BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini berjenis eksperimental yaitu meliputi identifikasi sampel, pemeriksaan karakteristik simplisia, pengumpulan sampel, pengolahan sampel, skrining fitokimia ekstrak daun *C. costata*, pembuatan ekstrak daun *C. costata,*dan pengujian aktivitas ekstrak daun *C. costata* terhadap pada penurunan kadar gula darah mencit jantan galur swiss webster.

3.2 Populasi dan Sampel

Adapun populasi dalam penelitian ini adalah hewan uji coba mencit jantan galur swiss webster dan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun *C. costata* yang hidup di sekitar hutan Tangkahan Taman Nasional Gunung Leuser, Kabupaten Langkat, Sumatera Utara (Mumpuni, 2004).

3.3 Bahan dan Alat

2.3.1 Bahan

Bahan yang dipakai dalam penelitian ini yaitu mencit jantan galur swiss webster sebagai hewan uji dengan berat badan 20-30 gram, ekstrak daun *C. costata* dari Kabupaten Langkat Sumatera Utara, aloksan monohidrat 150 mg/kg BB, pulvis gummi arabic 1%, Glibenklamid 5 mg/kg BB, aquapro injeksi (Otsu-Wi), aquadest, etanol 70% teknis, makanan mencit, minum, kandang, dan sekamnya.

3.3.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu timbangan analitik (Shimadzu type ATY-224R), spatula, batang pengaduk, gelas ukur 50 ml (Pirex), aluminium foil, cawan porselen, Spuit 0,5 cc (OneMed), mortar, sonde oral, alat glukometer (*Sinocare Safe-Accu*), dan strip glukosa (*Sinocare Safe-Accu*).

3.4 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan terhitung bulan Maret sampai Juli 2021, bertempat di Laboratorium Farmakologi Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang.

3.5 Prosedur Percobaan

3.5.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun *C. costata*

Pembuatan ekstrak dengan menggunakan metode cara dingin atau maserasi dengan cara sebanyak 1 kg serbuk daun *C. costata* dimaserasi selama 72 jam dengan pelarut etanol 70% kemudian disaring. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50ºC hingga kental dan kembali dipanaskan pada waterbath pada suhu 40ºC sehingga didapatkan ekstrak kental. Dihitung persentasi rendemen ekstrak yang diperoleh.

$$\%\ \text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{Berat bahan yang diekstraksi}}\ 100\%$$

3.5.2 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia ekstrak daun *C. costata* sebagai berikut :

a. Pemeriksaan alkaloid, sampel cuci dengan garam berbau, kemudian, pada saat itu tambahkan kloroform, gerus padat. Kemudian, pada saat itu lapisan kloroform dipetik dan ditekankan, kemudian, pada saat itu tambahkan *korosif klorida* 2 N. Campuran padat sampai ada dua lapisan, untuk lapisan korosif dipetik dan kemudian diisolasi menjadi tiga bagian. Segmen awal adalah sebagai korelasi, dan untuk bagian selanjutnya ditambahkan reagen Mayer, jika ada toko putih atau nuansa menunjukkan adanya alkaloid. Pada bagian ketiga tambahkan *reagen Dragendoff*, jika ada toko kuning hingga oranye atau naungan yang menunjukkan adanya alkaloid (Farnsworth, 1966).
b. Pemeriksaan flavonoida. sampel tambahkan air kemudian panaskan dan saring. Filtrat berbingkai ditambahkan dengan bubuk magnesium dan 5 N korosif klorida kemudian, pada saat itu saring dan tambahkan minuman keras amil, kocok dengan tegas, kemudian, pada saat itu naungan lapisan minuman keras amil berbentuk diperhatikan. Senyawa flavonoid yang dijelaskan oleh susunan warna kuning hingga merah dapat ditarik oleh minuman keras amil (Farnsworth, 1966).

c. Penilaian glikosida, contoh menambahkan campuran etanol 96% dengan air (7: 3) dan 2 N hidroklorik korosif sampai diturunkan, refluks selama 60 menit, didinginkan dan dipisahkan. Kemudian, pada saat itu filtrat ditambahkan air olahan dan timbal (II) derivasi asam asetat 0,4 M, dicampur, biarkan tetap sampai ampas turun dan disaring. Filtrat disibukkan dengan kombinasi kloroform dan isopropanol (2: 3) dalam saluran split, dikocok sampai dua lapisan dibingkai, untuk spesifik lapisan atas (gula) dan lapisan dasar (non gula).

   1. Lapisan atas, caranya adalah dengan menambahkan air seperti pereaksi Molish, kemudian, pada saat itu secara bertahap menambahkan korosif sulfat terkonsentrasi melalui pembagi pada silinder, dan membingkai cincin berwarna coklat atau bersahaja ungu atau coklat dari batas dua cairan menunjukkan adanya ikatan gula.
   2. Lapisan bawah, caranya yaitu menambahkan reagen *Liberman-Bouchard*. Jika nada ungu kemerahan dibingkai, itu menunjukkan adanya triterpenoid, dan jika nada hijau atau biru berbentuk, itu menunjukkan adanya senyawa steroid (Farnsworth, 1966).

d. Pemeriksaan glikosida antarkuinon, pertama-tama masukan sampel ke dalam erlenmeyer tambahkan etanol sampai terendam kemudian tambahkan asam sulfat 2 N, dan panaskan sebentar, setelah dingin masukan dalam curong pisah dan tambahkan 10 ml benzena, kocok kemudian didiamkan. Benzena lapisan disaring dan dipisahkan, lapisan benzena dengan 2 ml larutan natrium hidroksida 2 N dikocok dan diamkan. Berwarna merah menunjukan lapisan natrium hidroksida menunjukan adanya glikosida antarkuinon (Farnsworth, 1966).

e. Pemeriksaan terpenoid dan steroid, sampel tambahkan eter kemudian gerus lalu kocok dan diamkan setelah itu pipet dan saring. Filtrat diuapkan eternya lalu residunya ditambahkan pereaksi *Lieberman-Bouchard* dan diamati warnanya. Senyawa steroid ditandai dengan terbentuknya warna hijau-biru sedangkan senyawa triterpenoid menunjukan terbentuknya warna ungu (Farnsworth, 1966).

f. Pemeriksaan saponin, sampel ditambahkan air pada tabung reaksi kemudian didihkan dengan penangas air selama 15 menit, lalu saring dan didinginkan. Setelah dingin, filtrat Kocok dengan tegas ke atas selama 30 detik. Senyawa saponin digambarkan oleh perkembangan buih setinggi sekitar 1 cm yang tanpa henti selama beberapa menit dan tidak lenyap juga setelah perluasan korosif klorida atau setelah didiamkan selama 20 menit. (Farnsworth, 1966).

g. Pemeriksaan tanin, sampel ditambahkan air pada tabung reaksi lalu dipanaskan dengan penangas air selama 15 menit, saring panas-panas. Encerkan filtrat sampai tidak berwarna menggunakan air suling. Ambil larutan sebanyak 2 ml kemudian, pada saat itu tambahkan 1-2 tetes reagen besi (III) klorida 1%. Jika ada nada biru hijau kehitaman atau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin (Farnsworth, 1966).

3.5.3 Penyiapan Hewan Uji

Pemeriksaan menggunakan hewan percobaan mencit jantan Swiss Webster sebagai hewan percobaan yang secara serampangan dipartisi dengan 7 kelompok dan setiap kelompok terdiri dari 4 ekor, hewan percobaan dijaga dengan kondisi perawatan yang sama seperti makan, minum, puing-puing, dan batas mencit. Semua hewan percobaan disesuaikan terlebih dahulu selama beberapa minggu sebelum digunakan. Untuk penilaian kadar glukosa hewan percobaan dipuasakan terlebih dahulu selama ±8-12 jam belum diurus pada saat yang sama diberi minuman.

3.5.4 Penginduksi Aloksan

Aloksan monohidrat dengan dosis 150 mg/kg BB diinjeksikan secara intraperitoneal. Semua mencit dipuasakan selama ±8-12 jam hanya diberi air saja sebelum penyuntikan. Ditimbang aloksan sebanyak 150 mg/kg BB kemudian dilarutkan dalam 0,5 ml aqua pro injeksi. Jadi produksi: 150 mg hancur dalam 0,5 ml. Jumlah yang diinfuskan adalah 0,5 ml. Setelah tiga hari mencit dengan glukosa darah ≥200 mg/dl digunakan untuk pendahuluan.

3.5.5 Pembuatan Pulvis Gummi Arabic 1%

Larutan pulvis gummi arabic 1% dibuat dengan menimbang serbuk pulvis gummi arabic 1% sebanyak 1 gram kemudian dicampurkan dengan 100 mL aquades kedalam mortar kemudian digerus sampai homogen.

3.5.6 Pembuatan Larutan Glibenklamid

Pembuatan suspensi glibenklamid yaitu obat glibenklamid 5 mg kemudian digerus dan ditimbang kemudian dimasukan kedalam mortir dan ditambahkan dengan suspensi pulvis gummi arabic 1% sedikit demi sedikit sambil digerus sampai homogen untuk perhitunganya dibuat dengan cara, menimbang BB mencit dibagi 1000 gram kemudian dikalikan 5 mg. Kemudian untuk yang disonde hasil dari dosis yang digunakan dibagi 100 mg dan kemudian dikali 10 ml.

3.5.7 Pengujian Antidiabetes Daun *C. costata*

Semua mencit dipuasakan selama ±8-12 jam namun pada saat yang sama diberi minuman. Kemudian diukur 20-30 gram dan diperkirakan kadar glukosa darah biasa, masing-masing dengan pengenal di ekornya. Mencit dihasut oleh monohidrat aloksan dengan porsi 150 mg/kg BB intraperitoneally. Perhatikan perilaku mencit dan berat badan, ukur kadar glukosa darahnya pada hari ketiga hingga ketujuh. Mencit mengalami diabetes saat puasa KGD ≥200 mg/dl dan dapat digunakan untuk pengujian.

Hewan uji coba dipisahkan menjadi 7 kelompok, kelompok perawatan 1-4 diberi konsentrat etanol daun *C. costata*, kontrol negatif hanya diberi suspensi pulvis gummi arab 1%, kontrol positif diberi suspensi glibenklamid 5 mg/kg BB per oral dan lompatan khas tidak diberikan apa-apa. Setiap kelompok ditangani sekali per hari selama 15 hari dan sepanjang garis-garis ini kadar glukosa di tidak benar-benar menetap pada hari kelima belas. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan dengan cara melukai ujung ekor mencit dan pengecekan menggunakan alat glukometer (*Sinocare Safe-Accu*).

3.6 Analisis Data

Hasil data pengujian kadar gula darah dianalisis memakai program SPSS versi 20. Informasi dari hasil uji statistik dari tes faktual homogenitas dan tes

ordinariness dengan asumsi hasil informasi tes biasa, untuk melihat perbedaan dalam tingkat setiap kelompok perawatan yang kontras dengan kontrol negatif diperiksa menggunakan tes terukur *One-Way* ANOVA diikuti oleh *Tukey HSD.*

Hipotesis:

Ho : Tidak ada perbedaan yang signifikan antara setiap kelompok

Ha : Terdapat perbedaan yang signifikan antara setiap kelompok

Pengambilan keputusan :

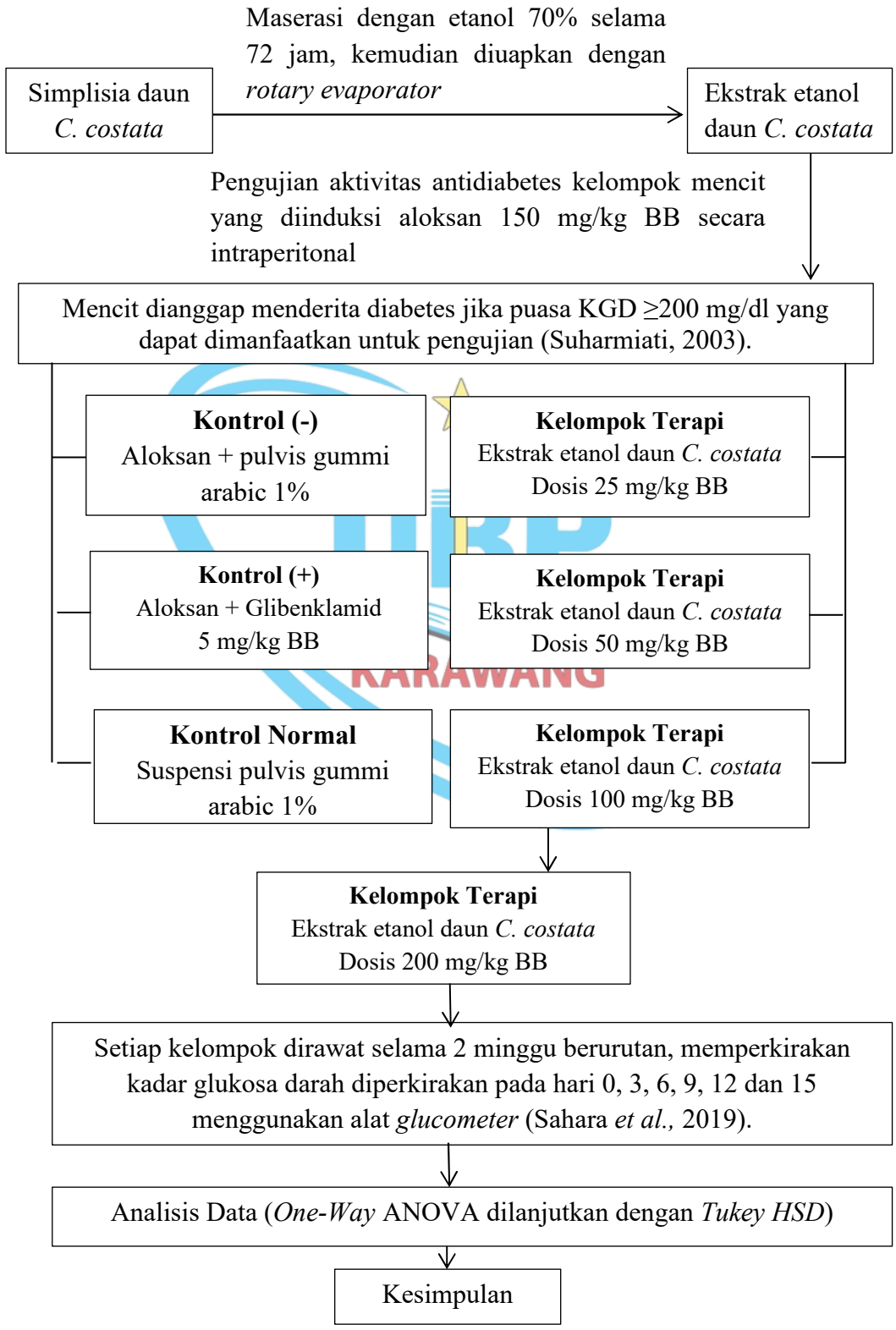
Bila nilai signifikan ≤ 0,05 Ho ditolak, berarti terdapat perbedaan

Bila nilai signifikan ≥ 0,05 Ho diterima, berarti tidak terdapat perbedaan

(Santoso, 2009).

UBP KARAWANG

3.7 Skema Penelitian



Gambar 3. 1 Skema Penelitian