

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah daun gamal (*Gliricidia sepium*) yang diperoleh dari daerah Bajawa, Nusa Tenggara Timur.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun gamal (*Gliricidia sepium*) segar, tidak busuk, warna hijau, bebas dari hama.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama adalah ekstrak etanol daun gamal (*Gliricidia sepium*). Variabel utama kedua adalah penurunan kadar glukosa darah pada mencit jantan.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama. Berisi perpesi berdasarkan keseluruhan variabel yang diperlukan secara langsung. Variabel utama sudah dipersepsi bisa digolongkan kembali menjadi beragam variabel.

Variabel bebas. Variabel yang telah dirancang untuk dianalisis pengaruh terhadap variabel tergantung. Variabel bebas penelitian ini adalah variasi dosis dari ekstrak etanol daun gamal (*Gliricidia sepium*).

Variabel tergantung. Adalah pusat persoalan yang merupakan tolak ukur penelitian ini. Dimana variabel tergantung penelitian ini adalah khasiat antihiperleglikemia dari ekstrak etanol daun gamal (*Gliricidia sepium*) dengan metode uji *Oral Sucrose Tolerance Test* (OSTT).

3. Defenisis operasional variabel utama

Pertama, sampel daun gamal (*Gliricidia sepium*) adalah daun gamal yang dipetik dari pohonnya dalam keadaan segar, tidak busuk, diambil dari daerah Bajawa.NTT.

Kedua, serbuk daun gamal adalah simplisia daun gamal yang sudah melalui proses penyerbukan dan diayak menggunakan ayakan mesh 40 sehingga serbuk menjadi kering, halus, dan seragam.

Ketiga, ekstrak daun gamal adalah daun gamal yang sudah diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96%.

Keempat, dosis ekstrak daun gamal adalah kontraksi atau kadar ekstrak daun gamal yang dibuat dalam berbagai variasi konsentrasi kemudian diberikan kepada mencit secara oral.

Kelima, hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan putih (*Mus musculus*) yang berumur (2-3 bulan) dengan bobot (20-30 gram).

Keenam, acarbose adalah obat yang digunakan dalam menurunkan kadar glukosa darah dan juga digunakan sebagai kontrol obat dalam penelitian.

Ketujuh, dosis efektif adalah dosis yang optimal dalam memberi pengaruh penurunan kadar glukosa darah yang setara dengan pemberian acarbose.

Kedelapan, target terapi adalah penurunan kadar glukosa darah hingga mencapai kadar normal (62,8-176 mg/dL) tetapi tidak sampai di bawah batas kadar normal.

C. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya adalah alat gelas, alat timbang, bejana maserasi, penangas air, ayakan, pisau, blender, batang pengaduk, kertas saring, kain flanel, corong pisah, gelas beaker, vacum rotary evaporator, kandang mencit, timbangan elektronik, spuit injeksi, sonde oral, glukometer Easy Touch, glucose strip test, jarum suntik, gelas ukur, stopwatch, tabung reaksi, rak tabung reaksi, lampu bunsen, kaki tiga.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya yaitu daun gamal segar, etanol 96%, aquadest, mencit putih jantan, pakan dan minum mencit, Na CMC 0,5% akarbose.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini yaitu mencit jantan sehat jumlah 25 ekor dengan rata-rata umur (2-3 bulan) dan rata-rata berat badan (20-30 gram) yang diperoleh dari Universitas Setia Budi Surakarta dalam kondisi sehat dan tidak cacat.

D. Jalan Penelitian

1. Determinasi tanaman gamal

Tujuan dari determinasi tanaman gamal ini adalah untuk menentukan ketepatan sampel daun gamal yang berhubungan dengan ciri-ciri morfologi secara makroskopis tanaman pada pustaka. Identifikasi daun gamal dilaksanakan di Universitas Sebelas Maret

2. Pengumpulan dan penyiapan bahan

Daun gamal dipetik dalam keadaan segar yang berasal dari daerah Bajawa, NTT. Daun yang digunakan adalah daun yang masih segar, tidak busuk, dan bebas dari hama.

3. Pembuatan serbuk daun gamal

Daun gamal yang sudah terkumpul, sortasi basah untuk menghilangkan kotoran yang menempel ketika proses pemetikan, cuci bersih daun gamal dari kotoran yang menempel pada daun gamal dengan air bersih yang mengalir, lalu diranjang kemudian dilakukan pengeringan dengan cara dijemur di bawah sinar matahari. Setelah kering, daun gamal dihancurkan menggunakan blender, kemudian serbuk simplisia daun gamal diayak untuk mendapatkan serbuk dengan ukuran yang sama guna dilakukan maserasi.

4. Penetapan susut pengering serbuk daun gamal

Penetapan susut pengering bersumber dari Farmakope Herbal Indonesia, 2017 kecuali dinyatakan lain pada monografi, simplisia wajib dalam wujud serbuk menggunakan derajat halus nomor 8, suhu oven 105°C dan susut pengeringan ditentukan dengan cara menimbang seksama 1 hingga 2 gram serbuk daun gamal di botol timbang dengan tutup rapat yang terlebih dahulu sudah dipanaskan dengan suhu penentuan dan ditara. Ratakan serbuk di botol timbang sampai menghasilkan lapisan setebal ± sehingga 10mm, buka tutupnya dan masukan ke oven dikeringkan sehingga bobot tetap. Sebelum melakukan pengeringan, diamkan botol di dalam desikator sampai suhu ruang. Rumus kadar air :

$$= \frac{\text{bobot sebelum dikeringkan} - \text{bobot sudah dikeringkan}}{\text{bobot sebelum dikeringkan}} \times 100\%$$

5. Penetapan kadar air pada serbuk daun gamal

Penetapan kadar air serbuk bersumber dari Farmakope Herbal Indonesia, 2017 pertama yang harus dilakukan yaitu menimbang serbuk 20 gram lalu masukkan kedalam labu kering lakukan penyulingan dengan pelarut toluene 200 mL dan 10 mL aquades

sebagai pelarut. Lakukan ECC sampai jernih lalu bisa dikatakan jenuh. Lalu hitung kadar air pada serbuk.

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{volume air terbaca}}{\text{berat bahan uji}} \times 100\%$$

6. Penetapan kadar air pada ekstrak etanol daun gamal

Penetapan kadar air ekstrak bersumber dari Farmakope Herbal Indonesia, 2017 pertama yang harus dilakukan yaitu menara botol kurs lalu menimbang ekstrak 10 gram, kemudian masukan kedalam oven pada temperatur 105°C dengan durasi 5 jam dengan ditimbang. Masukan kembali kedalam oven dengan jeda waktu 1 jam hingga terdapat perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% atau 0,005.

7. Pembuatan ekstrak etanol daun gamal

Pembuatan ekstrak bersumber dari Farmakope Herbal Indonesia, 2017 yaitu mengolah ekstrak serbuk dibuat dari serbuk kering simplisia menggunakan cara maserasi dengan menggunakan pelarut yang cocok. Serbuk daun gamal ditimbang sebanyak 500 gram, lalu serbuk tersebut dimasukan kedalam botol coklat maserasi lalu ditambahkan dengan etanol 96% sebanyak 5 L. rendam selama 6 jam sambil sekali-sekali digojok, lalu diamkan sepanjang 18 jam. Ulangi lagi proses penyaringan menggunakan jenis pelarut yang pertama. Hasil maserasi yang terbentuk disaring terlebih dahulu untuk memisahkan filtrat. Kemudian maserasi yang telah diperoleh dipisahkan menggunakan rotary evaporator hingga menghasilkan ekstrak kental. Menghitung (%) rendemen dengan rumus berikut :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang didapat}}{\text{bobot serbuk simplisia yang diekstraksi}} \times 100\%$$

8. Uji bebas etanol daun gamal

Uji bebas etanol pada ekstrak daun gamal dilakukan melalui proses esterifikasi alkohol. Sampel ekstrak daun gamal dilarutkan menggunakan H₂SO₄ pekat pada tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan asam asetat dan dipanaskan hingga mendidih. Apabila tidak menimbulkan bau ester atau etil asetat maka dapat dikatakan bahwa ekstrak sudah tidak terdapat etanol (Vifta., 2020).

9. Identifikasi kandungan kimia serbuk daun gamal

Tujuan dilakukan identifikasi pada kandungan kimia yaitu agar mengenal kandungan senyawa dalam daun gamal. Persepsi senyawa flavonoid, alkaloid, triterpenoid dan fenol. Uji kualitatif diteliti di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi

Surakarta.

9.1. Identifikasi alkaloid. Menimbang 0,5 gram serbuk simplisia, menambahkan 1 mL Asam Klorida 2 N dan 9 mL aquades, lalu dipanaskan di watterbath selama 2 menit, dinginkan kemudian disortasi hingga mendapat filtrat, filtrat digunakan sebagai alkaloid. Mengambil filtrat sebanyak 0,5 l untuk 2 tabung reaksi. Tabung 1 dicampurkan 2 tetes pereaksi mayer lalu membentuk gumpalan berwarna putih atau kuning jika positif mengandung alkaloid. Tabung 2 dicampurkan 2 tetes pereaksi dragendorf lalu akan membentuk endapan berwarna coklat atau jingga kecoklatan jika positif mengandung alkaloid.

9.2. Identifikasi flavonoid. Menimbang sebanyak 10 gram serbuk simplisia, lalu melarutkan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit dan disortir dalam suasana panas, ke dalam 5 mL filtrat ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 1 mL HCL pekat dan 2 mL Amyl Alcohol, digojok hingga memisah. Jika menghasilkan warna merah, kuning, jingga, pada lapisan amil maka menunjukkan positif mengandung Flavonoid.

9.3. Identifikasi triterpenoid. Metode Lieberman – Burchard (LB), melibatkan melarutkan 2 mg ekstrak kering dalam anhidrida asetat, memanaskannya hingga mendidih, membiarkannya dingin, dan kemudian menambahkan 1 mL H₂SO₄ pekat ke dalam tabung reaksi, menghasilkan warna merah atau ungu yang menunjukkan adanya triterpenoid.

9.4. Identifikasi fenol. Filtrat A dibuat dengan memanaskan 1 g sampel dalam 100 mL air suling dan mendidihkannya selama 15 menit. Tabung reaksi yang berisis 5 mL filtrat A kemudian diisi dengan besi (III) klorida. Perkembangan warna hijau, ungu, biru atau hitam menunjukkan reaksi fenolik yang berhasil.

10. Pembuatan Sediaan Uji

10.1. Pembuatan larutan sukrosa. Sukrosa ditimbang sebanyak 4gram lalu dilarutkan menggunakan aquades 100 mL

10.2. CMC-Na 0,5%. CMC –Na 0,5% dipergunakan sebagai kontrol negatif yang dipergunakan sebagai pembanding untuk menunjukkan reaksi hasil negatif atau tidak adanya efek antidiabetes, selain itu CMC-Na juga berguna sebagai pelarut. Timbang serbuk CMC-Na 0,5% sebanyak 1 gram kemudian campurkan sedikit demi sedikit ke dalam mortir yang berisi 200 mL aquades panas, lalu digerus

hingga berbentuk larutan koloidal. Dihaluskan sampai terbentuk larutan koloid. Volumnya dipenuhi dengan aquades hingga 50 mL. .

10.3. Pembuatan larutan acarbose 50 mg/kgBB. Acarbose digunakan sebagai kontrol positif, ketentuan dosis acarbose pada mencit menggunakan dasar pada dosis terapi pada manusia. Dosis yang digunakan pada penelitian ini yaitu acarbose 0,08 g/kgBB mencit (Gunawan *et al.*,2008). Larutan stok acarbose dibuat 100 mL.

10.4. Pembuatan larutan sediaan uji daun gamal. Dosis awal diperoleh sebagai dosis orientasi, yang kemudian akan digunakan sebagai penentuan dosis ekstrak daun gamal dalam beberapa konsentrasi dengan variasi dosis yang berbeda, 0,35 g/kgBB mencit, 0,7 g/kgBB mencit, 1, 05g/kgBB mencit. Menunjukkan bahwa ekstrak daun gamal dengan dosis 0,7 g/kgBB mencit dapat menurunkan kadar hiperglikemik darah pada mencit jantan. Berdasarkan volume optimal yang dapat dicerna secara oral oleh hewan uji.

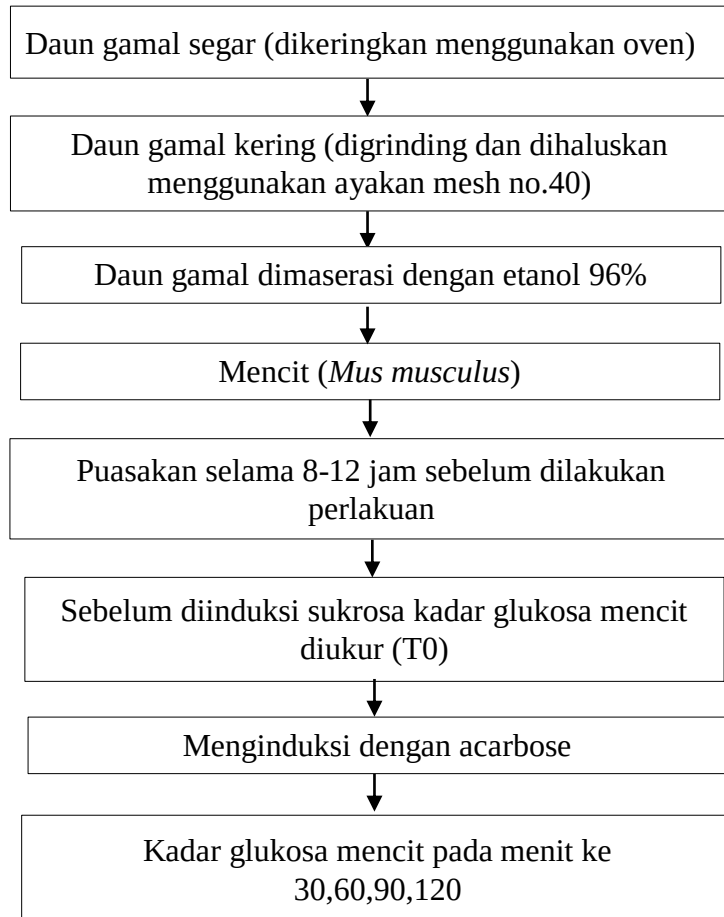
11. Pengelompokan dan perlakuan hewan uji

Mencit merupakan sebagian besar hewan uji yang digunakan. Mencit ditempatkan dalam lima kelompok secara acak, dipuasakan selama 18 jam, kemudian diberi cairan. Sebelum pemberian larutan, Hewan uji dihitung setelah periode aklimatasi 2 sampai 3 menit ke alat uji. Berikut ini adalah kelompok uji :

- | | |
|--------------|---|
| Kelompok I | : kelompok CMC |
| Kelompok II | : kelompok Acarbose |
| Kelompok III | : ekstrak daun gamal 0,35 g/kgBB mencit |
| Kelompok IV | : ekstrak daun gamal 0,7 g/kgBB mencit |
| Kelompok V | : ekstrak daun gamal 1,05 g/kgBB mencit |

Prosedur pertama kali dilakukan cek kadar glukosa dalam darah sebelum penginduksian (TO) setelah itu mencit diinduksi sukrosa diberi secara oral, setelah diinduksi. Kadar glukosa dalam darah dilihat pada menit ke 30, 60, 90, dan 120.

E. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur penelitian

F. Analisis Data

Hasil dari data penelitian yang dikumpulkan menjadi pertimbangan saat memilih analisis data untuk peneliti ini. Hasil uji data penelitian dengan distribusi normal dan Shapiro-Wilk merupakan uji yang digunakan, sedangkan untuk data yang dihasilkan tidak berdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$) menggunakan uji non parametrik *Uji Post Hoc Tukey HSD* digunakan untuk melihat apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara masing-masing kelompok hewan.