

BAB IV

METODE PENELITIAN

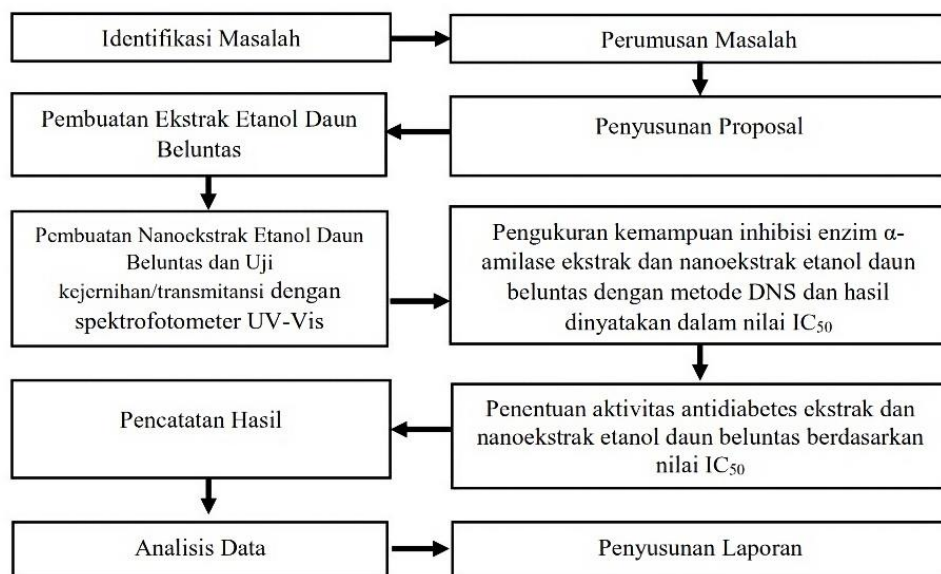
A. Jenis Penelitian

Metode kuantitatif dengan desain *Quasi Experimental* adalah jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini. Peneliti memilih desain *Quasi Experimental* karena dalam penelitian ini terdapat beberapa variabel berasal dari luar yang sulit atau tidak dapat dikontrol oleh peneliti.

Desain dalam penelitian ini adalah *quasi experimental design* dengan model *posttest only control group design* model ini membandingkan perlakuan antara dua kelompok yaitu kelompok kontrol dengan kelompok eksperimen (Sugiyono, 2013). Pada penelitian ini, kelompok kontrol adalah akarbosa, sedangkan kelompok eksperimen adalah ekstrak dan nano ekstrak.

B. Alur Penelitian

Berikut alur penelitian disajikan pada gambar dibawah ini:



Gambar 3 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat (P4TO) Karangasem Provinsi Bali, dan Laboratorium Kimia dan Toksikologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2024 hingga Mei 2025.

D. Sampel Penelitian dan Unit Analisis

1. Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak dan nano ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less) yang didapat dari proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan (1:5). Daun beluntas yang diekstraksi harus memenuhi kriteria, yaitu daun beluntas segar helai daun pertama sampai ketujuh dari setiap tangkai, tidak busuk, tidak berjamur, dan tidak berlubang.

2. Besar dan jumlah sampel

Untuk menentukan banyaknya sampel yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan pada jumlah kelompok perlakuan, sehingga banyaknya sampel ditentukan dengan rumus *Federer* sebagai berikut (Mushlih and Rosyidah, 2020):

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

Keterangan:

n : Jumlah sampel dalam tiap kelompok

t : Jumlah kelompok perlakuan

Pada penelitian ini terdapat tiga kelompok perlakuan, yaitu ekstrak, nano ekstrak, dan kontrol positif akar bosa, sehingga perhitungan dengan rumus *Federer* dalam menentukan banyaknya sampel di setiap kelompok sebagai berikut:

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

$$(n-1)(3-1) \geq 15$$

$$(n-1)(2) \geq 15$$

$$2n-2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8,5$$

Berdasarkan perhitungan sebelumnya, maka didapatkan banyaknya pengulangan untuk tiap kelompok yaitu sebanyak 9.

3. Unit analisis

Kemampuan inhibisi enzim α -amilase oleh ekstrak dan nano ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less) yang dinyatakan dalam nilai IC_{50} adalah unit analisis dari penelitian ini.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Data primer dan data sekunder merupakan jenis data yang digunakan dalam penelitian ini.

a) Data primer

Data yang dikumpulkan berupa data kuantitatif yaitu data primer melalui eksperimen laboratorium. Perolehan data primer berasal dari hasil pengukuran kemampuan inhibisi enzim α -amilase oleh ekstrak dan nano ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less).

b) Data sekunder

Jenis data yang digunakan berasal studi literatur merupakan data sekunder. Data sekunder berupa data publikasi dan tercatat dari berbagai sumber artikel penelitian.

2. Teknik pengumpulan data

Pengumpulan data dalam penelitian ini dengan teknik melakukan analisis eksperimen laboratorium. Daun beluntas pada penelitian ini dipilih menggunakan teknik *purposive sampling* berdasarkan kriteria yang pengambilannya dilakukan di daerah Desa Gulingan, Mengwi, Kabupaten Badung. Pengukuran kemampuan inhibisi enzim α -amilase oleh ekstrak dan nano ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less) dilakukan dengan alat spektrofotometer UV-Vis dengan metode Asam Dinitrosalisilat (DNS). Hasil pengukuran tersebut dinyatakan dalam nilai IC_{50} yang menggambarkan kemampuan ekstrak dan nano ekstrak etanol daun beluntas dalam menghambat aktivitas enzim α -amilase sebesar 50%.

3. Instrumen pengumpulan data

Dalam penelitian ini menggunakan instrumen berupa alat tulis, spektrofotometer dan kamera.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Alat

Alat yang akan diperlukan dalam penelitian ini adalah tabung serologis, *beaker glass*, gelas ukur, corong gelas, batang pengaduk, pipet tetes dan pipet volume (Phynex Iwaki Asahi), tabung *eppendorf*, *mikropipet*, tip *mikropipet*, rak tabung serologi, *refrigerator* (Dometic MP 370SG), *oven* (Elos), sentrifus (Gemmyco), *rotary evaporator* (Buchi Rotavapor R-300), *spektrofotometer* (Analytic Jena Specord 210-Plus), toples, *magnetic stirrer*, magnet bar dan *hotplate* merek (Jisico), ayakan, neraca analitik (Kern ABT220-4NM: 220g x 0.1mg) dan blender (Gearsa Getra).

2. Bahan

Berikut bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini, yaitu daun beluntas, Etanol 96% (Merck), kitosan 0,2% (Sigma Aldrich), Na-TPP 0,1% (Xilong-Scientific), stop solution (DNS) (Sigma Aldrich), akuabides (Onemed), Natrium tartrat (Sigma Aldrich), NaOH 2M (Sigma Aldrich), amilum (Sentra), *buffer fosfat* pH 6,9, acarbose (Acarbose), NaCl (Merck), Asam asetat glasial 1% (Merck), enzim α -amilase (Best), Natrium fosfat (Merck), HCl 1M (Merck), NaOH 1M (Sigma Aldrich).

3. Prosedur kerja

Terdapat 3 tahapan kerja dalam penelitian ini, yaitu pra-analitik, analitik dan pasca-analitik.

a. Pra-analitik

Tahapan pemeriksaan pra-analitik meliputi:

- 1) Persiapan alat dan bahan yang akan digunakan.

- 2) Menggunakan Alat Pelindung Diri (APD).
- 3) Pembuatan ekstrak etanol daun beluntas

Menurut (Habibah et al., 2023) prosedur pembuatan ekstrak etanol daun beluntas sebagai berikut:

- a) Daun beluntas dipetik sesuai keperluan, kemudian daun dibersihkan dari kotoran dengan cara dicuci dengan air mengalir.
- b) Dilakukan proses pemilahan sortasi basah untuk mendapatkan sampel sesuai dengan kriteria yang digunakan dalam penelitian.
- c) Untuk menghilangkan sisa air, daun beluntas ditiriskan.
- d) Kemudian daun beluntas ditimbang agar mengetahui masa awal sampel.
- e) Pengeringan, pembuatan serbuk, hingga uji kadar air daun beluntas dilakukan di laboratorium Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat (P4TO).
- f) Selanjutnya serbuk daun beluntas yang diperoleh ditimbang sebanyak 400 g.
- g) Kemudian serbuk daun beluntas dilarutkan dalam etanol 96% dengan perbandingan (1:5) hingga semua serbuk simplisia terendam.
- h) Proses maserasi dilakukan selama tiga hari dengan pengulangan sebanyak tiga kali untuk meningkatkan efektivitas proses ekstraksi.
- i) Pengadukan dilakukan setiap hari selama 15 menit agar etanol dapat mencapai seluruh bagian serbuk daun.
- j) Ekstrak yang didapat disaring dengan kertas *whatman* nomor 1.
- k) Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan *dalam rotary evaporator* pada suhu 30°C hingga diperoleh ekstrak pekat.
- l) Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian ditimbang dan disimpan dalam botol kaca gelap di kulkas pada suhu 4-8°C.

4) Pembuatan polimer kitosan 0,2%

Menurut (Ningsih et al., 2017) prosedur pembuatan polimer kitosan 0,2% sebagai berikut:

- a) Menimbang 0,2 g kitosan.
- b) Melarutkan kitosan ke dalam 100ml asam asetat glasial 1%.

5) Pembuatan Na-TPP (0,1%)

Menurut (Ramadhani dkk., 2021) prosedur pembuatan Na-TPP 0,1% sebagai berikut:

- a) Menimbang serbuk *sodium tripolifosfat* sebanyak 0,1 g.
 - b) Melarutkan serbuk Na-TPP dengan akuabides sebanyak 100 ml.
 - c) Mengaduk menggunakan *magnetic stirrer*.
- 6) Pembuatan nano ekstrak etanol daun beluntas

Menurut (Ramadhani dkk., 2021) prosedur pembuatan nano ekstrak etanol daun beluntas sebagai berikut:

- a) Menimbang 1 g ekstrak etanol daun beluntas.
- b) Melarutkan ekstrak dalam etanol (p.a) sebanyak 35 ml dicampur dengan 15 ml akuabides.
- c) Menambahkan dengan larutan kitosan 0,2% dengan volume 50 ml.
- d) Secara bertahap ke dalam campuran tersebut ditambahkan Na-TPP 0,1% dengan volume 10 ml.
- e) Menghomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 400 rpm selama 60 menit.
- f) Sentrifugasi untuk memisahkan nano ekstrak daun beluntas dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit.

- g) Supernatan dipisahkan dari pellet dan ambil bagian supernatannya.
- h) Mengukur transmitansi nano ekstrak menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 650 nm.

7) Pembuatan *stop solution* (DNS)

Menurut (MERCK, 2024) prosedur pembuatan *stop solution* (DNS) sebagai berikut:

- a) Membuat NaOH 2M dengan cara melarutkan 8 g NaOH ke dalam 100 mL akuabides.
- b) Larutan (1) menimbang sebanyak 149,6 mg kalium natrium tartrat 5,3M, kemudian melarutkannya dengan 100 mL NaOH dengan cara dipanaskan jangan sampai mendidih.
- c) Larutan (2) menimbang 2190 mg reagen (DNS) 3,5-dinitrosalisilat, kemudian melarutkannya dalam 100 mL akuabides dengan cara dipanaskan jangan sampai mendidih.
- d) Menyiapkan tabung baru, tambahkan sebanyak 12 mL akuabides dengan suhu (50-70°C), kemudian tambahkan secara perlahan sebanyak 8 mL larutan (1) dan 20 mL larutan (2) dan homogenkan.

8) Pembuatan substrat (amilum 0,5%)

Menurut (L. Wulandari et al., 2020) prosedur pembuatan substrat sebagai berikut:

- a) Menimbang sebanyak 0,05 g amilum.
- b) Melarutkan amilum dengan 10 ml *buffer fosfat* pH 6,9 pada labu ukur.
- c) Memanaskan di atas *hot plate* hingga larut.

9) Pembuatan enzim α -amilase

Menurut (L. Wulandari et al., 2020) prosedur pembuatan enzim α -amilase sebagai berikut:

- a) Menimbang 20 mg enzim α -amilase.
- b) Melarutkan enzim ke dalam 10 ml *buffer fosfat* pH 6,9.
- c) Menyimpan enzim dalam suhu rendah $\leq 25^{\circ}\text{C}$

10) Pembuatan NaOH 1M

Menurut (MERCK, 2024) prosedur pembuatan NaOH 1M, sebagai berikut:

- a) Menimbang 1 g NaOH.
- b) Kemudian melarutkan serbuk NaOH dengan 25 mL akuabides sampai homogen.

11) Pembuatan HCl 1M

Menurut (MERCK, 2024) prosedur pembuatan HCl 1M, sebagai berikut:

- a) Menyiapkan 2,075 mL larutan HCl.
- b) Melarutkan dengan 25 mL akuabides dan homogenkan.

12) Pembuatan *buffer fosfat* pH 6,9

Menurut (MERCK, 2024) prosedur pembuatan *buffer fosfat* pH 6,9 sebagai berikut:

- a) Menyiapkan larutan natrium fosfat sebanyak 240 mg dilarutkan dalam 40 mL akuabides.
- b) Menyiapkan 39 mg natrium klorida dilarutkan dalam 40 mL akuabides.

- c) Kemudian kedua larutan diatas dicampur dan ditambahkan NaOH/HCl 1M hingga pH mencapai 6,9 pada suhu 20°C.

13) Pembuatan larutan induk ekstrak etanol daun beluntas 500 ppm

Prosedur pembuatan larutan induk ekstrak etanol daun beluntas 500 ppm sebagai berikut:

- a) Menimbang 5 mg ekstrak pekat etanol daun beluntas.
- b) Melarutkan ekstrak dengan 10 ml buffer fosfat pH 6.9 kemudian dihomogenkan.

14) Pembuatan larutan induk nano ekstrak etanol daun beluntas 500 ppm

Prosedur pembuatan larutan induk nano ekstrak etanol daun beluntas 500 ppm sebagai berikut:

- a) Memipet 0,5 ml nano ekstrak etanol daun beluntas dan masukkan dalam labu ukur 10 ml.
- b) Melarutkan dengan buffer fosfat pH hingga tanda batas kemudian homogenkan.

15) Pembuatan larutan induk kontrol positif (akarbosa) 500 ppm

Prosedur pembuatan larutan induk kontrol positif (akarbosa) 100 ppm sebagai berikut:

- a) Menggerus obat akarbosa hingga halus menggunakan mortar.
- b) Menimbang serbuk akarbosa sebanyak 2,5 mg kemudian memasukkannya ke dalam labu ukur 25 ml.
- c) Melarutkan dengan buffer fosfat pH 6.9 hingga tanda batas kemudian homogenkan.

b. Analitik

1) Pengukuran Inhibisi Enzim α -amilase Ekstrak dan Nano ekstrak Etanol Daun Beluntas

Menurut (Mojica et al., 2015 dan Kusmiyati dkk., 2023) prosedur pengukuran inhibisi enzim α -amilase ekstrak dan nano ekstrak etanol daun beluntas, sebagai berikut:

- a) Menyiapkan 6 tabung reaksi, beri label kemudian dipipet dan dimasukkan larutan induk sampel (ekstrak dan nano ekstrak) 500 ppm yang sudah disiapkan ke dalam masing-masing tabung reaksi untuk memperoleh seri konsentrasi 0, 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm.
- b) Menyiapkan 6 tabung reaksi, beri label kemudian dipipet dan masukkan larutan induk kontrol positif (akarbosa) 100 ppm yang telah disiapkan ke dalam masing-masing tabung reaksi untuk memperoleh seri konsentrasi 0, 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm.
- c) Dari masing-masing larutan ditambahkan 250 μ l enzim kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit.
- d) Selanjutnya ditambah 250 μ l substrat amilum 0,5% ke dalam larutan dan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C.
- e) Menambahkan 500 μ l *stop solution* (DNS) dan dipanaskan dalam air mendidih dalam waktu 5 menit di atas hot plate. Kemudian larutan didinginkan hingga suhu ruang.
- f) Mengencerkan masing-masing larutan dengan cara menambahkan 5 ml *pure water*.

- g) Campuran larutan dianalisis absorbansinya dengan spektrofotometer panjang gelombang 531 nm dengan 3 kali replikasi.
- h) Menghitung nilai %inhibisi dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{K - S}{K} \times 100\%$$

Keterangan:

K = Absorbansi kontrol negatif

S = Absorbansi sampel/kontrol positif

- i) Selanjutnya menghitung nilai IC_{50} dengan rumus berikut:

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b}$$

- 2) Pengukuran aktivitas antidiabetes ekstrak dan nano ekstrak etanol daun beluntas dibandingkan dengan kontrol positif (akarbosa) dengan membandingkan rata-rata dari nilai IC_{50} .

c. Pasca-analitik

- 1) Pencatatan dan interpretasi hasil nilai IC_{50} berdasarkan kategori, berikut

(Anugrahini and Wahyuni, 2021).:

$IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ sangat kuat

$IC_{50} 50\text{-}100 \mu\text{g/mL}$ kuat,

$IC_{50} > 100\text{-}150 \mu\text{g/mL}$ sedang,

$IC_{50} > 150\text{-}200 \mu\text{g/mL}$ lemah

$IC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ sangat lemah

4. Pengolahan dan analisis data

1) Teknik pengolahan data

Data aktivitas inhibisi enzim α -amilase oleh ekstrak dan nano ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less) dinyatakan dalam nilai IC₅₀ dan diolah menggunakan teknik sebagai berikut:

- a) *Editing*, adalah proses evaluasi untuk menilai apakah kriteria data yang digunakan untuk menjawab pertanyaan penelitian sudah memenuhi syarat kelengkapan, konsistensi dan penerapan yang diperlukan.
- b) *Coding*, tahapan data diberi kode untuk mengonversi informasi kualitatif menjadi format kuantitatif. Kode data penting dalam berbagai jenis pemrosesan data, baik melalui kode manual maupun dengan program komputer.
- c) *Data entry*, tindakan menganalisis data yang sudah diberi kode dengan memberikan informasi tersebut ke dalam program SPSS.
- d) *Tabulating data* adalah data yang dilaporkan dalam bentuk tabel naratif sesuai dengan kebutuhan analisis dalam penelitian.

2) Analisis data

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini dengan bantuan *software computer*, data yang dikumpulkan kemudian dianalisis.

a. Analisis deskriptif

Analisis deskriptif berfungsi untuk mengetahui karakteristik data secara sistematis, seperti rata-rata (mean), standar deviasi setiap pengulangan pada setiap kelompok perlakuan (Yam, 2020).

b. Analisis bivariat

Analisis bivariat digunakan untuk menganalisis perbedaan antara dua variabel (Senjaya *et al.*, 2022). Pada penelitian ini, digunakan untuk menganalisis perbedaan aktivitas antidiabetes kelompok perlakuan (ekstrak, nano ekstrak etanol daun beluntas) terhadap kelompok kontrol positif (akarbosa).

a) Analisis distribusi data

Shapiro Wilk dilakukan untuk mengetahui normalitas data uji, data berdistribusi normal apabila nilai sig. > 0,05 sedangkan jika nilai sig.< 0,05 data berdistribusi tidak normal, selanjutnya uji dilakukan dengan *Kruskal Wallis*.

b) Analisis homogenitas data

Uji homogenitas merupakan tahapan uji statistik berfungsi untuk menunjukkan bahwa data sampel berasal dari populasi yang mempunyai variasi yang sama. Salah satu cara untuk uji homogenitas dengan uji Levene yang menggambarkan data homogen apabila sig. >0,05 hal ini menandakan bisa dilanjutkan ke uji ANOVA. Apabila nilai sig.<0,05 maka data dinyatakan tidak homogen dan dapat dilanjutkan dengan uji non-parametrik seperti *Kruskal Wallis*.

c) Uji Statistik *One Way ANOVA*

Pengujian ini digunakan jika data yang didapatkan berdistribusi normal. Sedangkan apabila distribusi data tidak normal, maka masing-masing kelompok perlakuan dianalisis dengan uji statistik Nonparametrik *Kruskal Wallis*. Teknik analisis pengujian ini digunakan untuk melihat perbedaan aktivitas antidiabetes ekstrak, nano ekstrak etanol daun beluntas dibandingkan dengan kontrol positif (akarbosa). H_0 menyatakan bahwa aktivitas antidiabetes ekstrak, nano ekstrak

etanol daun beluntas tidak ada perbedaan dalam inhibisi enzim α -amilase jika dibandingkan dengan kontrol positif akarbosa (tidak berbeda nyata), sedangkan H_1 menyatakan bahwa aktivitas antidiabetes ekstrak, nano ekstrak etanol daun beluntas terdapat perbedaan dalam inhibisi enzim α -amilase dibandingkan dengan kontrol positif akarbosa (berbeda nyata). Kriteria signifikansi ditetapkan sesuai dengan hasil uji statistik.

d) Analisis *Post Hoc Test (Tukey Test)*

Analisis lanjutan dalam uji *One Way ANOVA* apabila nilai sig. $< 0,05$ yaitu *Tukey Test* untuk melihat apakah terdapat perbedaan aktivitas antidiabetes yang lebih spesifik antara ekstrak, nano ekstrak, dan kontrol positif akarbosa.