

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian acak lengkap pola searah. Rancangan penelitian ini dilakukan dengan randomisasi, artinya pengelompokan anggota-anggota kelompok kontrol dan kelompok eksperimen dilakukan berdasarkan acak atau random, sehingga kedua kelompok mempunyai sifat yang sama sebelum dilakukan intervensi (perlakuan).

3.2 Variabel Penelitian

3.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang kemungkinan berpengaruh dan berdampak terhadap hasil tertentu. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu pemberian variasi dosis dari kombinasi ekstrak etanol 70% daun ramania dengan glibenklamid kepada hewan uji.

3.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau menjadi akibat karena adanya variabel bebas. Variabel terikat pada penelitian ini yaitu terjadinya penurunan gula darah setelah pemberian

variasi dosis dari kombinasi ekstrak etanol 70% daun ramania dengan glibenklamid.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Determinasi Tanaman Ramania (*B. macrophylla*)

Tujuan dilakukannya determinasi tanaman untuk mendapatkan kebenaran identitas dengan jelas dari tanaman yang diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan utama yang digunakan dalam penelitian. Determinasi tanaman ramania dilakukan di Laboratorium Dasar FMIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru.

3.3.2 Pembuatan *Ethical Clearance* (EC)

Tujuan dilakukannya pengurusan *Ethical Clearance* agar subjek penelitian dalam hal ini yaitu hewan uji mendapatkan perlindungan dan sesuai dengan prinsip kesejahteraan hewan. Bagi peneliti dengan adanya *Ethical Clearance* memberi perlindungan kepada peneliti dan mempermudah dalam penerbitan jurnal nasional dan internasional terindeks.

3.3.3 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat-alat gelas laboratoriu (beaker glass, gelas ukur, erlenmeyer), ayakan

mesh 80, batang pengaduk, blender, glukometer *Easy Touch*, kandang mencit, kertas saring, labu ukur 10 ml, mortir dan stemper, neraca analitik listrik, neraca untuk hewan uji, pipet tetes, penangas air, rotary evaporator, sonde oral, sendok tanduk, spuit 1cc, dan tabung reaksi.

Bahan uji yang digunakan dalam praktikum ini yaitu asam klorida 2 M, aquadest, ekstrak etanol 70% daun ramania, etanol 70%, glibenklamid, glukosa, HCl pekat, larutan FeCl_3 1%, NaCl 10%, Na CMC 0,5%, pereaksi Dragendorff, serbuk Mg 0,1 mg, dan tes strip glukosa.

3.3.4 Pembuatan Simplisia Daun Ramania (*B. macrophylla*)

Daun ramania (*B. macrophylla*) segar diperoleh dari Kecamatan Karang Intan Martapura, kemudian dilakukan sortasi basah dan kering, dicuci dengan air sampai bersih, dirajang, kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari langsung dan ditutup kain hitam. Setelah kering dihaluskan dengan blender serta diayak menggunakan ayakan mesh 80 hingga diperoleh serbuk halus.

3.3.5 Pembuatan Ekstrak Etanol 70% Daun Ramania (*B. macrophylla*)

Serbuk yang diperoleh kemudian dilakukan maserasi dengan pelarut etanol 70% selama 72 jam dan remaserasi selama 72 jam dengan 3 kali pengadukan dalam 1 hari pada setiap harinya. Maserat

disaring, kemudian dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator. Ekstrak cair etanol 70% daun ramania kemudian diuapkan diatas penangas air hingga diperoleh ekstrak etanol 70% daun ramania yang kental dan pekat.

3.3.6 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia bertujuan untuk mengetahui golongan-golongan senyawa yang terdapat didalam simplisia. Skrining fitokimia ini meliputi pemeriksaan alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan polifenol, serta triterpenoid.

a. Uji alkaloid

Ekstrak etanol 70% daun ramania (*B. macrophylla*) ditambahkan 1 ml ammonia. Selanjutnya ditambahkan 10 ml kloroform, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh kemudian ditambahkan 10 ml asam sulfat, dikocok kuat-kuat, dibiarkan selama 1 menit hingga larutan asam sulfat dan kloroform memisah. Lapisan asam sulfat diambil dan dibagi ke dalam 3 buah tabung reaksi masing-masing tabung reaksi diuji dengan pereaksi Meyer, Dragendorff, dan Wagner untuk menentukan keberadaan alkaloid. Penambahan reagen Mayer membentuk endapan putih. Reagen Dragendorff menghasilkan endapan kemerahan dan wagner menghasilkan endapan kuning (Harahap dkk, 2021).

b. Uji flavonoid

Ekstrak etanol 70% daun ramania (*B. macrophylla*) sebanyak 0,5 gram dicampurkan dengan aquades lalu dipanaskan selama 3-5 menit, disaring sebanyak dua kali menggunakan kertas saring. Selanjutnya ditambah 0,1 mg bubuk Mg , ditambah 1 ml etanol 95% kemudian diberikan 2-3 tetes HCl pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah tua dan jingga selama 3 menit (Mokuna dkk, 2014).

c. Uji tanin

Ekstrak etanol 70% daun ramania (*B. macrophylla*) sebanyak 0,5 gram ditambahkan aquades sampai sampel terendam semuanya lalu dipanaskan selama 3-5 menit. Kemudian ditambahkan 2-3 tetes larutan NaCl 10% selanjutnya ditambahkan 5 tetes FeCl₃ 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau (Mokuna dkk, 2014).

d. Uji saponin

Ekstrak etanol 70% daun ramania (*B. macrophylla*) sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan aquades hingga seluruh sampel terendam, dididihkan selama 2-3 menit, dan selanjutnya didinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat. Hasil positif

ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil (Mokuna dkk, 2014).

e. Uji fenol

Ekstrak etanol 70% daun ramania (*B. macrophylla*) sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan aquades hingga seluruh sampel terendam, dididihkan selama 2-3 menit, dan selanjutnya ditetesi FeCl_3 5% 2-3 tetes menggunakan pipet tetes. Hasil yang positif ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi hitam (Mokuna dkk, 2014).

f. Uji steroid dan terpenoid

Ekstrak etanol 70% daun ramania (*B. macrophylla*) sebanyak 1 gram ditambahkan 2 mL klorofom didalam tabung reaksi, tambakan 1 tetes pereaksi Liebermann-Burchard. Terbentuknya warna merah menandakan adanya senyawa terpenoid dan terbentuknya warna biru atau ungu menandakan adanya senyawa steroid (Rasyid, 2012).

3.3.7 Persiapan Hewan Uji

Besaran sampel ditentukan dengan rumus *Federer* (Krisnawati, 2012) :

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

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

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

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan : t = jumlah kelompok dan n = jumlah sampel

Penelitian ini menggunakan hewan uji mencit putih jantan (*Mus musculus*), berbadan sehat, berumur 3-4 bulan dan memiliki berat badan berkisar 20-30 gram sebanyak 24 ekor yang diperoleh menggunakan rumus *federer*. Kemudian mencit dikondisikan dalam kandang selama 1 minggu.

3.3.8 Pembuatan Suspensi Na-CMC 0,5%

Sebanyak 0,5 gram Na-CMC dikembangkan dengan 10 ml air panas di dalam mortir, lalu digerus hingga homogen. Kemudian dituang kedalam gelas beker 100 ml, ditambahkan aquadest sampai 100 ml dan aduk hingga homogen.

3.3.9 Pembuatan Suspensi Obat Pembanding (Glibenklamid)

Glibenklamid tablet dihaluskan menjadi serbuk, kemudian hitung dosis glibenklamid 5 mg/kgBB lalu timbang serbuk glibenklamid. Setelah itu disuspensikan dengan larutan Na-CMC 0,5%, aduk hingga homogen.

3.3.10 Pembuatan Suspensi Ekstrak Etanol 70% Daun Ramania (*B. macrophylla*)

Suspensi ekstrak etanol 70% daun ramania yang digunakan ada 3 varian dosis yaitu 125 mg/g BB, 250 mg/g BB, dan 500 mg/g BB. Semua varian dosis ekstrak etanol 70% daun ramania tersebut dikombinasikan dengan suspensi glibenklamid.

3.3.11 Pembuatan Larutan Glukosa 50%

Glukosa sebanyak 5 gram dilarutkan dengan aquadest panas, kemudian volume dicukupkan hingga 10 ml dan aduk hingga larut. Dosis yang digunakan adalah 3 g/kg BB (Mokuna dkk, 2014).

3.3.12 Uji Pendahuluan

a. Penetapan Waktu Pemberian Glibenklamid

Tujuan penetapan pemberian glibenklamid untuk melihat pengaruh waktu pemberian terhadap efek hipoglikemik glibenklamid, sehingga saat uji intoleransi glukosa glibenklamid telah memberikan efek penurunan kadar glukosa darah. Orientasi ini menggunakan 3 ekor mencit yang terbagi dalam 3 kelompok waktu pemberian, yaitu pada menit ke-15, 30, dan 45 sebelum uji intoleransi glukosa. Semua pemberian dilakukan secara oral, kemudian dilakukan uji intoleransi glukosa dengan diberikan larutan glukosa 50% dosis 3g/kg BB. Pengambilan

cuplikan darah dilakukan pada menit ke-0 sebelum pemberian glibenklamid, lalu pada menit ke-30, 60, 90, dan 120 setelah pemberian larutan glukosa 50%. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai AUC menit ke-0 hingga ke-120. Penetapan waktu pemberian glibenklamid didasarkan pada nilai AUC terendah (Dewi, 2012).

b. Penetapan Waktu Pemberian Ekstrak Etanol 70% Daun Ramania

Tujuan penetapan pemberian ekstrak etanol 70% daun ramania untuk melihat pengaruh waktu pemberian terhadap efek penurunan kadar glukosa darah, sehingga saat uji intoleransi glukosa ekstrak etanol 70% daun ramania telah memberikan efek penurunan kadar glukosa darah. Orientasi ini menggunakan 2 ekor mencit yang terbagi dalam 2 kelompok waktu pemberian, yaitu pada menit ke-15 sebelum uji intoleransi glukosa dan bersamaan dengan uji intoleransi glukosa. Semua pemberian dilakukan secara oral, kemudian dilakukan uji intoleransi glukosa dengan diberikan larutan glukosa 50% dosis 3g/kg BB. Pengambilan cuplikan darah dilakukan pada menit ke-0 sebelum pemberian ekstrak etanol 70% daun ramania, lalu pada menit ke-30, 60, 90, dan 120 setelah pemberian larutan glukosa 50%. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai AUC menit ke-0 hingga

ke-120. Penetapan waktu pemberian ekstrak etanol 70% daun ramania didasarkan pada nilai AUC terendah (Dewi, 2012).

3.3.13 Uji Antidiabetes Metode Intoleransi Glukosa

Uji antidiabetes dilakukan dengan menggunakan 24 ekor mencit yang dikelompokkan menjadi 6 kelompok, masing-masing terdiri dari 4 ekor mencit. Mencit diadaptasikan terlebih dulu selama 1 minggu, kemudian dipuasakan selama 18 jam. Mencit yang telah dipuasakan ditimbang berat badannya, ditentukan kadar gula darah puasa. Kelompok uji diberikan sediaan uji secara oral. Kelompok I (kontrol negatif) diberi suspensi Na CMC 0,5%; kelompok II (kontrol glukosa) diberi larutan glukosa 50% dosis 3 g/kg BB. Kelompok III (kontrol positif) suspensi glibenklamid 5 mg/kgBB; kelompok IV diberi kombinasi suspensi ekstrak etanol 70% daun ramania 125 mg/kg BB dengan suspensi glibenklamid; kelompok V diberi kombinasi suspensi ekstrak etanol 70% daun ramania 250 mg/kg BB dengan suspensi glibenklamid; dan kelompok VI diberi kombinasi suspensi ekstrak etanol 70% daun ramania 500 mg/kg BB dengan suspensi glibenklamid. Setelah 30 menit kemudian, kelompok III-VI diberi larutan glukosa 50% dosis 3g/kg BB secara oral. Dilakukan pengukuran kadar glukosa darah mencit pada menit ke-0 sebelum perlakuan, lalu pada menit ke-30, 60, 90, dan 120 setelah pemberian larutan glukosa 50% dengan menggunakan alat *glucometer* (0,5 ml) (Mokuna dkk, 2014). Pengukuran glukosa darah dilakukan pada menit

ke-30, 60, 90, dan 120 dikarenakan kadar glukosa darah pada individu normal meningkat dalam 1 jam setelah pemberian glukosa oral. Absorpsi glukosa menjadi normal kembali setelah 2-3 jam setelah pemberian glukosa (Permadi, 2012).

3.3.14 Cara Pengambilan Darah dan Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Darah mencit diambil melalui vena lateralis ekor mencit yang sebelumnya disterilkan dengan alkohol 70%. Dilakukan pemijatan perlahan terhadap ekor agar darah keluar, kemudian darah diteteskan pada strip *Easy Touch* dan glukometer akan menunjukkan kadar glukosa darah mencit yang terukur. Pengambilan dan pengukuran kadar glukosa darah dilakukan pada hari ke 8 setelah mencit diadaptasi selama 1 minggu dan dipuaskan selama 18 jam. Kelompok I (Na-CMC 0,5%) dilakukan pengukuran pada menit ke-0 sebelum perlakuan lalu pada menit ke-30, 60, 90, dan 120 setelah diberikan perlakuan. Kelompok II (glukosa 50%) dilakukan pengukuran pada menit ke-0 sebelum perlakuan lalu pada menit ke-30, 60, 90, dan 120 setelah diberikan perlakuan. Kelompok III (glibenklamid); kelompok IV (kombinasi ekstrak etanol 70% daun ramania 125 mg/kg BB dengan glibenklamid); kelompok V (kombinasi ekstrak etanol 70% daun ramania 250 mg/kg BB dengan glibenklamid); kelompok VI (kombinasi ekstrak etanol 70% daun ramania 500 mg/kg BB dengan glibenklamid) dilakukan pengukuran pada menit ke-0 sebelum perlakuan lalu pada menit ke-30, 60, 90, dan 120 setelah diberikan

larutan glukosa 50%. Setelah didapatkan data kadar gula darah mencit, dibuat kurva untuk membandingkan nilai kadar glukosa darah dari menit ke-0 sampai menit ke-120 dengan metode *trapezoid* ($AUC_{t_0-t_n}$). Rumus yang digunakan adalah :

$$AUC_{t_0-t_n} = \frac{t_{1-0}}{2} (C_0 + C_1) + \frac{t_{2-1}}{2} (C_1 + C_2) + \frac{t_n-t_{n-1}}{2} (C_{n-1} + C_n)$$

Keterangan :

t = waktu (menit)

C = kadar gula darah (mg/dL)

$AUC_{t_0-t_n}$ = luas daerah dibawah kurva dari menit ke-0 hingga ke-n

Setelah nilai AUC_{0-120} diperoleh, maka persentase penurunan kadar gula darah (%PKGD) dihitung. Rumus yang digunakan adalah :

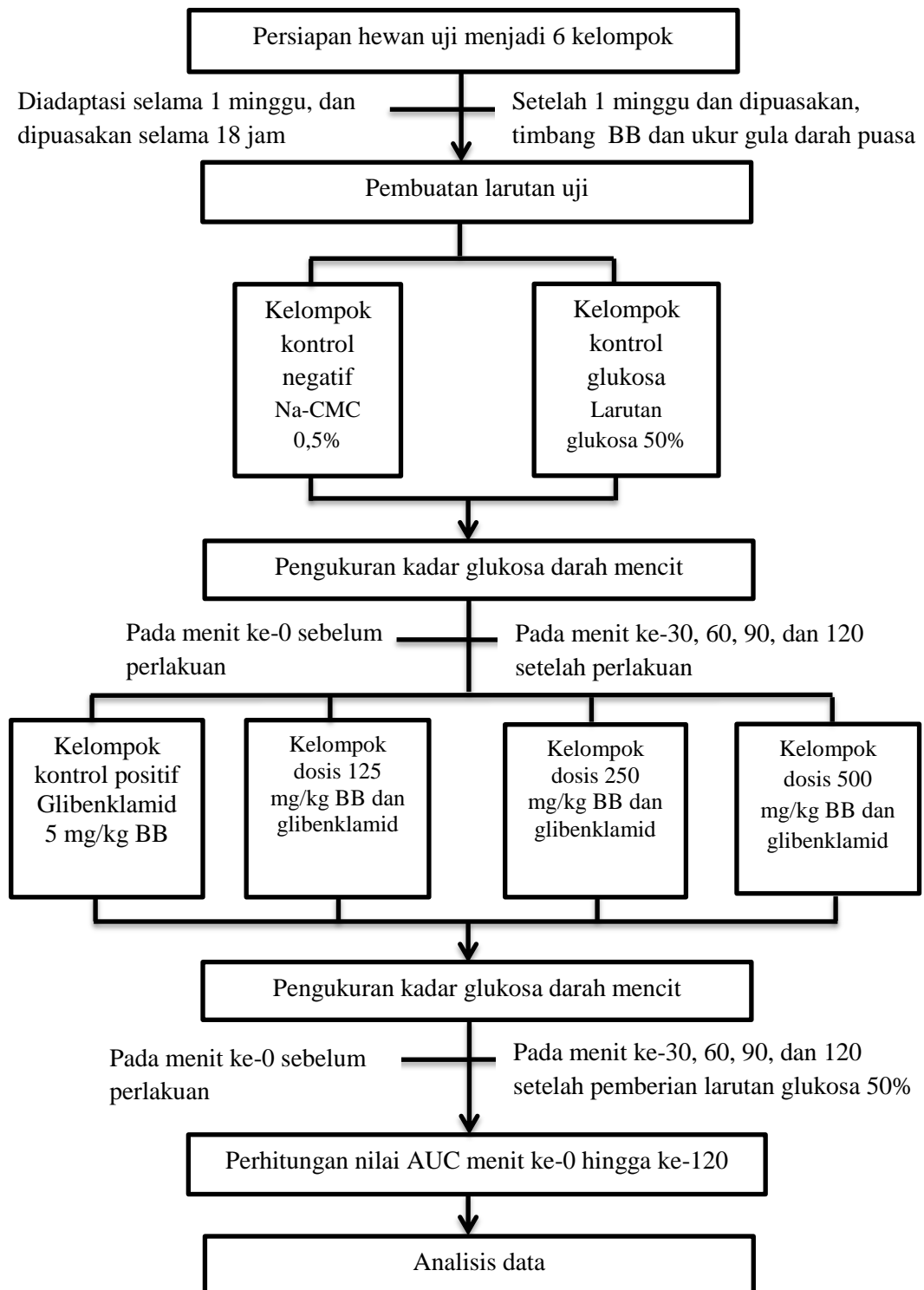
$$\%PKGD = \left[1 - \frac{AUC_{0-120 \text{ perlakuan}} - AUC_{0-120 \text{ kontrol negatif}}}{AUC_{0-120 \text{ kontrol glukosa}} - AUC_{0-120 \text{ kontrol negatif}}} \times 100\% \right]$$

(Arya, 2021).

3.3.15 Analisis Data

Data AUC_{0-120} kadar glukosa darah mencit dianalisis secara statistik dengan uji normalitas *Saphiro Wilk* karena sampel ≤ 50 , apabila data yang diperoleh terdistribusi secara normal maka dilanjutkan dengan uji varian *Levene Test* untuk mengetahui varian pada kelompok data dan uji *One-Way ANOVA* untuk melihat perbedaan antar kelompok. Apabila data memiliki varian yang sama, maka dilanjutkan dengan uji *Post hoc LSD*, apabila memiliki varian yang berbeda maka dilanjutkan *Post hoc Tamhane's* (Arya, 2021).

3.4 Cara Kerja Penelitian (Skematis)



Gambar 3. Cara Kerja