

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah studi eksperimental yang menggunakan tikus putih jantan galur wistar sebagai hewan percobaan. Penelitian ini meliputi pengumpulan sampel, pengolahan sampel, pemeriksaan karakteristik simplisia, pembuatan ekstrak etanol sampai fraksi daun jambang (*Szygium cumini* (L.) Skeels), skrining fitokimia, dan pengujian efek fraksi daun jambang (*Szygium cumini* (L.) Skeels) terhadap penurunan kadar gula darah (KGD) pada tikus putih jantan galur wistar. Hewan uji coba yang digunakan akan diinduksi dengan aloksan dan obat pembanding glibenklamid.

Rancangan penelitian ini menggunakan analisis Rancangan Acak Lengkap (RAL), Rancangan Acak Lengkap (RAL) merupakan rancangan yang paling sederhana jika dibandingkan dengan rancangan-rancangan percobaan lainnya. Dalam rancangan ini terdapat loka kontrol, sehingga sumber keragaman yang diamati hanya perlakuan dan galat (Hanafiah, 2015).

Rancangan ini menggunakan rumus Federer dalam menentukan jumlah sampel yang akan digunakan yaitu :

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

Keterangan :

K = Jumlah kelompok perlakuan

n = Banyak sampel tiap kelompok

Penelitian ini menggunakan 6 kelompok perlakuan dengan demikian perhitungan rumus Federer untuk menentukan banyak sampel tiap kelompok adalah sebagai berikut :

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

$$(6-1) (n-1) \geq 15$$

$$5 (n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

k : jumlah kelompok perlakuan

n : banyak sampel tiap kelompok

Dari perhitungan rumus Federer didapatkan sampel tiap kelompok sebanyak 4 sampel. Dengan demikian jumlah sampel pada penelitian ini sebanyak 24 sampel.

### 3.2 Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah hewan uji coba tikus putih jantan galur wistar yang dikelompokkan secara acak dan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah fraksi daun Jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) yang diambil di Kecamatan Klari, Kabupaten Karawang, Provinsi Jawa Barat.

### 3.3 Bahan dan Alat Penelitian

#### 3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu fraksi daun Jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels), tikus putih jantan galur wistar, aloksan, glibenklamid 5 mg, aquadest, etanol 70%, N-heksan, etil-asetat, *Pulvis Gummi Arabicum* (PGA), NaOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, dan serbuk Mg-HCl pekat, FeCl<sub>3</sub>, pereaksi Libermann-Buchard, HCl, pereaksi mayer, pereaksi dragendorff.

#### 3.3.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sarung tangan, timbangan digital, timbangan tikus, perkamen, tabung reaksi, *water bath*, sonde, spuit, kandang tikus, mortir, stemper, *beaker glass*, *alcohol swab*, spidol, pipet, *stopwatch*, alat glukometer, strip glukosa, alat maserasi dan alat fraksinasi.

### 3.4 Variabel Penelitian

#### 3.4.1 Klasifikasi Variabel

##### a. Variabel Bebas

Variabel bebas yang terlibat dalam penelitian ini adalah variasi dosis ekstrak etanol daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) yang diperoleh melalui orientasi.

##### b. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar gula darah pada tikus putih jantan galur wistar.

### 3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Pada penelitian ini, definisi operasional variabel dijelaskan dalam tabel 3.1 berikut :

**Tabel 3. 1** Definisi Operasional Variabel

| No.              | Variabel         | Definisi  | Alat Ukur  | Skala | Persyaratan Pengujian |
|------------------|------------------|---|------------|-------|-----------------------|
| Variabel Bebas   |                  |   |            |       |                       |
| 1.               | Dosis            | Kadar obat yang dapat mempengaruhi suatu organisme secara biologis; makin besar kadarnya, maka makin besar pula dosisnya. | -          | -     | -                     |
| Variabel Terikat |                  |   |            |       |                       |
| 1.               | Kadar gula darah | Kadar gula darah ekor hewan uji coba adalah angka yang ditunjukkan menggunakan alat glukometer.                           | Glukometer |       | -                     |

## 3.5 Prosedur Penelitian

### 3.5.1 Determinasi Tanaman

Determinasi dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu untuk mengetahui identitas dari tanaman daun jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). Determinasi tanaman bertujuan untuk memastikan kebenaran tanaman

jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi dari tanaman jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) dengan menggunakan kunci determinasi.

### 3.5.2 Pengumpulan Tanaman

Tanaman yang digunakan untuk penelitian ini adalah daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) yang didapatkan di Klari, Karawang, Jawa Barat.

### 3.5.3 Penyiapan Simplisia

Daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) yang masih segar kemudian dilakukan pembuatan simplisia dengan cara daun yang masih segar dengan kondisi utuh dan baik dibersihkan dari kotoran yang melekat dan dicuci dengan air mengalir. Kemudian daun dijemur dengan cara diangin-anginkan selama beberapa hari. Daun yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender hingga halus.

### 3.5.4 Ekstraksi Daun Jamblang

Sebanyak 500 gram sampel berupa serbuk halus daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) dimaserasi dengan etanol 70% selama 3×24 jam, setiap 24 jam hingga filtrat tidak berwarna. Filtrat disaring dan diuapkan di *water bath* dengan suhu 60 – 70 °C sambil diaduk kemudian dianginkan sehingga diperoleh ekstrak kental. Hitung randemen dari ekstrak kental daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). Randemen dihitung dengan menggunakan satuan persen (%). Semakin tinggi nilai rendemen yang dihasilkan maka menandakan nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak. Berikut adalah rumus untuk menghitung randemen :

$$\% \text{ Randemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak Kental (g)}}{\text{Berat Simplisia (g)}} \times 100\%$$

### 3.5.5 Fraksi Daun Jamblang

Ekstrak dilarutkan dalam campuran etanol dan air dengan perbandingan (1:3), setelah itu difraksinasi dengan praktisi cair – cair menggunakan etil asetat dan n-heksana masing – masing dilakukan 4 kali pengulangan sebanyak 150 mL ( 4 x 150 mL) dengan menggunakan alat corong pisah dengan cara dikocok kuat berkali – kali secara searah kemudian didapatkan hasil fraksi yaitu fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana. Fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 50oC sedangkan fraksi air dengan cara freeze dryer (pengeringan beku) untuk mengeluarkan atau memisahkan hampir sebagian besar air dalam ekstrak. Rendemen fraksi dihitung dengan perhitungan :

$$\% \text{ Randemen} = \frac{\text{Berat fraksi yang diperoleh (g)}}{\text{Berat ekstrak yang ditimbang (g)}} \times 100\%$$

### 3.5.6 Uji Skrining Fitokimia

#### A. Uji Identifikasi Flavonoid

Ekstrak kental etanol sebanyak 0,1 g dilarutkan dalam 10 ml etanol kemudian dibagi ke dalam empat tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai tabung kontrol, tabung kedua, ketiga, dan keempat berturut-turut ditambahkan NaOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, dan serbuk Mg-HCl pekat. Warna pada masing-masing tabung dibandingkan dengan tabung kontrol, jika terjadi perubahan warna maka positif mengandung flavonoid (Rohmaniyah, 2017).

#### B. Uji Identifikasi Tanin

Uji Tanin dilakukan dengan cara ekstrak daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) sebanyak 0,5 gram direbus dalam 20 ml air suling dalam tabung reaksi. Saring dan tambahkan beberapa tetes 0,1% FeCl<sub>3</sub> sampai berubah warna. Hasil positif dengan tanin menunjukkan dengan munculnya warna hijau kecoklatan atau biru kehitaman.

#### C. Uji Identifikasi Steroid

Dilakukan dengan cara pereaksi Libermann-Buchard ditambahkan ke dalam ekstrak daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). Terbentuknya warna ungu dan akhirnya biru menunjukkan bahwa simplisia mengandung senyawa golongan triterpenoid, sedangkan bila terbentuk warna merah dan terakhir berwarna hijau menunjukkan adanya senyawa golongan steroid.

#### D. Uji Identifikasi Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan cara 0,5 gram ekstrak daun jamblang (*Syzygium cumini* L) ditambah 2 ml etanol 70% dan 5ml HCl 2N pekat dan panaskan selama 2 menit sambil diaduk. Saring ekstrak daun jamblang (*Syzygium cumini* L) dan campuran HCl setelah dingin. Filtrat yang disaring digunakan untuk menganalisis senyawa alkaloid, masing-masing 0,5 ml ditempatkan dalam 3 tabung reaksi dengan pereaksi yang berbeda.

1. Pada tabung 1, tambahkan pereaksi mayer, sampel terbentuk endapan putih atau kuning menunjukkan adanya alkaloid.

2. Pada tabung 2, tambahkan pereaksi dragendorff, sampel terbentuk endapan coklat atau jingga kecoklatan menunjukkan adanya alkaloid.
3. Pada tabung 3, digunakan sebagai blanko.

#### E. Uji Identifikasi Saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara sebanyak 0,5 gram ekstrak daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) dicampur dengan 5 ml air suling dan di aduk kuat-kuat. Tes positif untuk keberadaan saponin dalam larutan ditunjukkan dengan berbusa.

### 3.5.7 Perhitungan Dosis

Untuk menentukan dosis fraksi daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) dilakukan dengan orientasi.

### 3.5.8 Penyiapan Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih jantan galur wistar 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 tikus, sekam, makanan dan minumannya. Sebelum digunakan dalam percobaan, semua hewan uji diadaptasikan dahulu selama 1 minggu dengan kondisi yang sama. Bila akan digunakan dalam pemeriksaan kadar gula darahnya hewan uji dipuasakan dahulu selama  $\pm 8-12$  jam tanpa diberi makan, tetapi diberi minum.

### 3.5.9 Penginduksian Aloksan

Aloksan monohidrat dengan dosis 150 mg/kg BB diinjeksikan secara intraperitoneal. Semua tikus dipuasakan selama  $\pm 8-12$  jam hanya diberi minum saja sebelum penyuntikan. Ditimbang aloksan sebanyak 150 mg/kg BB kemudian dilarutkan dalam 1 ml aqua pro injeksi. Jadi pembuatannya : 150 mg dilarutkan dalam 1 ml, jumlah yang disuntikan adalah 1 ml. setelah tiga hari tikus dengan glukosa darah  $\geq 200$  mg/dL digunakan untuk percobaan.

### 3.5.10 Pembuatan Pulvis Gom Arabicum 1%

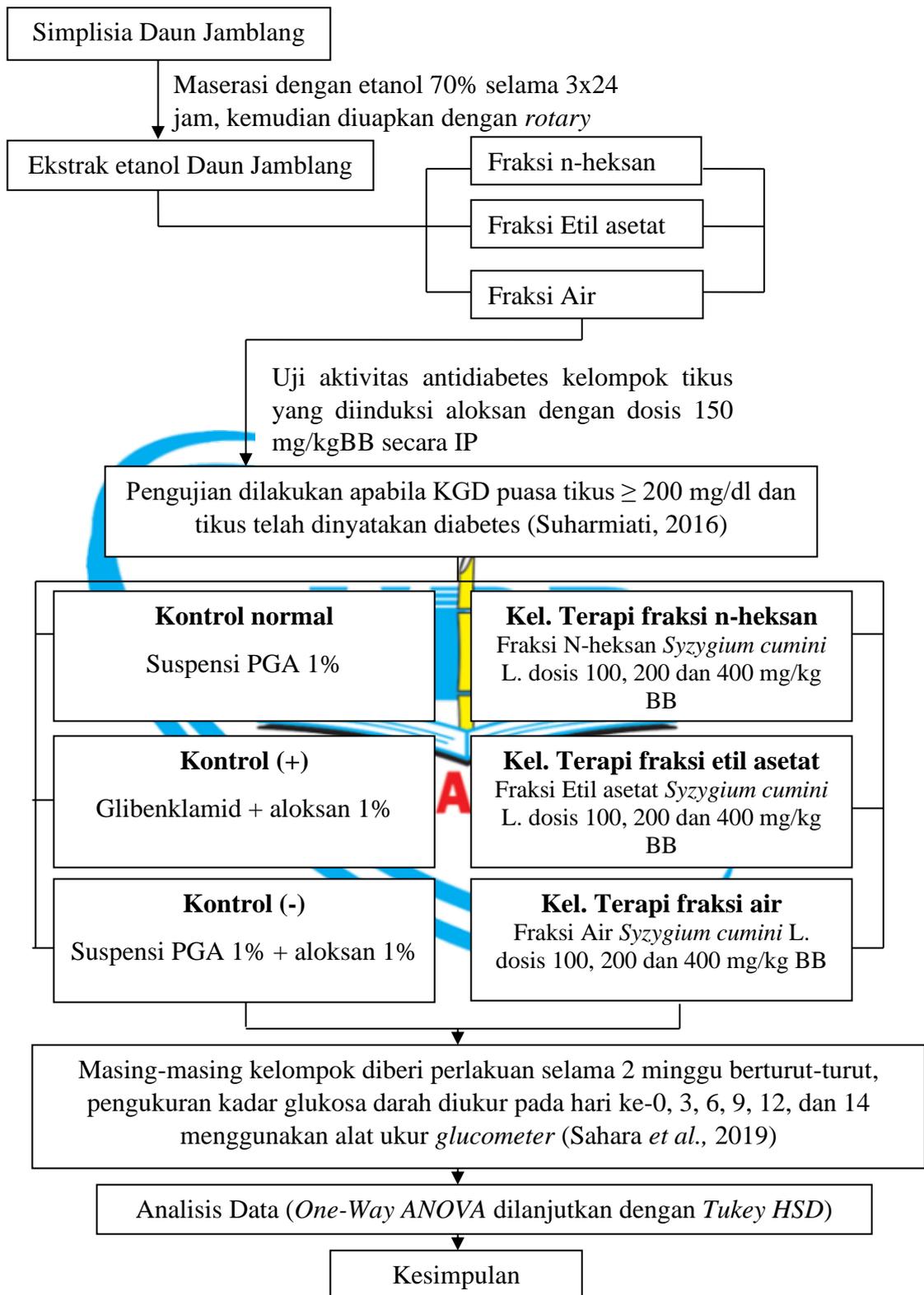
Larutan pulvis gom arabicum (PGA) 1% dibuat dengan cara menimbang serbuk pulvis gummi Arabic 1% sebanyak 1 gram kemudian dicampurkan dengan 100 mL aquadest kedalam mortar kemudian digerus sampai homogen.

### 3.5.11 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 (PGA) 1% sedikit demi sedikit sambil digerus sampai homogen. Untuk perhitungannya dibuat dengan cara menimbang BB tikus dibagi 1000 gram kemudian dikalikan 5 mg. Untuk yang disonde hasil dari dosis yang digunakan dibagi 100 mg dan kemudian dikali 10 mL.



### 3.5.12 Alur Prosedur Penelitian



**Gambar 3. 1** Alur Prosedur Penelitian

### 3.6 Analisis Data

Hasil penelitian ini diolah dari data yang diperoleh dari pengukuran kadar gula darah tikus dengan menggunakan uji normalitas dan uji homogenitas. Kemudian data yang telah terdistribusi normal dan homogen ( $P > 0,0001$ ) maka dilanjutkan dengan uji statistik parametrik *One-Way ANOVA* dengan menggunakan *GraphPad Prism* Versi 10 dan uji Tukey HSD Post Hoc.

Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui apakah hasil data berdistribusi normal atau tidak. Uji ini merupakan pengujian yang paling banyak dilakukan untuk analisis statistik parametrik. Sedangkan uji homogenitas merupakan pengujian perbedaan dua atau lebih populasi, semua karakteristik populasi dapat bervariasi antara satu populasi dengan yang lainnya. Uji ini sangat diperlukan untuk membuktikan data dasar yang akan diolah adalah homogen (Sahara *et al.*, 2019).

### 3.7 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang.

