

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental dengan rancangan acak untuk mengetahui aktivitas antidiabetes yang terjadi pada hewan uji setelah diberikan ekstrak etanol 70% daun Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1. Waktu Penelitian

Waktu penelitian ini akan dilakukan pada bulan Mei-Juni 2022.

3.2.2. Tempat Penelitian

Tempat penelitian akan dilaksanakan :

1. Laboratorium Bahan Alam Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES)Borneo Lestari.
2. Laboratorium Farmakologi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES)Borneo Lestari.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis ekstrak etanol 70% daun Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm).

3.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah persentase penurunan kadar glukosa darah pada mencit.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1. Alat

Alat - alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu batang pengaduk, botol gelap, corong pisah, gelas ukur, gelas kimia, labu ukur pipet tetes, spuit oral 1 mL, timbangan hewan, mortir dan stamper, jarum oral, sonde, corong, wadah maserat, strip gula darah, pH paper, ayakan ukuran 40 mesh, *rotary evaporator*, *waterbath*, dan *stopwatch*.

3.4.2. Bahan

Bahan – bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu Daun Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm), mencit jantan, aquadest, etanol 70%, alkohol, kain flannel, Na-CMC 0,5%, Glibenklamid 5 mg 20 tablet, Streptozotocin, buffer, Na-sitrat, HCL 2N, pereaksi Wagner, pereaksi Dragendroff, pereaksi Lieberman-Burchat, HCL pekat, Gelatin, FeCL₃, serbuk Mg, gelatin.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1. Pengambilan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Daun Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm), yang diperoleh di daerah Kandangan, Kalimantan Selatan.

3.5.2. Determinasi Tanaman

Tumbuhan Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm), yang terdiri dari batang dan daun kemudian dideterminasi di laboratorium Dasar FMIPA Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru.

3.5.3. Ethical Clearance

Pembuatan Ethical Clearance dilakukan di komite Etik Fakultas Kedokteran dan Kesehatan Universitas Islam Indonesia Yogyakarta.

3.5.4. Pembuatan Simplisia Daun Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm)

Simplisia dibuat dengan cara daun tandui yang segar yang disortasi basah kemudian dicuci, dirajang dan dilanjutkan dengan proses pengeringan dengan cara diangin-anginkan atau dijemur di bawah sinar matahari menggunakan wadah yang ditutup dengan kain hitam sampai kering. Serbuk simplisia kemudian disimpan dalam wadah tertutup rapat hingga dilakukan proses ekstrak. Sortasi kering kemudian simplisia dihaluskan dengan menggunakan blander dan diayak dengan ayakan mesh 40 dan ditimbang (Fitriyanti, 2019).

3.5.5. Pembuatan Ekstrak Etanol 70% Daun Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm)

Serbuk simplisia daun Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm) ditimbang sebanyak 200g dan ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 1L (1:5). Sese kali diaduk pada enam jam pertama, lalu didiamkan selama 18 jam. Kemudian sering menggunakan kertas saring sehingga diperoleh filtrate dan residunya. Residu penyaringan dimaserasi kembali (remaserasi) sebanyak dua kali hingga filtrat menjadi bening dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Ekstrak cair yang didapat, kemudian dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50° C dan dipekatkan menggunakan *waterbath* dengan suhu 40° C sampai kental dan didapatkan bobot tetap (Ernawati & Nurliani, 2012; Depkes RI, 2017; Saputri dkk., 2019). Rendemen ekstrak dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Rendemen simplisia} = \frac{\text{Bobot simplisia yang diperoleh}}{\text{Bobot daun tandui awal}} \times 100\%$$

3.5.6. Metode Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan kandungan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan ataupun hewan dengan menggunakan penyari tertentu. Eksrtak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan cara mengekstraksi zat aktif dengan menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk

yang tersisa diperlakukan sedemikian, hingga memenuhi baku yang ditetapkan (Depkes RI 1995).

3.5.6.1. Metode Ekstraksi Secara Dingin

1. Maserasi

Metode maserasi merupakan metode ekstra paling sederhana. Proses ekstraksi dilakukan dengan cara merendam sampel pada suhu kamar menggunakan pelarut yang sesuai sehingga dapat melarutkan analit dalam sampel. Sampel biasanya direndam selama tiga sampai lima hari sambil diaduk sesekali untuk mempercepat proses pelarut analit. Ekstraksi dilakukan berulang kali sehingga analit terekstraksi sempurna yang ditandai dengan pelarut yang sudah tidak berwarna. Kelebihan ekstraksi secara maserasi adalah alat dan cara yang digunakan sangat sederhana, dapat digunakan untuk analit baik yang tahan terhadap pemanasan maupun yang tidak tahan terhadap pemanasan (Leba, 2017).

2. Perkolasi

Metode perkolasi, serbuk sampel dibasahi secara perlahan dalam sebuah alat perkolato yang terbentuk wadah silinder yang dilengkapi dengan kran pada bagian baahnya. Pelarut ditambahkan pada bagian atas serbuk sampel dan dibiarkan menetes perlahan pada bagian bawah. Kekurangan dari metode perkolasi adalah jika sampel dalam pelarut akan sulit menjangkau seluruh area. Selain itu, metode

ini juga membutuhkan banyak pelarut dan memakan waktu (Mukhriani, 2014).

3.5.6.2. Metode Ekstraksi Secara Panas

1. Soxlet

Metode ini dilakukan dengan menempatkan serbuk sampel dalam sarung selulosa (dapat digunakan kertas saring) dalam klonsong yang ditempatkan di atas labu dan di bawah kondensor. Pelarut yang sesuai dimasukkan ke dalam labu dan suhu penangas yang telah diatur. Kekurangan dari metode soxhlet adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi karena ekstrak yang diperoleh terus-menerus berada pada titik didih (Mukhriani, 2014).

2. Refluk & Destilasi Uap

Metode reflux, sampel dimasukkan bersama pelarut ke dalam labu yang dihubungkan dengan kondensor. Pelarut dipanaskan hingga mencapai titik didih. Uap terkondensasi dan kembali ke dalam labu. Destilasi uap memiliki panas yang sama dan biasanya digunakan untuk mengekstraksi minyak esensial (campuran berbagai senyawa menguap). Selama pemanasan, uap terkondensasi dan desilat (terpisah sebagai dua bagian yang tidak saling bercampur) ditampung dalam wadah yang terhubung dengan kondensor (Mukhriani, 2014).

3.5.7. Skrining Fitokimia

1. Flavonoid

Diambil 0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan 10 mL aquadest kemudian ditambahkan sedikit serbuk Mg dan HCl pekat sebanyak 1 mL dan 1 mL amilalkohol kemudian digojog kuat. Positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amilalkohol (Megawati, 2016).

2. Saponin

Diambil 0,5 gram ekstrak kental ditambahkan dengan 2 mL aquadest, kemudian digojok selama 10 detik. Positif saponin ditandai dengan terbentuknya buih yang stabil selama tidak dari 10 menit setelah penambahan HCl 2N (Megawati, 2016).

3. Tanin

Diambil 0,1 gram ekstrak kental ditambahkan dengan 10 mL aquadest, kemudian disaring dan ditambahkan 2 mL fitrat dengan 2 mL larutan gelatin 1 % yang mengandung NaCl positif tannin ditandai dengan terbentuknya endapan putih (Megawati, 2016).

4. Alkaloid

Diambil 0,5 gram ekstrak kental ditambahkan dengan 5 mL larutan dibagi menjadi 3 tabung. Kemudian ditambahkan pereaksi Dragendorf pada tabung pertama sebanyak 3 tetes, pereaksi Mayer pada tabung kedua sebanyak 3 tetes dan pereaksi Wagner sebanyak 3 tetes pada tabung ketiga. Positif alkaloid ditandai dengan terbentuknya

endapan jingga pada tabung pertama, endapan putih hingga kekuningan pada tabung kedua dan endapan coklat atau kemerahan pada tabung ketiga (Simaremare, 2014).

5. Fenol

Diambil 0,5 gram ekstrak kental ditambahkan dengan 3 tetes larutan FeCl₃ 3% positif fenol ditandai dengan terbentuknya warna hitam hijau kebiruan (Simaremare, 2014).

6. Triterpenoid

Diambil 0,5 gram ekstrak kental ditambahkan dengan 0,5 mL kloroform dan 0,5 mL asam asetat anhidrat dan 2 mL H₂SO₄ pekat. Larutan ekstrak digojok secara perlahan dan dibiarkan selama beberapa menit. Positif steroid ditandai dengan terbentuk warna biru atau hijau, sedangkan hasil positif triterpenoid terbentuk cincin kecoklatan violet (Simaremare, 2014).

3.6.1. Pemilihan dan Penyiapan Hewan Uji

Hewan yang digunakan yaitu mencit jantan yang sehat sebanyak 25 ekor dengan berat badan 20-30 gram. Sebelum perlakuan, mencit diadaptasikan selama 7 hari dengan kondisi laboratorium dan diberi makan minum standar untuk menghindari stress pada hewan uji pada saat perlakuan.

3.6.2. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Etanol 70% Daun Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm)

Daun tandui secara empiris digunakan sebagai antidiabetes pada manusia yaitu selebar satu helai daun tandui direbus 2 gelas air, bisa digunakan diminum 2 kali sehari yang digunakan sebagai pengobatan diabetes. Untuk mengetahui dosis optimum, dilakukan penimbangan dosis empiris dan tandui ditimbang di dapatkan 5 gram untuk 2 kali minum, dan untuk 1 kali minum 2,5 gram x faktorkonversi ke mencit yaitu, $2500 \text{ mg} \times 0,0026 = 6,5 \text{ mg}/20\text{gBB}$, dilakukan optimasi dosis yang bervariasi yaitu $2,1 \text{ mg}/20\text{gBB}$, $4,2 \text{ mg}/20\text{gBB}$, dan $8,4 \text{ mg}/20\text{g}$, kemudian dilarutkan dalam larutan Na-CMC 0,5% ad 10 ml.

3.6.3. Pembuatan Suspensi Larutan Glibenklamid

Tablet Glibenklamid harus digerus terlebih dahulu ditimbang dahulu, serta ditimbang sesuai bobot yang diperlukan. Serbuk glibenklamid yang sudah ditimbang kemudian dilarutkan dalam larutan Na-CMC 0,5% sampai volume 10 ml. Dosis glibenklamid adalah $5 \text{ mg}/70 \text{ kgBB}$. perhitungan dosis untuk glibenklamid yang diberikan pada mencit.

Konversi manusia ke mencit $20\text{g} = 0,0026$

Dosis glibenklamid pada manusia dewasa = 5 mg

Dosis glibenklamid pada mencit = $0,0026 \times 5 = 0,013 \text{ mg}/20\text{gBB}$ mencit

Karena mencit yang digunakan memiliki rerata berat badan 30 gram, maka perhitungan dosis selanjutnya disesuaikan dengan berat badan yang digunakan.

$$(30 \text{ g})/(20 \text{ g}) \times 0,013 \text{ mg} = 0,0195 \text{ mg}/30 \text{ gBB} \text{ mencit.}$$

3.6.4. Pengelompokan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit umur 2 -3 bulan dengan berat badan \pm 200-360 gram sebanyak 25 ekor dibagi secara acak 5 ekor untuk setiap kelompok perlakuan. Adapun pembagian kelompok perlakuannya sebagai berikut:

- Kelompok I : Kelompok kontrol negatif hewan uji diberikan Na-CMC 0,5 %
- Kelompok II : Kelompok kontrol positif hewan uji diberikan larutan Glibenklamid 0,013 mg/20gBB.
- Kelompok III : Sebagai kelompok uji diberikan ekstrak etanol 70% daun Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm) 2,1 mg/20gBB.
- Kelompok IV : Sebagai kelompok uji diberikan ekstrak etanol 70% daun Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm) 4,2 mg/20gBB.
- Kelompok V : Sebagai kelompok uji diberikan ekstrak etanol 70% daun Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm) 8,4 mg/20g BB.

3.6.5. Uji Aktivitas Antidiabetes

Pada pengujian penurunan kadar glukosa darah pada hari ke- 1 sampai hari Ke- 3 mencit diinduksi streptozotocin dosis 50 mg/20g BB, yang diberikan secara intraperitoneal dengan volume pemberian 0,5 ml. Sebelumnya Streptozotocin sudah dilarutkan di buffer Na- sitrat pH 4,5 kemudian mencit dari masing-masing kelompok yang telah dinyatakan hiperglikemik selanjutnya diberikan perlakuan sampai hari ke-8 secara oral

yaitu, kelompok I, II dan III diberikan ekstrak daun tandui sesuai volume pemberian dengan dosis masing- masing 2,1 mg/20g BB, 4,2 mg/20g BB dan 8,4 mg/20g BB. Kelompok kontrol positif diberikan larutan Glibenklamid 0,013 mg/20g BB sesuai volume pemberian, dan kelompok kontrol negatif diberi Na-CMC 0,5% sesuai volume pemberian. Kelima kelompok perlakuan diukur KGD pada hari ke-0, ke-3, ke-6, dan ke-9. (Karmila, 2018).

3.7. Analisis Data

Data yang diperoleh akan dianalisis dan diolah menggunakan program SPSS. Sebelum dilakukan analisis, dilakukakan uji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu. Tujuan dilakukannya uji normalitas yaitu untuk melihat data yang dilakukan memiliki distribusi normal atau tidak. Normalitas dipenuhi jika hasil uji signifikan dengan nilai sig ($p > 0,05$). Sebaliknya jika nilai sig lebih