

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan pendekatan kuantitatif, yang bertujuan untuk mengevaluasi potensi Teh herbal Rami sebagai agen antidiabetes melalui formulasi kombinasi Rami (*Boehmeria nivea* L.), stevia (*Stevia rebaudiana*), dan Kayu Manis (*Cinnamomum Burmanii*). Rancangan penelitian meliputi tahapan formulasi Teh herbal, pengujian organoleptik, pengukuran kadar fenol total (*Total Phenolic Content*/TPC), analisis *in-silico* terhadap enzim α -glukosidase dan α -amilase, uji inhibisi enzim α -amilase secara *in-vitro*, serta uji aktivitas antidiabetes secara *in-vivo* menggunakan mencit jantan yang diinduksi aloksan.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800) yang digunakan untuk analisis kandungan fenol total, mikropipet untuk pengambilan larutan dalam volume kecil, *water bath* sebagai media inkubasi pada suhu terkontrol, serta *centrifuge* dan *vortex mixer* untuk homogenisasi dan pemisahan fase larutan. Selain itu, digunakan juga alat pengukur kadar glukosa darah berupa glucometer merek Accu-Chek. Untuk analisis *in-silico*, digunakan perangkat lunak PyRx, BIOVIA Discovery Studio, dan ChemDraw 3D.

3.2.2. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah Daun Rami (*Boehmeria nivea* L.) yang diperoleh dari PT Haramai Jaya Nusantara, Bandung, Indonesia, serta daun stevia (*Stevia rebaudiana*) dan kayu manis (*Cinnamomum Burmanii*) yang didapatkan dari produsen lokal bersertifikasi. Bahan kimia analitik yang digunakan

antara lain reagen Folin–Ciocalteu, natrium karbonat (Na_2CO_3), dan standar asam galat untuk analisis fenol total. Untuk uji inhibisi enzim, digunakan enzim α -amilase dan substrat pati dari Sigma-Aldrich. Dalam uji *in-vivo*, digunakan alloxan monohidrat dari Merck sebagai agen penginduksi diabetes pada mencit jantan.

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di *Central Development of Rami*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Bandung. Pelaksanaan penelitian dilakukan selama enam bulan, dimulai dari bulan Februari hingga Juli tahun 2024.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Komposisi formulasi Teh herbal Rami yang terdiri dari kombinasi daun rami, stevia, dan kayu manis dengan variasi perbandingan (misalnya: formulasi C1, C2, C3).

3.4.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah potensi antidiabetes dari Teh herbal rami, yang dinilai dari hasil uji organoleptik, kandungan fenolik total, afinitas senyawa aktif terhadap enzim target (*in-silico*) aktivitas inhibisi enzim α -amilase (*in-vitro*) , serta penurunan kadar glukosa darah mencit diabetes (*in-vivo*).

3.5 Definisi Operasional Variabel

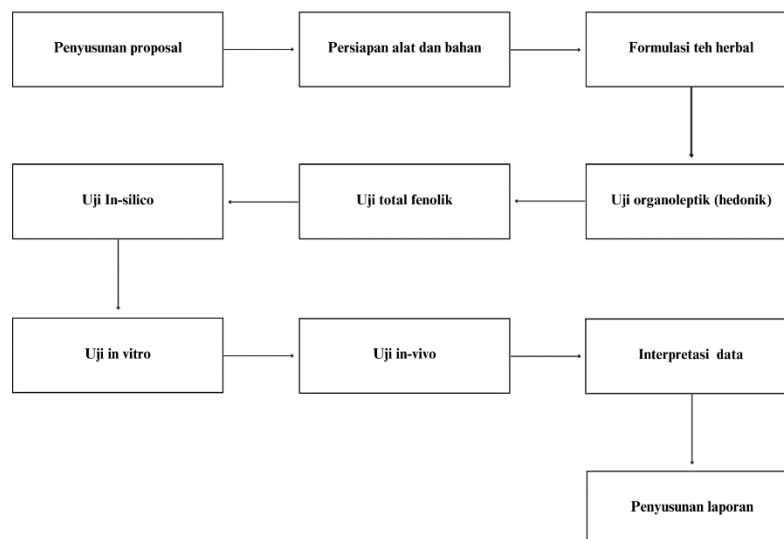
Berikut ini adalah tabel definisi operasional variabel yang terdapat pada penelitian ini:

Tabel 3.1 Definisi operasional variabel

Variabel	Definisi Operasional	Satuan Ukur	Alat Ukur
Formulasi Teh herbal	Perbandingan campuran daun rami, stevia, dan kayu manis dalam Teh herbal	Persentase (%)	Timbangan digital
Organoleptik	Penilaian panelis terhadap warna, aroma, rasa teh pada skala hedonik 1–5.	Skor hedonik (1–5)	Kuesioner panelis
Kandungan Fenolik	Kandungan senyawa fenolik dalam Teh herbal yang diukur dengan metode Folin–Ciocalteu	mg GAE/L	Spektrofotometer
Aktivitas α -glukosidase	Aktivitas α -glukosidase	Aktivitas α -glukosidase	Aktivitas α -glukosidase
Aktivitas α -amilase	Kemampuan ekstrak untuk menghambat kerja enzim α -amilase	% inhibisi	Spektrofotometer
Penurunan glukosa darah	Penurunan glukosa darah	Penurunan glukosa darah	Penurunan glukosa darah

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Tahapan Penelitian



Gambar 3.1 Bagan alir penelitian

3.6.2 Formulasi Teh herbal

Formulasi Teh Rami dilakukan berdasarkan metode dari Sylvi *et al.* (2022) dan Kinki *et al.* (2021) dengan sedikit modifikasi yaitu kombinasi Rami:Stevia:Kayu Manis telah ditentukan berdasarkan hasil uji organoleptik dan analisis fitokimia, termasuk penilaian polifenol dan flavonoid. Hasil terbaik dari kedua penelitian tersebut adalah sebagai berikut:

Tabel 3.2 Formulasi Teh herbal

No.	Kode	Rami (%)	Stevia (%)	Kayu Manis(%)
1.	C1	100	0	0
2.	C2	73	23	4
3.	C3	68	28	4

Keterangan:

Setiap kantong Teh herbal mengandung 2 gram total formulasi, Teh herbal yang diformulasikan sebanyak 2 g dimasukkan ke dalam 200 mL air mendidih selama 5 menit pada suhu 97 ° C (Kinki *et al.* 2021).

3.6.3 Uji Organoleptik

Uji sensori yang digunakan adalah uji kualitas hedonik (uji penerimaan) dari rasa, warna dan aroma yang bertujuan untuk mengetahui respon panelis terhadap sifat-sifat produk. Penelitian ini melibatkan 20 panelis yang akan memberikan penilaian terhadap Teh herbal yang diracik dengan kombinasi teh daun rami, stevia, dan kayu manis. Panelis diminta untuk memberikan penilaian subjektif dari masing-masing varian dengan rentang penilaian 1-5. Nilai 1; sangat tidak suka, 2; tidak suka, 3; netral, 4; suka dan 5; sangat suka. Skor dianalisis secara statistik menggunakan *one way ANOVA*

3.6.4 Uji Total Fenolik

Kandungan fenolik diukur dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu yang dimodifikasi, dengan asam galat sebagai standar. Sampel sebanyak 0,3 mL direaksikan dengan 1,5 mL pereaksi Folin-Ciocalteu (diencerkan 1:1 dengan air suling), kemudian ditambahkan 1,2 mL Na₂CO₃ (7,5%). Setelah 20 menit dalam gelap, absorbansi dibaca pada 765 nm. Total fenol dinyatakan sebagai mg asam galat ekuivalen per liter (mg GAE/L) dengan menggunakan rumus regresi linier dari kurva standar (Tahir *et al.*, 2017; Zuraida *et al.*, 2017).

3.6.5 Uji *in-silico* Molecular Docking

a. Reseptor

Data struktur 3D kristal reseptor yang digunakan untuk analisis molekular *docking* diperoleh dari Protein Data Bank (PDB) dengan situs <https://www.rcsb.org/>. Reseptor yang digunakan yaitu alpha glukosidase dan alpha amilase dengan

PDB ID : 3L4U dan 3BAJ. Pemilihan berdasarkan resolusi $\leq 2\text{\AA}$.

b. Preparasi reseptor

Reseptor yang digunakan diunduh dari Protein Data Bank. Reseptor yang berupa makromolekul protein dipisahkan dari molekul lain yang tidak diperlukan beserta ligan. Pemisahan dilakukan menggunakan *BIOVIA Discovery Studio* dan Pengoptimasian untuk penambahan atom hidrogen dengan *BIOVIA Discovery Studio*

c. Validasi metode

Validasi metode *docking* dilakukan dengan metode *redocking* menggunakan Natural ligan alami (Alpha amilase dan Alpha glukosidase) dari *co-crystal* yang terdapat pada reseptor dengan kode PDB ID: 3L4U dan 3BAJ.

d. Preparasi ligan

Preparasi ligan dilakukan dengan mencari kode *SMILES* dari masing-masing senyawa metabolit pada website *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Kode *SMILES* yang diperoleh di copy kemudian di paste ke dalam *ChemDraw3D* untuk menghasilkan gambar struktur 3D senyawa dan di save dalam bentuk file PDB.

e. *Docking* ligan uji terhadap reseptor

Proses *docking* dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak PyRx dan *BIOVIA Discovery Studio Visualizer*. Langkah awal yaitu menyiapkan reseptor dalam perangkat lunak PyRx dengan format PDBQT. Selanjutnya menyiapkan ligan. Setelah semua disiapkan, selanjutnya ligan dikonversi dengan tool “*Select molecules*” kemudian klik “*Forward*” sehingga muncul gridbox dan sesuaikan koordinat *grid box* nya berdasarkan ligan Co-kristal dari file reseptor yang digunakan

setelah itu kemudian di *Run Vina*. Bila proses *docking* selesai, hasil disimpan dengan format CSV.

f. Analisa dan visualisasi hasil *docking*

Penentuan konformasi ligan hasil *docking* dilakukan dengan memilih konformasi ligan yang memiliki energi ikatan paling rendah. Hasil *docking* dengan pose terbaik kemudian dianalisa menggunakan *Discovery Studio*. Parameter yang dianalisa meliputi residu asam amino, ikatan hidrogen, konstanta inhibisi prediksi, dan energi bebas ikatan.

3.6.6 Uji *In-vitro* Penghambatan α -Amilase

Aktivitas penghambatan α -amilase diukur dengan menggunakan metode asam dinitrosalisilat (DNS) yang diadaptasi dari Puspantari *et al.* (2020). Secara singkat, larutan sampel teh rami diinkubasi dengan α -amilase (1 U/mL) dan substrat pati, diikuti dengan pengukuran kolorimetri pada 540 nm. *Acarbose* (1 mg/mL) digunakan sebagai kontrol positif. Penghambatan dihitung menggunakan rumus: $\% \text{ Inhibisi} = \left(\frac{A_1 - A_2}{A_1} \right) \times 100$

A1 = Absorbansi kontrol A - Absorbansi blanko

A2 = Absorbansi sampel - Absorbansi kontrol B.

3.6.7 Uji *in-vivo* Penghambatan Antidiabetes

Tikus jantan diinduksi dengan aloksan monohidrat (180 mg/kg BB, i.p.) dan dianggap menderita diabetes jika glukosa darah puasa melebihi 250 mg/dL pada hari ke-5 atau menunjukkan gejala klasik seperti poliuria (sering buang air kecil), polidipsia (haus berlebihan), dan polifagia (lapar berlebihan). Tikus dibagi menjadi lima kelompok (n = 5): kontrol normal, kontrol diabetes, kontrol positif (glibenklamid 2 mg/kg BB), dan sampel yang digunakan adalah formulasi yang terbaik antara C1-C3 dari hasil pengujian hingga *in-vitro*. tiga kelompok perlakuan yang menerima sampel 1 (250/0,2 ml), sampel 2 (500/0,4 ml), dan sampel 3 (1000/0,6ml) mg/kg formulasi rami secara oral selama 14 hari. Glukosa darah diukur

pada hari ke-0, 1, 7, dan 14 menggunakan glukometer. Protokol percobaan hewan telah disetujui oleh komite etik Institusi, Universitas Prima Indonesia dengan nomor persetujuan No.060/KEPK/UNPRI/VII/2024 (Solikhah & Ismukada, 2020; Ukratalo *et al.*, 2022).

3.7 Analisis Data

Data dianalisis menggunakan *one way* ANOVA, diikuti dengan uji post hoc HSD Tukey untuk perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan SPSS versi 27

