

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental terkait uji efektivitas kombinasi ekstrak etanol 70% daun ramania (*B. macrophylla* Griffith) dan glibenklamid pada mencit putih jantan dengan induksi aloksan.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Desember 2021-Maret 2022 dan tempat yang digunakan untuk melakukan penelitian ini adalah :

1. Laboratorium Bahan Alam Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES) Borneo Lestari untuk melakukan proses pembuatan ekstrak daun ramania (*B. macrophylla* Griffith)
2. Laboratorium Farmakologi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES) Borneo Lestari untuk melakukan uji efektivitas antidiabetes kombinasi ekstrak etanol 70% daun ramania (*B. macrophylla* Griffith) dan glibenklamid pada mencit putih jantan dengan induksi aloksan.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1. Variabel Bebas (*Independent Variabel*)

Variabel Bebas (*Independent Variabel*) merupakan variabel yang kemungkinan berpengaruh dan berdampak terhadap hasil tertentu. Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian variasi dosis dari kombinasi ekstrak etanol 70% daun ramania (*B. macrophylla* Griffith) dengan glibenklamid pada mencit putih jantan yang diinduksi aloksan.

3.3.2. Variabel Terikat (*Dependent Variabel*)

Variabel terikat (*Dependent Variabel*), merupakan variabel yang dipengaruhi atau menjadi akibat karena adanya variabel bebas. Variabel terikat pada penelitian ini yaitu terjadi penurunan kadar glukosa darah setelah pemberian sampel pada mencit putih jantan yang diinduksi aloksan.

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan yaitu alat cek gula darah glukometer (Gluco Dr), batang pengaduk, corong pisah (Pyrex®), erlenmeyer (Iwaki®), gelas beker (Iwaki®), gelas ukur (Iwaki®), kandang hewan, kapas, labu ukur 10 ml (Pyrex®), labu ukur 100 ml (Pyrex®), pipet tetes, sonde oral, silet, spuit 1 ml, blender (Phillips), timbangan analitik, dan timbangan mencit.

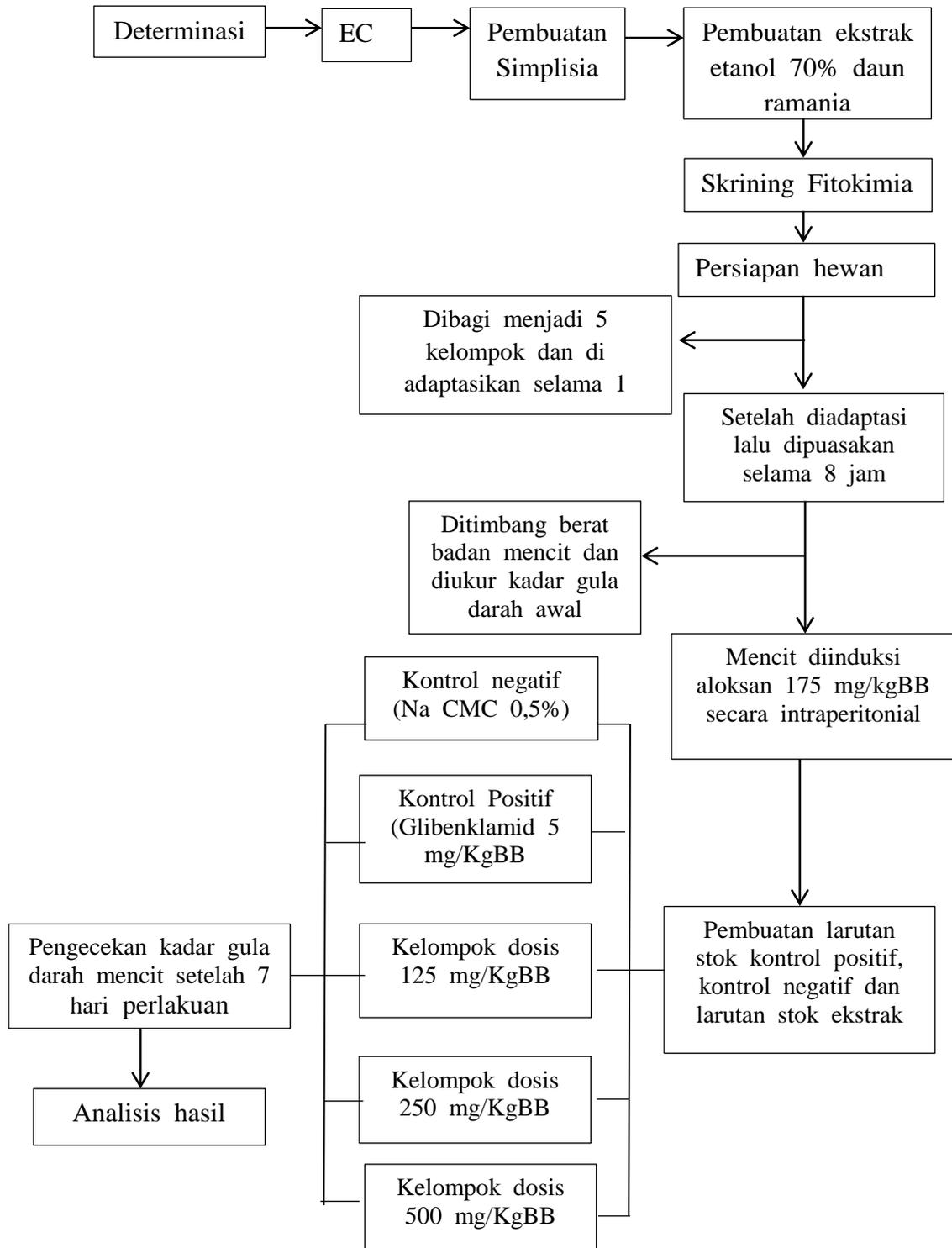
3.4.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan yaitu hewan uji mencit jantan, alkohol 70%, aloksan monohidrat, aquadest, glibenklamid 5 mg, ekstrak daun ramania (*B. macrophylla* Griffith), Na-CMC dan infus NaCl.

3.5 Hewan Uji

Hewan uji yang dilakukan pada penelitian ini adalah mencit putih jantan berjumlah sebanyak 25 ekor dengan kondisi sehat. Berumur 2 sampai 3 bulan dengan bobot 20 sampai 35 gram.

3.6. Kerangka Penelitian



Gambar 3. Konsep Penelitian

3.7. Prosedur Penelitian

3.7.1. Determinasi Tanaman Ramania (*B. macrophylla* Griffith)

Sebelum dilakukan penelitian, Tanaman Ramania (*B. macrophylla* Griffith) terlebih dahulu dideterminasi untuk mengidentifikasi jenis dan memastikan kebenaran simplisia. Determinasi dilakukan di Laboratorium Dasar FMIPA Universitas Lambung Mangkurat (UNLAM).

3.7.2. Pembuatan *Ethical Clearance*

Pada hewan uji dilakukan *ethical clearance* di Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat Banjarmasin. Hasil untuk mengetahui apakah layak etik atau tidak pada penelitian tersebut.

3.7.3. Pengumpulan Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun ramania (*B. macrophylla* Griffith), yang diperoleh dari daerah karang intan kabupaten banjar.

3.7.4. Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dengan cara merendam simplisia dengan pelarut etanol 70%. Simplisia sebanyak 245,48 gram dimaserasi menggunakan etanol 70% sebanyak 4 liter selama tiga hari, setiap 8 jam sekali dilakukan pengadukan selama 30 menit, selanjutnya dilakukan remaserasi. Filtrat yang didapat dari hasil maserasi dan remaserasi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C agar senyawa

yang berkhasiat di dalamnya tetap stabil sampai diperoleh filtrat yang masih dapat mengalir. Tujuan dipekatkan menggunakan rotary evaporator yaitu untuk menghilangkan etanol dan mempercepat proses penguapan di atas waterbath untuk mendapatkan ekstrak kental yang diinginkan. Tujuan diuapkan di atas waterbath bertujuan untuk menghilangkan sisa etanol dan air. penelitian ini menghasilkan rendemen sebesar 3,68%. Hasil perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran

3.7.5. Skrining Fitokimia

Ekstrak kental etanol 70% daun ramania (*B. macrophylla* Griffith), selanjutnya diambil sedikit dan dilarutkan dalam 10 ml etanol selanjutnya diuji senyawa kimianya

1. 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).

2. 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).

3. Uji Alkaloid

Ekstrak metanol ditambahkan 1 ml ammonia. Selanjutnya ditambahkan 10 ml kloroform kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh kemudian ditambahkan 10 ml asam sulfat 2N dikocok kuat-kuat dibiarkan selama 1 menit sampai 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. Hasil tersebut menunjukkan proses mengandung senyawa alkaloid (Mokuna dkk, 2014).

4. 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).

5. 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).

6. 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).

3.7.6. Persiapan Hewan Uji

Mencit yang akan digunakan diadaptasikan terlebih dahulu selama tujuh hari. Setelah itu dipuasakan selama 8 jam. Kemudian mengukur kadar glukosa darah pada hari ke 0 dengan menggunakan alat *glucometer*. Mencit diinduksi dengan aloksan secara inreaperitorial dengan tiga dosis. Setelah 24 jam

atau pada hari ke-2 dilakukan mengecek kadar glukosa darah mencit menggunakan *glucometer*. Mencit yang menunjukkan kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dl diberikan sediaan secara oral sesuai dengan pembagian kelompok dan sediaan secara berturut-turut selama tujuh hari. Jumlah sample dalam tiap kelompok pada penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus *Federer* :

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

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

$$n \geq 5$$

keterangan :

n : Jumlah sampel

t : Jumlah Kelompok

3.7.7. Pembuatan Kontrol Negatif Na-CMC 0,5%

Pembuatan suspensi Na-CMC 0,5% sebanyak 1 g, Na-CMC dileburkan dalam mortir yang berisi 10 ml *aquadest* panas, dikembangkan selama kurang lebih 15 menit lalu dihomogenkan hingga diperoleh massa yang transparan. Setelah itu ditambahkan *aquadest* hingga volumenya dicukupkan dengan *aquadest* hingga 200 ml.

3.7.8. Pembuatan Kontrol Positif Glibenklamid

Pembuatan suspensi glibenklamid sebagai kontrol positif dibuat dengan menimbang glibenklamid sebanyak 230,8 mg. Dimasukkan kedalam beker gelas ditambahkan larutan Na-CMC 0,5% sebanyak 10 ml dengan labu ukur sedikit demi sedikit aduk hingga homogen.

3.7.9. Uji Antidiabetes

Mencit yang akan digunakan diadaptasikan terlebih dahulu selama tujuh hari. Setelah itu dipuasakan selama 8 jam. Kemudian mengukur kadar glukosa darah pada hari ke 0 dengan menggunakan alat *glucometer*. Mencit diinduksi dengan aloksan secara inreaperitonal dengan tiga dosis. Setelah 24 jam atau pada hari ke-2 dilakukan pengecekan kadar glukosa darah mencit menggunakan *glucometer*. Mencit yang menunjukkan kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dl diberikan sediaan secara oral sesuai dengan pembagian kelompok dan sediaan secara berturut-turut selama tujuh hari. Dikelompokkan menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dosis uji A, dosis uji B, dan dosis uji C. Masing masing kelompok diberi sediaan berikut yaitu :

1. Kelompok kontrol negatif, diberikan suspensi Na-CMC 0,5%.
2. Kelompok kontrol positif, diberikan glibenklamid dalam dosis 5 mg dalam suspensi Na-CMC 0,5%.
3. Kelompok uji hewan A, diberikan Ekstrak Etanol 70% Daun Ramania (*B.macrophylla* Griffith) dengan dosis 125 mg/kgBB kombinasi glibenklamid dalam suspensi Na-CMC 0,5%.
4. Kelompok uji hewan B, diberikan Ekstrak Etanol 70% Daun Ramania (*B.macrophylla* Griffith) dengan dosis 250

mg/kgBB kombinasi glibenklamid dalam suspensi Na-CMC 0,5%.

5. Kelompok uji hewan C, diberikan ekstrak etanol 70%. Daun Ramania (*B.macrophylla* Griffith) dengan dosis 500 mg/KgBB kombinasi glibenklamid dalam suspensi Na-CMC 0,5%.

3.8. Pengolahan dan Analisis Data

Uji analisis data penurunan kadar gula darah mencit putih jantan dengan 5 kelompok perlakuan, yaitu menggunakan aplikasi SPSS dengan uji Shapiro-Wilk untuk mengetahui distribusi data dan Levene Statistic Test Untuk mengetahui homogenitas varian dosisnya. Apabila terdistribusi normal dan homogeny maka dilanjutkan dengan uji Oneway Anova dan uji *post hoc* LSD (Liem dkk, 2015).