

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mentimun segar yang didapat dari kebun mentimun margasari Karawang, etanol 96%, NaCl, PTU, simvastatin 20 mg, tikus jantan dengan galur Sprague Dawley yang berumur 4-5 bulan dan berat badan berkisar 200-350 g sebanyak 25 ekor, air mineral,

3.2 Alat Penelitian

Gelas kimia (Pyrex), erlenmeyer (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), pipet tetes, blender, oven, vacuum rotary evaporator, kertas saring, timbangan hewan, timbangan analitik, sonde oral, kandang tikus, tempat makanan dan botol minum tikus.

3.3 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Bahan Alam, Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian dilakukan sejak bulan Maret hingga bulan Juli 2022.

3.4 Prosedur Penelitian

Rancangan penelitian menggunakan eksperimental murni dengan pendekatan *randomized control group pretest posttest* dengan pendekatan rancangan acak lengkap (RAL) dengan menguji penurunan kadar kolesterol tikus dengan 3 variasi dosis ekstrak kulit mentimun yang ditentukan dengan orientasi dimana tiap pengujian dilakukan secara tiga kali ulangan. Sebanyak 25 ekor tikus akan dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok 1 (kontrol negatif), kelompok 2 (kontrol positif (pembeding)), kelompok 3 (ekstrak dosis 125 mg/KgBB), kelompok 4 (ekstrak dosis 150 mg/KgBB), dan kelompok 5 (ekstrak dosis 175 mg/KgBB).

3.4.1 Penyiapan Bahan

Bahan yang digunakan adalah mentimun yang masih utuh dan matang. Mentimun dibersihkan dari kotoran yang menempel dan dicuci dengan air mengalir. Mentimun kemudian dikupas dengan pisau bersih dan steril untuk memisahkan buah dan kulit mentimun. Kulit mentimun yang diperoleh kemudian

dikeringkan di ruang terbuka, namun dikarenakan cuaca yang terkadang hujan sehingga kulit mentimun juga dikeringkan dengan cara dioven. Proses pengeringan dilakukan selama 5 hari. Setelah kering, kulit mentimun dimixer hingga menjadi bubuk.

3.4.2 Pembuatan Ekstrak

Ekstrak diperoleh dengan metode maserasi. Serbuk kulit mentimun (*Cucumis sativus* L.) diayak dengan ayakan 20/40 dan ditimbang 300 gram, kemudian dimasukkan ke dalam wadah tertutup dan direndam dalam 2250 ml etanol 96% sebagai cairan penyaringnya sampai serbuk terendam dan wadah terisi kemudian ditutupi oleh serbet kain. Perendaman dilakukan selama 5 hari dan diaduk setiap 3-4 jam selama 10 menit. Setelah 5 hari, ekstrak sarinya dan ekstrak residunya diperas. Kemudian ampas ditambahkan 750 ml pelarut etanol 96% (Putri, 2020).

Kemudian tutup wadah dengan serbet kain, biarkan di tempat sejuk, kering dan terlindung dari cahaya selama 2 hari, tanpa diaduk. Endapan kemudian dipisahkan dengan kertas saring untuk mencegah endapan yang mengandung pengotor terperangkap selama penyaringan dan mempengaruhi pengukuran absorbansi pada spektrometer. Filtrat digabungkan dan dipekatkan dalam rotary evaporator pada 40°C untuk mendapatkan ekstrak kental (Putri, 2020).

3.4.3 Skrining Fitokimia

a. Uji flavonoid

Tambahkan ke larutan ekstrak serbuk magnesium dan 1 ml asam klorida pekat. Perubahan warna dari orange-merah menjadi ungu-merah menunjukkan adanya flavonoid (Lutfita, 2012).

b. Uji saponin

Ekstrak ditempatkan dalam tabung reaksi dan dipanaskan dalam penangas air selama 2-3 menit. Dinginkan larutan, lalu kocok kuat-kuat selama 10 detik. Adanya saponin jika busa stabil terbentuk hingga 1-10 cm. (Lutfita, 2012).

c. Uji alkaloid

Larutan hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi dan ditambahkan pereaksi Mayer pada salah satu tabung reaksi, jika terdapat alkaloid akan membentuk endapan berwarna putih. Salah satu tabung ditambahkan pereaksi Dragendorff, adanya alkaloid jika terbentuk endapan kuning-oranye. (Amin, 2015).

d. Uji steroid

Tambahkan asam asetat anhidrat dan 4-5 tetes asam sulfat ke dalam 1 ml ekstrak. Hasil menunjukkan adanya steroid jika warnanya berubah menjadi hijau. (Lutfita, 2012).

3.4.4 Pembuatan Suspensi Simvastatin

Dosis simvastatin pada manusia dewasa yaitu 20 mg per hari, kemudian dikonversi ke tikus dengan berat 200 g adalah 0,018 maka dosis yang diberikan untuk tikus adalah 0,36 mg/KgBB. Simvastatin 20 mg dilarutkan dengan larutan CMC 0,1% hingga 100 mL dan dikocok homogen.

3.4.5 Penanganan Hewan Coba

Tikus diadaptasikan dengan lingkungannya seperti tempat tinggal, makanan, dan minumannya selama 7 hari. Kemudian setelah adaptasi selesai, tikus kemudian dibagi secara acak menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus.

Tabel 3.1 Pembagian kelompok tikus

No	Kelompok	Berat Badan (g)	Perlakuan
1	Kontrol negatif	330	Diberikan kuning telur dan induksi PTU
		350	
		335	
		300	
		365	
2	Kontrol positif	240	Diberikan kuning telur, induksi PTU, dan simvastatin
		315	
		320	
		380	
		325	
3	Dosis 125 mg/KgBB	355	Diberikan kuning telur, induksi PTU, dan ekstrak kulit
		272	
		325	

		375	mentimun
		340	
4	Dosis 150 mg/KgBB	352	Diberikan kuning telur, induksi PTU, dan ekstrak kulit
		320	
		250	
		345	mentimun
		350	
5	Dosis 175 mg/KgBB	340	Diberikan kuning telur, induksi PTU, dan ekstrak kulit
		365	
		340	
		255	mentimun
		315	

3.4.6 Percobaan

Kadar kolesterol awal diukur pada hari ke-0 penelitian sebelum perlakuan apapun pada tikus yang dimaksudkan sebagai nilai rujukan normal kadar kolesterol pada tikus. Tikus diberi makanan lemak tinggi dan diinduksi PTU pada setiap kelompok percobaan untuk menaikkan kadar kolesterolnya. Pakan tinggi lemak dibuat dengan mencampur kuning telur kedalam pakan standar.

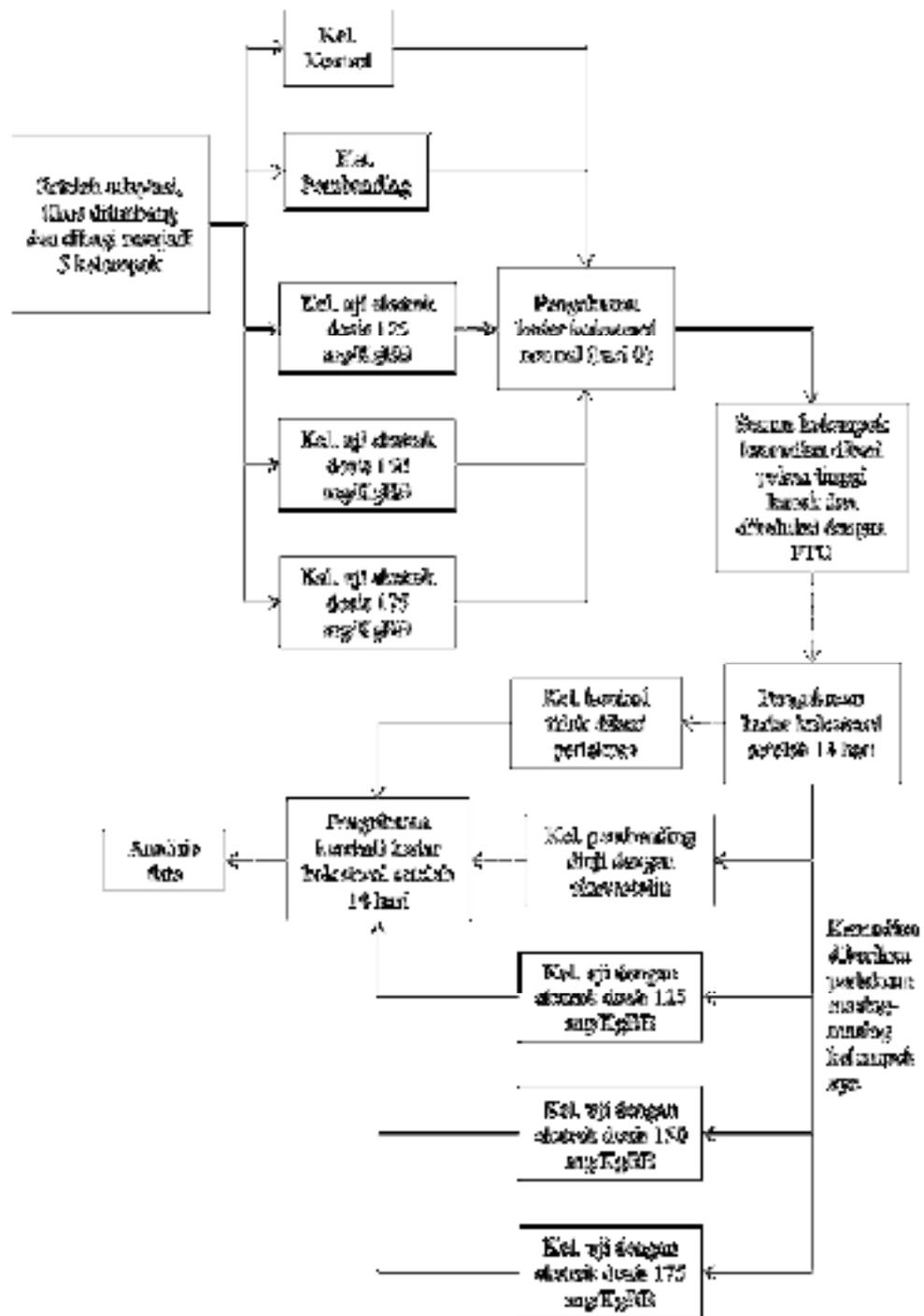
Empat belas hari kemudian dilakukan pengukuran kadar kolesterol tikus (pretest) untuk memastikan adanya kenaikan kadar kolesterol. Pemberian ekstrak kulit mentimun diberikan selama 14 hari (hari ke 14 sampai hari ke 28). Dosis yang diberikan berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, yaitu mengambil ekstrak dengan konsentrasi 125, 150, dan 175 ppm yang dikonversi ke untuk diberikan ke tikus menjadi 125 mg/KgBB, 150 mg/KgBB, dan 175 mg/KgBB. Kemudian melakukan pengukuran kadar kolesterol pada tikus pada hari ke-28 (posttest) untuk memastikan adanya penurunan kadar kolesterol.

3.4.7 Cara pengambilan darah

Pengambilan darah dilakukan dengan cara tikus dibius dengan menggunakan eter untuk membuat tikus tidak sadarkan diri. Kemudian tikus dijepit bagian tengkuknya dengan jari tangan. Pipa kapiler hematokrit digoreskan pada reto orbital pleksus hingga melukai pleksus, kemudian darah ditampung pada tabung EDTA. Darah tikus yang diambil dari tiap tikusnya adalah 1-1,5 ml. Darah kemudian diamkan selama 15 menit kemudian disentrifugasi selama 15

menit dengan kecepatan 3.000 rpm untuk memperoleh serum darah. Serum darah yang didapat kemudian dipipet menggunakan pipet mikro dan dimasukkan kedalam tabung Effendorf dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 10 menit. Pemeriksaan kadar kolesterol tikus dengan menggunakan metode *CHOD-PAP Enzymatic Colorimeter Test*.





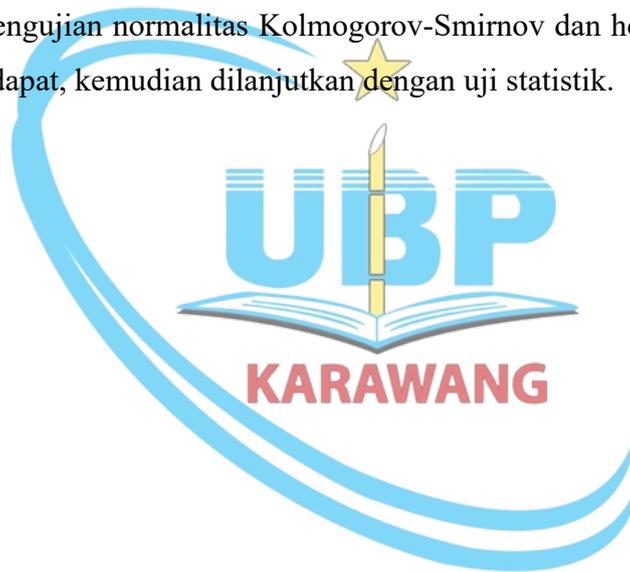
Gambar 3.1 Alur Penelitian

Dapat dilihat dalam gambar 3.1, setelah dilakukan adaptasi tikus ditimbang dan kemudian dibagi menjadi 5 kelompok dengan masing-masing perlakuan dan diukur kadar kolesteralnya sebagai acuan kadar kolesterol normal tikus. Tikus kemudian diberikan pakan tinggi lemak dan induksi PTU untuk

menaikkan kadar kolesterol tikus selama 14 hari. Setelah 14 hari kadar kolesterol tikus diukur kembali untuk memastikan kenaikan kadar kolesterol tikus. Kemudian masing-masing kelompok tikus diberi perlakuan untuk menaikkan kadar kolesterolnya selama 14 hari. Setelah hari ke-28, dilakukan pengecekan kadar kolesterol tikus untuk memastikan penurunan kadar kolesterol tikus. Setelah itu dilakukan analisis data.

3.5 Analisis Data

Analisis statistik digunakan *one-way* ANOVA ($\alpha = 0,05$) untuk menganalisis hasil pengamatan penurunan kadar kolesterol dalam darah. Dilakukan pengujian normalitas Kolmogorov-Smirnov dan homogenitas terhadap data yang didapat, kemudian dilanjutkan dengan uji statistik.



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil determinasi yang dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong menunjukkan bahwa mentimun yang digunakan dalam penelitian ini adalah mentimun jenis *Cucumis sativus* L dan suku Cucurbitaceae. Hasil skrining fitokimia yang dilakukan dalam penelitian ini ditunjukkan dalam tabel 4.1 dibawah ini:

Tabel 4.1 Hasil penapisan fitokimia

Golongan Senyawa	Reagen	Reaksi	Hasil
Flavonoid	Serbuk magnesium	Perubahan warna menjadi merah jingga	+
Alkaloid	Mayer dan dragendorff	Terbentuk endapan putih pada reagen mayer dan endapan kuning jingga pada reagen dragendorff	+
Saponin	-	Dipanaskan dan dikocok hingga menghasilkan busa	+
Steroid	Asam asetat anhidrat	Perubahan warna menjadi hijau	+

Keterangan: + = Teridentifikasi adanya senyawa metabolit yang diuji

- = Tidak ada reagen

Dapat dilihat pada tabel 4.1 bahwa ekstrak etanol kulit mentimun memiliki kandungan flavonoid, steroid, saponin, dan alkaloid. Penelitian lain yang dilakukan (Sheila *et al*, 2018) menunjukkan bahwa ekstrak kulit mentimun juga mengandung senyawa diterpen dan glikosida. Selain itu senyawa fenolik juga ditemukan dalam penelitian lainnya (Wanna C, 2019).

Ekstraksi kulit mentimun menggunakan metode maserasi. Serbuk simplisia kulit mentimun yang digunakan sebanyak 300 g yang kemudian direndam dengan pelarut etanol 96%. Pelarut etanol digunakan karena sifatnya yang polar, mudah didapat, dan tidak beracun. Hasil ekstraksi yang diperoleh adalah sebanyak 24,32

g sehingga rendeman yang diperoleh adalah 8,107%. Perhitungan persen rendeman:

$$\begin{aligned}\% \text{ rendeman} &= \frac{\text{bobot ekstrak yang didapat}}{\text{bobot serbuk simplisia yang diekstraksi}} \times 100\% \\ &= \frac{24,32 \text{ g}}{300 \text{ g}} \times 100\% = 8,107\%\end{aligned}$$

Dalam penelitian ini digunakan ekstrak kulit mentimun (*Cucumis sativus* L.) dengan menggunakan pelarut berupa etanol 96%. Dalam penelitian yang telah dilakukan (Putri, 2020) secara spektrofotometri UV-Visibel, nilai EC₅₀ dicapai pada konsentrasi 122,040 ppm yang kemudian disimpulkan bahwa ekstrak etanol kulit mentimun dapat menurunkan kadar kolesterol. Dari hasil uji inilah kemudian peneliti menggunakan tiga dosis ekstrak untuk pengujian, yaitu 125 mg/KgBB, 150 mg/KgBB, dan 175 mg/KgBB. Kontrol yang digunakan dalam penelitian ini adalah kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif menggunakan simvastatin sebagai obat pembanding antikolesterol yang terbukti khasiatnya dan kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan.

Subjek penelitian yang digunakan adalah tikus putih. Tikus putih yang digunakan adalah tikus jantan galur Sprague-Dawley yang berusia 4-5 bulan dengan berat badan berkisar 250-370 g sebanyak 25 ekor. Tikus kemudian diaklimatisasi selama satu minggu untuk beradaptasi dengan lingkungannya. Tikus kemudian akan dibagi menjadi lima kelompok yang dilakukan secara random untuk memastikan tidak terjadi bias dalam pengujiannya nanti.

Pada hari ke-0 sebelum tikus diberikan induksi dan perlakuan, dilakukan pengukuran kadar kolesterol pada semua tikus untuk mengetahui kadar kolesterol normalnya. Kemudian setiap kelompok tikus akan diberikan induksi PTU secara oral dan kuning telur yang dicampur dengan pakan standar untuk menaikkan kadar kolesterol tikus. Propiltiourasil (PTU) merupakan antagonis hormon tiroid, pada keadaan normal hormon tiroid dapat meningkatkan metabolisme lemak dengan cara meningkatkan pembentukan reseptor LDL pada sel-sel hati, sehingga terjadi pemindahan LDL yang cepat dari plasma dan sekresi lipoprotein kolesterol oleh sel-sel hati. Dengan demikian, PTU akan menurunkan produksi hormon tiroid sehingga metabolisme lemak juga akan menurun. Setelah 14 hari perlakuan,

dilakukan pengukuran kadar kolesterol pada tikus untuk memastikan adanya kenaikan kadar kolesterol. Pada hari yang sama tikus kemudian diberikan perlakuan dengan masing-masing bahan uji dan pembandingnya, yaitu ekstrak kulit mentimun dengan dosis 125 mg/KgBB, 150 mg/KgBB, 175 mg/KgBB, dan simvastatin yang diberikan secara oral. Perlakuan dilakukan selama 14 hari dan dilakukan pengukuran kembali pada hari ke-28 untuk memastikan ada tidaknya penurunan kadar kolesterol tikus.

Tabel 4.2 Kadar kolesterol tikus normal

Kadar Kolesterol Tikus Normal					
No	Kontrol +	Kontrol -	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3
1	55,5	75,4	88,3	80,2	79,3
2	67,6	80,5	50,4	70,4	83,3
3	69,3	76,8	70,2	55,3	77,2
4	85,8	70,1	88,3	80,6	50,6
5	70,7	82,3	80,1	80,2	68,8
Rata2	69,78	77,02	75,46	73,34	71,84
SD	10,80	4,76	15,87	10,96	13,00

Keterangan:

Dosis 1 = Dosis 125 mg/KgBB

Dosis 2 = Dosis 150 mg/KgBB

Dosis 3 = Dosis 175 mg/KgBB

Tabel 4.3 Kadar kolesterol tikus sebelum perlakuan

Kadar Kolesterol Sebelum Perlakuan					
No	Kontrol+	Kontrol -	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3
1	60,4	81,3	95,4	88,4	85,4
2	75,3	85,6	56,2	78,5	90,6
3	76,2	83,7	76,2	62,5	84,7
4	93,5	78,5	93,1	87,5	57,5
5	78,6	90,3	87,3	86,3	75,1
Rata2	76,8	83,88	81,64	80,64	78,66
SD	11,77	4,47	16,04	10,87	13,09

Keterangan:

Dosis 1 = Dosis 125 mg/KgBB

Dosis 2 = Dosis 150 mg/KgBB

Dosis 3 = Dosis 175 mg/KgBB

Dalam tabel 4.3, dapat dilihat terjadi kenaikan kadar kolesterol setelah tikus diinduksi PTU dan diberi makan kuning telur.

Tabel 4.4 Kadar kolesterol tikus sesudah perlakuan

Kadar Kolesterol Setelah Perlakuan					
No	Kontrol +	Kontrol -	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3
1	50,2	90,2	87,4	79,6	75,2
2	65,3	92,2	48,5	70,1	80,6
3	65,1	91,1	70,7	53,3	74,3
4	82,5	87,5	86,6	78,4	49,3
5	67,6	98,6	78,3	77,4	67,2
Rata2	66,14	91,92	74,3	71,76	69,32
SD	11,46	4,12	15,95	10,96	12,16

Keterangan:

Dosis 1 = Dosis 125 mg/KgBB

Dosis 2 = Dosis 150 mg/KgBB

Dosis 3 = Dosis 175 mg/KgBB

Dalam tabel 4.4 dapat dilihat terjadi penurunan kadar kolesterol setelah tikus diberi perlakuan

Tabel 4.5 Nilai Rerata dan Standar Deviasi Kadar Kolesterol Tikus

Rerata dan Standar Deviasi kadar kolesterol tikus			
Kelompok	H0	H14	H28
Kontrol +	69,78 ± 10,80	76,80 ± 11,77	66,14 ± 11,46
Kontrol -	77,02 ± 4,76	83,88 ± 4,47	91,92 ± 4,12
Dosis 125 mg/KgBB	75,46 ± 15,87	81,64 ± 16,04	74,30 ± 15,95
Dosis 150 mg/KgBB	73,34 ± 10,96	80,64 ± 10,87	71,76 ± 10,96
Dosis 175 mg/KgBB	71,84 ± 13,00	78,66 ± 13,09	69,32 ± 12,16

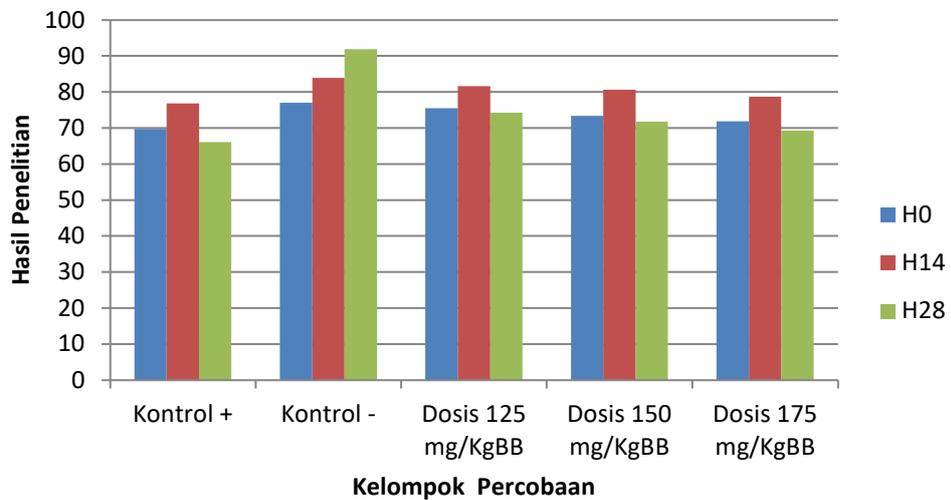
Keterangan :

H0 : hari ke-0 (kadar kolesterol normal)

H14 : hari ke-14 (kadar kolesterol sebelum perlakuan)

H28 : hari ke-28 (kadar kolesterol setelah perlakuan)

Rata-rata kadar kolesterol tikus



Gambar 4.1 Grafik rata-rata kadar kolesterol tikus

Berdasarkan data dalam tabel 4.5, kadar kolesterol tikus normal mengalami kenaikan setelah diberikan perlakuan induksi PTU dan kuning telur. Data juga menunjukkan bahwa terjadi penurunan kadar kolesterol pada tikus setelah diberi perlakuan. Dari ketiga dosis ekstrak yang diberikan, dapat dilihat bahwa masing-masing dosis dapat menurunkan kadar kolesterol tikus namun tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Sebagai pembandingan, simvastatin juga menunjukkan penurunan kadar kolesterol pada tikus.

Pada kontrol positif yang menggunakan simvastatin sebagai pembandingan terjadi penurunan kadar kolesterol dari 76,80 menjadi 66,14, turun sebesar 10,66. Pada ekstrak dosis 125 mg/KgBB terjadi penurunan kadar kolesterol dari 81,64 menjadi 74,30, turun sebesar 7,34. Pada ekstrak dosis 150 mg/KgBB terjadi penurunan kadar kolesterol dari 80,64 menjadi 71,76, turun sebesar 8,88. Pada ekstrak dosis 175 mg/KgBB terjadi penurunan kadar kolesterol dari 78,66 menjadi 69,32, turun sebesar 9,34. Sedangkan pada kontrol negatif yang tidak diberikan perlakuan apapun terjadi kenaikan kadar kolesterol dari 83,88 menjadi 91,92, naik sebesar 8,04. Perhitungan persentase penurunan kadar kolesterol tikus, yaitu:

$$\% \text{ Penurunan} = \frac{\text{kadar awal} - \text{kadar akhir}}{\text{kadar awal}} \times 100\%$$

Tabel 4.6 Persentase penurunan kadar kolesterol tikus (%)

Kelompok Perlakuan	Persentase penurunan Kadar Kolesterol Tikus (%)
Kontrol positif (pembanding)	13.88
Kontrol negatif	-9.58
Dosis 125 mg/KgBB	8.99
Dosis 150 mg/KgBB	11.01
Dosis 175 mg/KgBB	11.87

Penelitian lain juga menunjukkan bahwa kulit mentimun bisa digunakan sebagai penangkal radikal bebas (Wanna, 2019). Hal ini dikarenakan pada kulit mentimun mengandung senyawa fenol. Senyawa fenol merupakan metabolit sekunder dan sebagian besar senyawa fenolik adalah flavonoid dan asam fenolat. Senyawa fenol memiliki potensi aktivitas antioksidan, sehingga banyak digunakan untuk pencegahan penyakit.

Dalam ekstrak etanol kulit mentimun ditemukan senyawa flavonoid. Flavonoid dapat menurunkan kadar kolesterol LDL dan trigliserida, dengan cara meningkatkan aktivitas enzim lipoprotein lipase yang berperan dalam proses hidrolisis trigliserida menjadi asam lemak, mekanisme kerjanya adalah mengurangi kepekaan LDL terhadap radikal bebas (Prahastuti, dkk.2016). Flavonoid juga menghambat HMG-KoA reduktase dan menghambat absorpsi kolesterol yang diperantai oleh lipase dalam menurunkan kadar kolesterol dalam darah. Peningkatan aktivitas enzim lipase sendiri mempengaruhi peningkatan lipolisis trigliserida dalam jaringan adipose (Putri dan Anggraini, 2015). Selain itu ekstrak kulit mentimun juga dapat menurunkan kadar gula darah (Landu, 2019).

Pengukuran kadar kolesterol tikus dilakukan dengan menggunakan metode *CHOD-PAP Enzymatic Colorimeter Test*. Berdasarkan pada hasil uji normalitas (*one-sample kolmogorov-smirnov test*) didapatkan kadar kolesterol seluruh kelompok hewan uji terdistribusi secara normal ($p > 0,05$) dan uji homogenitas juga menunjukkan bahwa data homogen ($p > 0,05$). Analisis kemudian dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA dan terlihat hasil yang didapat menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada tiap data ($p < 0,05$). Namun untuk

mengetahui apakah ekstrak yang digunakan efektif atau tidak dilanjutkan dengan melihat uji lanjutan (*post hoc*) dan didapat bahwa masing-masing kelompok tikus dengan perlakuan ekstrak kulit mentimun dan simvastatin terjadi penurunan kadar kolesterol (Lampiran 7). Dengan uji paired t test, nilai yang didapat yaitu $\text{sig} < 0,05$, maka bisa disimpulkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata yang nyata pada kadar kolesterol tikus sebelum dan sesudah pemberian ekstrak pada data pretest dan postest.

Jika dikonversi ke manusia maka didapat masing-masing 1400 mg/70 KgBB manusia untuk dosis ekstrak 125 mg/200 mgBB tikus, 1680 mg/70 KgBB manusia untuk dosis ekstrak 150 mg/200 mgBB tikus, dan 1960 mg/70 KgBB manusia untuk dosis ekstrak 175 mg/200 mgBB tikus (Lampiran 6).

