

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah studi ekperimental yang meliputi pengumpulan sampel, pengolahan sampel, pemeriksaan karakteristik simplisia, pembuatan fraksi daun *C.costata*, skrining fitokimia, dan pengujian efek fraksi daun *C.costata* terhadap penurunan kadar gula darah (KGD) pada mencit jantan galur swiss webster (Sahara *et al*, 2019).

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah hewan uji coba mencit jantan galur swiss webster dan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah fraksi daun *C.costata* yang diambil disekitar hutan Tangkahan Taman Nasional gunung Leuser, Kabupaten Langkat, Sumatera Utara (Mumpuni, 2004).

3.3 Bahan dan Alat Penelitian

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan adalah kandang mencit, tempat makan dan minum mencit, maserator, rotary evaporator, waterbath, neraca, analitik digital (*Shimadzu type ATY-224R*), gelas ukur 50ml (*pirex*), spuit 0,5 cc (*Onemed*), sonde oral, glukometer dan strip glukosa (*Sinnocare Safe-Accu*) (Lampiran 6).

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu fraksi daun *C.costata*, Pulvis Gom Arabic 1% , Aloksan monohidrat 150 mg/kgBB , Glibenklamid 5 mg/kg BB , aquades, etanol 70 % teknis , Aqua pro injeksi (*Otsu-Wi*), etil asetat, n-heksana, alkohol, air, pelet dan minuman mencit (*ad libitum*) (lampiran 6).

3.4 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai juni 2021 di Laboratorium Fitokimia, Laboratorium Penelitian dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Penyiapan Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah daun *C.costata*.

3.5.2 Pembuatan Ekstrak dan Fraksi Daun *C.costata*

Serbuk daun *C. costata* (1 kg) dimaserasi dalam etanol 70% selama 72 jam atau 3 hari (3x24 jam). Selanjutnya maserat ditampung dan pelarutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50⁰C hingga kental dan kembali dipanaskan pada waterbath pada suhu 40⁰C sehingga didapatkan ekstrak kental. Dihitung persentasi rendemen ekstrak yang diperoleh.

Ekstrak etanol daun *C.costata* difraksinasi cair-cair menggunakan pelarut dengan kepolaran yang berbeda yaitu dengan pelarut non polar seperti *n*-heksan, pelarut semi polar etil asetat dan pelarut polar yaitu air. Sejumlah ekstrak ditimbang dan dilarutkan dalam pelarut *n*-heksan dalam corong pisah lalu didiamkan hingga terjadi pemisahan dan dilakukan secara berulang hingga didapatkan lapisan *n*-heksan yang bening. Fraksi *n*-heksan kemudian diambil dan dikumpulkan. Residu yang dihasilkan disimpan untuk dilakukan fraksinasi untuk pelarut etil asetat. Sejumlah residu ditambahkan etil asetat dan didiamkan untuk didapatkan lapisan etil asetat, selanjutnya dilakukan berulang hingga didapatkan lapisan etil asetat yang bening kemudian dipisahkan. Residu yang dihasilkan digunakan untuk fraksinasi pelarut polar yakni air. Residu dikocok dan didiamkan hingga didapatkan lapisan air bening. Kemudian fraksi etil asetat dan *n*-heksana diuapkan dengan *rotary epavorator* dengan suhu 40-50 C, sedangkan fraksi air diuapkan dengan cara dipressdiar sampai didapatkan ekstrak kental. Dihitung persentasi rendemen fraksi yang diperoleh (Alkandahri *et al*, 2019). Tujuan fraksinasi ini dilakukan untuk menentukan fraksi yang lebih berefek terhadap aktivitas penurunan antidiabetes dari tiga pelaru yang berbeda berdasarkan kepolarannya yaitu fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksana.

3.5.3 Uji Skrining Fitokimia

Skrining atau Penapisan fitokimia ekstrak dan fraksi daun *C.costata* sebagai berikut :

- a. Pemeriksaan Alkaloid

Sampel dibasakan dengan ammonia, kemudian ditambahkan kloroform, digerus kuat. Lapisan kloroform dipipet dan disaring, kemudian kedalamnya ditambahkan asam klorida 2 N. Campuran dikocok kuat hingga terdapat dua lapisan. Lapisan asam dipipet, kemudian dibagi menjadi tiga bagian. Bagian pertama sebagai pembanding, bagian kedua ditambahkan pereaksi mayer, jika terdapat kekeruhan atau endapan putih menandakan adanya alkaloid. Bagian ketiga ditambahkan pereaksi dragendroff, jika terdapat kekeruhan atau endapan berwarna kuning sampai jingga menandakan adanya alkaloid (Farnsworth, 1966).

b. Pemeriksaan Flavonoid

Sampel ditambahkan air lalu dipanaskan dan disaring. Filtrat yang terbentuk ditambahkan dengan serbuk magnesium dan asam klorida 5 N lalu disaring dan ditambahkan amil alkohol, dikocok kuat, lalu diamati warna lapisan amil alkohol yang terbentuk. Senyawa flavonoid ditandai dengan terbentuk warna kuning hingga merah yang dapat ditarik oleh amil alkohol (Farnsworth, 1966).

c. Pemeriksaan Glikosida

Sampel ditambahkan campuran etanol 96% dengan air (7:3) dan asam klorida 2 N sampai terendam, direfluks selama 1 jam, didinginkan dan disaring. Kemudian filtrat ditambahkan air suling dan timbal (II) asetat 0,4 M, diaduk, didiamkan sampai endapan turun dan disaring. Filtrat disari dengan campuran kloroform dan isopropanol (2:3) di dalam corong pisah, dikocok sampai terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan atas (gula) dan lapisan bawah (non gula).

1. Lapisan atas

Dengan penambahan air dan pereaksi Molish, kemudian secara perlahan-lahan ditambahkan asam sulfat pekat melalui dinding tabung, terbentuk cincin warna coklat/coklat keunguan/ungu pada batas antara kedua cairan menunjukkan adanya ikatan gula.

2. Lapisan bawah

Dilakukan dengan penambahan pereaksi Lieberman-Bouchard. Bila terbentuk warna ungu kemerahan menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan bila terbentuk warna biru hijau/hijau menunjukkan adanya steroid (Farnsworth, 1966).

d. Pemeriksaan Glikosida Antrakuinon

Sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer ditambah etanol sampai terendam ditambahkan asam sulfat 2 N, dipanaskan sebentar, setelah dingin dimasukkan ke dalam corong pisah ditambahkan 10 ml benzena, dikocok dan didiamkan. Lapisan benzena dipisahkan dan disaring, kocok lapisan benzena dengan 2 ml larutan natrium hidroksida 2 N, didiamkan. Lapisan natrium hidroksida berwarna merah yang menunjukkan adanya glikosida antrakuinon (Farnsworth, 1966).

e. Pemeriksaan Steroid dan Terpenoid

Sampel ditambahkan eter sambil digerus lalu dikocok dan didiamkan setelah itu dipipet dan disaring. Filtrat diuapkan eternya lalu residunya ditambahkan pereaksi Lieberman-Bouchard dan diamati warnanya. Senyawa steroid ditandai dengan terbentuknya warna biru-hijau sedangkan senyawa triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna ungu (Farnsworth, 1966).

f. Pemeriksaan Saponin

Sampel ditambahkan air pada tabung reaksi lalu dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit kemudian saring dan didinginkan. Setelah dingin, filtrat dikocok kuat secara vertikal selama 30 detik. Senyawa saponin ditandai dengan terbentuknya busa setinggi kurang lebih 1 cm yang persisten selama beberapa menit dan tidak hilang juga setelah ditambahkan asam klorida atau setelah didiamkan selama 20 menit (Farnsworth, 1966).

g. Pemeriksaan Tanin

Sampel ditambahkan air pada tabung reaksi lalu dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit, saring panas-panas. Filtratnya diencerkan dengan air suling sampai tidak berwarna. Larutan diambil sebanyak 2 ml dan ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Jika terjadi warna biru atau kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Farnsworth, 1966).

3.5.4 Penyiapan Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan hewan uji mencit putih jantan swiss webster yang dibagi secara acak menjadi 6 kelompok dimana masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor. Semua hewan uji dipelihara dengan kondisi perlakuan yang sama yaitu kandang mencit, sekam, makanan dan minumannya. Sebelum digunakan dalam percobaan, semua hewan uji diadaptasikan dahulu selama seminggu dengan kondisi yang

sama. Bila akan digunakan dalam perlakuan dan pemeriksaan kadar gula darahnya hewan uji dipuaskan dahulu selama $\pm 8-12$ jam tanpa diberi makan, tetap diberi minum.

3.5.5 Penginduksian Aloksan

Aloksan monohidrat dengan dosis 150 mg/kg BB diinjeksikan secara intraperitoneal. Semua mencit dipuaskan selama $\pm 8-12$ jam hanya diberi air saja sebelum penyuntikan. Ditimbang aloksan sebanyak 150 mg/kg BB kemudian dilarutkan dalam 0,5 ml aqua pro injeksi. Jadi pembuatannya : 150 mg dilarutkan dalam 0,5 ml, jumlah yang disuntikan adalah 0,5 ml. Setelah tiga hari mencit dengan glukosa darah ≥ 200 mg/dl digunakan untuk percobaan.

3.5.6 Pembuatan Pulvis Gom Arabicum 1%

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

3.5.7 Pembuatan Larutan Glibenklamid

Pembuatan suspensi glibenklamid yaitu obat glibenklamid 5 mg kemudian digerus dan ditimbang kemudian dimasukkan kedalam mortar dan ditambahkan dengan suspensi pulvis gummi arabic 1% sedikit demi sedikit sambil digerus sampai homogen untuk perhitungannya 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.

3.5.8 Pengujian Efek Antidiabetes Fraksi *C.costata*

Semua mencit dipuaskan selama $\pm 18-22$ tetapi tetap diberi minum. Kemudian ditimbang 20-30 gram dan diukur kadar glukosa darah normal, masing-masing diberi tanda pengenal pada bagian ekornya. Mencit diinduksi dengan aloksan monohidrat dengan dosis 150 mg/gram BB secara intraperitoneal. diamati tingkah laku mencit dan bobot badan, ukur kadar glukosa darahnya pada hari ke-3 hingga hari ke-7. Mencit dianggap menderita diabetes apabila KGD puasa ≥ 200 mg/dl dan dapat digunakan untuk pengujian.

Hewan uji coba dibagi dalam 6 kelompok masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor mencit, kelompok negatif diberi suspensi PGA 1% dan aloksan secara peroral, kontrol positif diberi suspensi glibenklamid 0,013 mg/gram BB secara per oral

dan kelompok normal hanya diberi suspensi PGA 1% tanpa di induksi aloksan, kemudian kelompok terapi fraksi daun *C.costata* yang terdiri dari kelompok terapi fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana. Masing-masing kelompok diberi perlakuan sekali sehari selama 14 hari dan selanjutnya kadar glukosa dalam darah ditentukan pada hari ke-15 (Sahara *et al*, 2019). Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan dengan melukai ujung ekor mencit menggunakan scalpel hingga mengeluarkan darah. Test strips GlucoDrTM ditempelkan pada darah mencit, dan kadar glukosa dalam darah diukur menggunakan alat *Glucose Test* (Yulinah *et al*, 2001).

3.6 Analisis Data

Hasil data penelitian dianalisis memakai program SPSS versi 22. 0. Data hasil penelitian ditetapkan homogenitas juga normalitasnya agar memastikan analisis statistik yang digunakan. Apabila data yang diperoleh normal, maka dilakukan uji parametrik *Anova One Way* dan dilanjutkan dengan *Uji Tukey HSD* (Sahara *et al*, 2019).

Hipotesis :

Ho : tidak ada perbedaan yang bermakna antara setiap kelompok

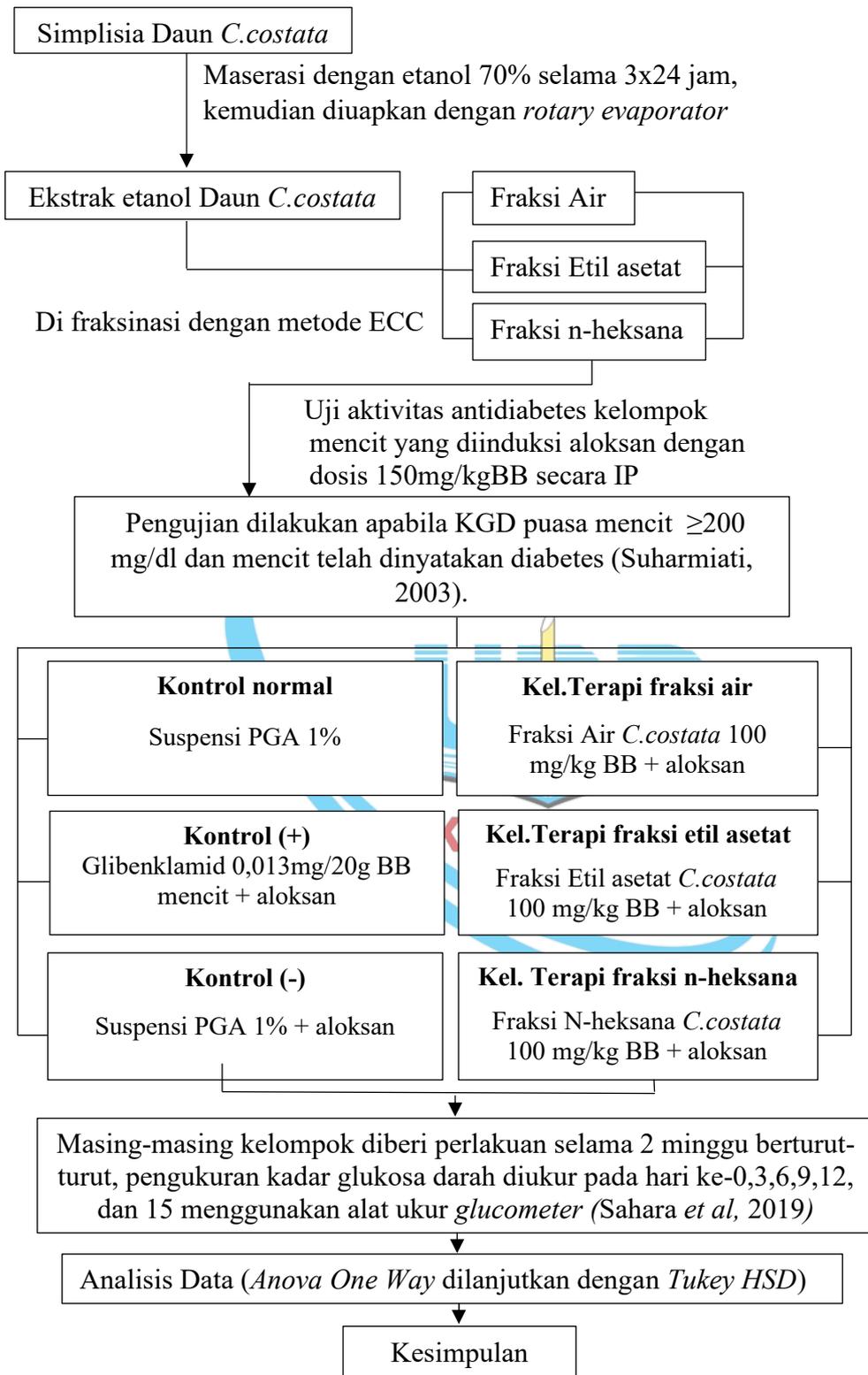
Ha : terdapat perbedaan yang bermakna antara setiap kelompok

Pengambilan keputusan :

Bila nilai signifikansi $\leq 0,05$ Ho ditolak, berarti terdapat perbedaan

Bila nilai signifikansi $\geq 0,05$ Ho diterima, berarti tidak terdapat perbedaan (Santoso, 2009).

3.7 Skema Penelitian



Gambar 1.1 Prosedur Penelitian