat badan pada mencit.

Tabel 3.2 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukuran	Skala Ukur
1.	Seduhan daun tin	Mencampur daun tin dalam air hangat hingga sari tercampur	<i>Spuit</i>	0,5mL/gBB	Nominal
2.	Kombucha daun tin	Daun tin yang telah di fermentasi oleh kultur kombuchs	<i>Spuit</i>	0,5mL/gBB	Nominal
3.	Penurunan berat badan menit	Kemampuan Kombucha dan seuhan daun tin untuk menurunkan berat badan mencit	Timbangan digital	Berat badan mencit dalam satuan mg	Nominal

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam proses penelitian ini antara lain sebagai berikut: digital, spuit, ayakan mesh 30.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam proses penelitian ini antara lain sebagai berikut: simplisia daun tin, kultur teh asam, aquadest, mencit, pakan mencit.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Tahapan Pembuatan Rajangan Daun Tin

Pembuatan simplisia daun tin dapat dilakukan dengan mengacu pada penelitian sebelumnya (Umami, 2017), dilakukan modifikasi yaitu sebagai berikut:

Diawali dengan pengumpulan bahan baku yaitu daun tin varietas *green yordania* dengan memilih daun yang masih muda hampir ke tua dan bewarna hijau segar. Selanjutnya dilakukan sortasi basah, setelah pemanenan daun di sortasi yaitu dengan cara membersihkan kotoran yang masih menempel pada daun serta pemilihan daun yang sehat. Pada proses selanjutnya daun tin dicuci bersih dengan air mengalir dan dilakukan proses perendaman. Kemudian daun tin diposisikan dalam keadaan berdiri selama 1 x 24 jam untuk menghilangkan getah dari daun tin. Selanjutnya dilakukan proses pengeringan dengan cara menghamparkan daun tin diatas paranet dan dipanaskan dengan sinar matahari langsung. Setelah itu dilakukan sortasi kering, dipilih daun yang sudah kering dan daun yang masih basah serta memisahkan daun dari kotoran yang masih menempel. Daun tin yang sudah kering kemudian diserbuk dengan memblender daun tin.

3.6.1 Tahapan Pembuatan Seduhan Daun Tin

Tahapan penelitian seduhan daun tin berdasarkan penelitian (Laksono, B, B 2018)

Sebagai berikut. Direbusan 1000 mL air di dalam panci stainless steel dengan suhu 70-75°C selama kurang lebih 5 menit, dibiarkan hingga hangat (sekitar 20-25°C) kemudian jika suhu sudah turun. masukkan simplisia daun tin sebanyak 0,5 g gram di dalam beakerglas. Ukur air 75 ml kemudian masukkan dalam

beakerglass yang telah berisi simplisia daun tin. aduk hingga larut setelah larut disaring seduhan daun tin. Letakan pada wadah yang sudah disiapkan.

3.6.2 Tahapan Pembuatan Kombucha

Pembuatan Kombucha mengacu pada penelitian (Hidayanti dkk, 2014), sebagai berikut. Direbusan 1000 mL air di dalam panci stainless steel dengan suhu 70-75°C selama kurang lebih 5 menit dan menambahkan gula pasir sebanyak 10% dari volume larutan (Naland, 2004), dibiarkan hingga hangat (sekitar 20-25°C) kemudian jika suhu sudah turun, masukkan simplisia daun tin sebanyak 7 gram aduk hingga larut setelah larut disaring seduhan daun tin. Selanjutnya dipindahkan ke dalam toples kaca. Kemudian difermentasi menggunakan kultur *kombucha* selama 12 hari dalam suhu ruang. Jika larutan sudah mencapai tingkat keasaman yang benar (pH 3-5,5), setelah proses fermentasi dilakukan pengangkatan kultur *kombucha* dan disaring untuk memisahkan ampas sisa dan Kombucha.

3.6.3 Identifikasi Senyawa Flavonoid

Identifikasi senyawa golongan flavonoid menurut (Harborne, 1987), dapat dilakukan dengan cara disiapkan sample kombucha dan seduhan daun tin sebanyak 2 mL. kemudian dibagi menjadi 2 yaitu digunakan untuk blanko dan satunya ditambahkan 0,5 gram serbuk Mg, 1 mL HCl pekat, dan 1 mL alkohol. Lalu campuran dikocok kuat-kuat. Dikatakan positif mengandung flavonoid jika ditandai dengan munculnya warna merah, kuning, atau jingga.

3.6.2 Identifikasi Senyawa Steroid

Identifikasi senyawa golongan steroid menurut (Harborne, 1987), dapat dilakukan dengan cara disiapkan sample kombucha dan seduhan daun tin sebanyak 2 mL. kemudian dibagi menjadi 2 yaitu digunakan untuk blanko dan satunya

ditambahkan 2 mL n-heksana ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard, 1 mL HCl pekat, dan 1 mL alkohol. Lalu campuran dikocok kuat-kuat. Dikatakan positif mengandung Steroid jika ditandai dengan munculnya warna biru kehijauan.

3.6.3 Identifikasi Senyawa Tanin

Identifikasi senyawa golongan tanin menurut (Harborne, 1987), dapat dilakukan dengan cara: disiapkan sample sebanyak 2 mL kemudian ditambahkan air panas dengan perbandingan yang sama. Kemudian ditambahkan FeCl_3 sebanyak 3 tetes., kemudian dilakukan pengocokkan. Adanya perubahan warna larutan menjadi hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin.

3.7 Persiapan Hewan Uji

3.7.1 Persiapan Hewan Uji

Persiapan hewan mengacu pada penelitian (Umami, S.R, dkk 2016) yang telah dimodifikasi.

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit. Mencit digunakan karena berkembang biak sangat cepat, dan 99% gennya mirip dengan manusia. Oleh karena itu mencit sangat representative jika digunakan sebagai model penyakit genetic manusia (bawaan). Selain itu, mencit juga sangat mudah untuk di rekayasa genetiknya sehingga menghasilkan model yang sesuai untuk berbagai macam penyakit manusia. Selain itu, mencit juga lebih menguntungkan dalam hal kemudahan penanganan, tempat penyimpanan, serta harganya yang relatif lebih murah. Mencit yang digunakan adalah mencit jantan hal ini dikarenakan mencit berkelamin jantan cenderung lebih baik sistem imun nya karena tidak dipengaruhi oleh hormon reproduksi. Hal ini disebabkan karena kadar hormon esterogen pada mencit jantan relatif rendah dibandingkan dengan mencit betina.

Untuk pakan makan mencit menggunakan pakan polar pada lampiran 4 dan ditambahkan kuning telur untuk mempercepat peningkatan berat badan lampiran 5 untuk mempercepat pertambahan berat badan mencit.

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 27 ekor mencit putih (*Mus musculus*) yang berumur lebih kurang 3 bulan dengan berat badan 20-30 gram. Hewan uji dibagi dalam 3 kelompok, yaitu 3 kelompok perlakuan (P1, P2, P3), dan kontrol (K). Masing-masing kelompok terdiri dari 9 ekor mencit. Sebelum diberikan perlakuan, semua hewan uji diaklimatisasi Selama 3 hari untuk mengadaptasikan mencit pada kondisi lingkungan.

3.7.2 Induksi pakan tinggi lemak

Induksi pakan tinggi lemak mengacu pada penelitian (Rusdi, M, dkk 2018)

Pembuatan pakan tinggi lemak dalam penelitian ini menggunakan kuning telur puyuh. Telur puyuh kemudian dipisahkan antara kuning dan putih telurnya. Lalu kuning telur dicampur homogen dengan pakan mencit. Proses induksi dilakukan selama 1 minggu dengan mencit telah mengalami pertambahan berat badan >25 gram.

3.7.2 Penentuan dosis kombucha daun tin

Penentuan dosis teh asam daun tin mengacu pada penelitian (Naland, 2004), yaitu pada usia dewasa atau 18 tahun ke atas dengan berat badan 50 kg adalah satu gelas ukuran 200 ml. Dosis teh asam daun tin yang digunakan pada penelitian ini berpatokan pada dosis tersebut, kemudian dosis tersebut dikonversikan ke dosis mencit berdasarkan konversi Paget dan Barnes yaitu setiap 20g/BB mencit setara dengan 0,0026 pada dosis manusia. Untuk perhitungan dosis teh asam daun tin dapat dilihat pada lampiran 3.

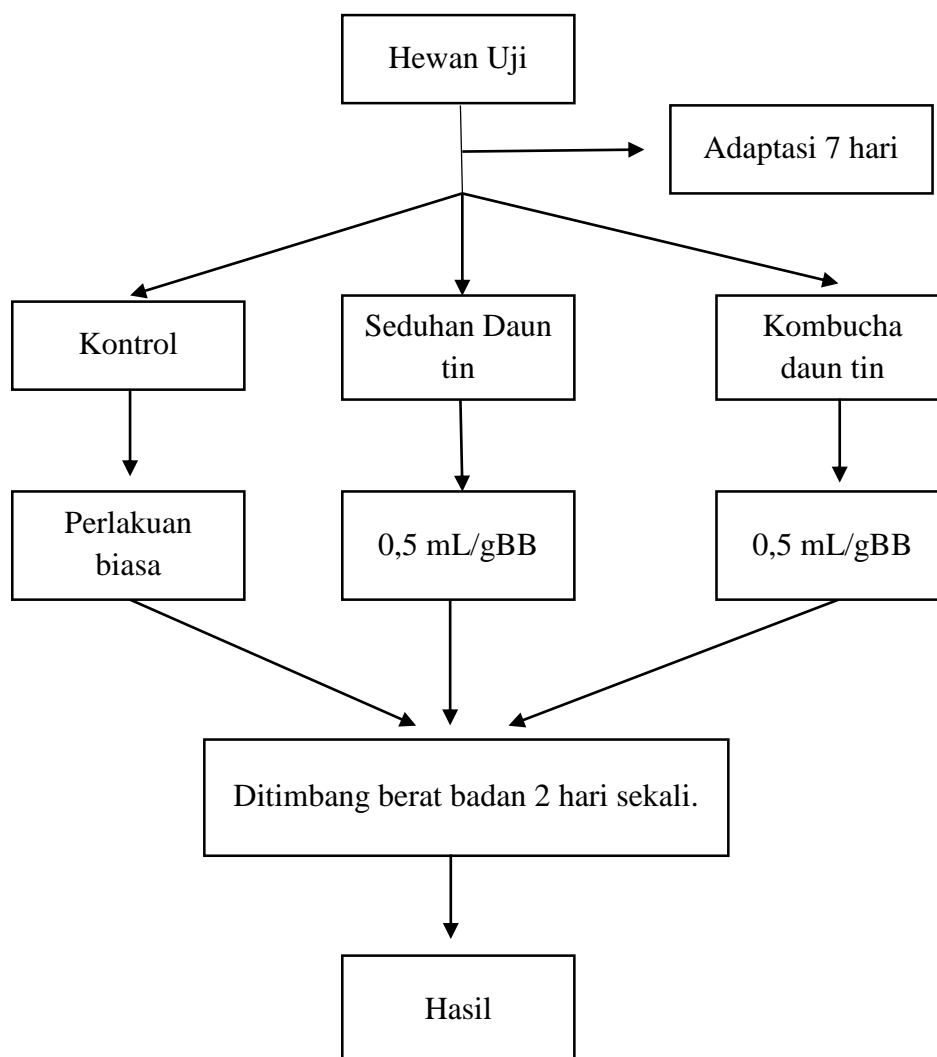
3.7.4 Perhitungan dosis seduhan daun tin

Penentuan dosis teh daun tin mengacu pada penelitian (Naland, 2004), yaitu pada usia dewasa atau 18 tahun ke atas dengan berat badan 50 kg adalah satu gelas ukuran 200 ml. Dosis teh asam daun tin yang digunakan pada penelitian ini berpatokan pada dosis tersebut, kemudian dosis tersebut dikonversikan kedosis mencit berdasarkan konversi Paget dan Barnes yaitu setiap 20g/BB mencit setara dengan 0,0026 pada dosis manusia. Untuk perhitungan dosis teh daun tin.

3.7.3 Perlakuan Hewan Uji

Perlakuan hewan uji berdasarkan penelitian (Ardiansyah, A, S, dkk. 2018)

Pemberian seduhan daun tin dan kombucha daun tin dilakukan pada hari ke-1 sampai hari ke 14. Pemberian perlakuan diberikan 0,5 mL/gBB setiap 1 hari sekali sampai hari ke-14. Setelah itu dicek penurunan berat badan setiap 2 hari sekali.



Gambar 3.1 Skema Prosedur Kerja

3.9 Analisis Data

Perlakuan pada masing-masing kelompok hewan uji menghasilkan data penurunan berat badan yang selanjutnya akan di uji dengan menggunakan analisis data *ONE WAY ANNOVA*. Jika sebaran data normal maka akan dilakukan uji *One Way Annova* jika ada perbedaan data perlu dilanjutkan uji *post hoc*.