

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah daun namu-namu (*Cynometra cauliflora* L.) yang di ambil dari daerah kota Manado, Sulawesi Utara.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun namu-namu (*Cynometra cauliflora* L.) dalam keadaan segar dari yang muda sampai yang tua, tidak busuk, dan warna hijau.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama adalah ekstrak etanol daun namu-namu (*Cynometra cauliflora* L.). Variabel utama kedua adalah penurunan kadar glukosa darah pada mencit jantan yang diinduksi aloksan.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama. Berisi persepsi berdasarkan keseluruhan variabel yang di perlukan secara langsung. Variabel utama sudah di persepsi bisa di golongan kembali menjadi beragam variabel.

Variabel bebas. Variabel yang telah di rancang untuk dianalisis pengaruh terhadap variabel tergantung. Variabel bebas penelitian ini adalah variasi dosis dari ekstrak etanol daun namu-namu (*Cynometra cauliflora* L.).

Variabel tergantung. adalah pusat persoalan yang merupakan tolak ukur penelitian ini. Variabel tergantung penelitian ini adalah khasiat antihiperglikemik dari ekstrak etanol daun namu-namu (*Cynometra cauliflora* L.) dengan metode uji aloksan.

Variable terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung. Variable terkontrol yang dipakai pada penelitian ini yaitu jenis kelamin, umur, berat badan, galur hewan uji, kondisi fisik, pakan yang diberikan, agen penginduksi, dan waktu panen sampel.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, sampel daun namu-namu (*Cynometra cauliflora* L.) adalah daun namu-namu yang di petik dari pohonnya dalam keadaan segar dari yang muda sampai yang tua, tidak busuk, di ambil dari daerah Manado, Sulawesi Utara.

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

Ketiga, ekstrak daun namu-namu adalah daun namu-namu yang sudah diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70%.

Keempat, dosis ekstrak daun namu-namu adalah kontrasi atau kadar ekstrak daun namu-namu yang dibuat dalam berbagai variasi dosis kemudian diberikan pada mencit secara oral.

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

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

Ketujuh, induksi aloksan adalah aloksan yang di injeksikan secara intraperitoneal pada mencit, dan dilakukan pengukuran kadar glukosa darah dengan menggunakan metode glukometer.

Kedelapan, hiperglikemik adalah suatu kondisi dengan kadar glukosa darah yang tinggi > 200 mg/dL.

Kesembilan, dosis efektif adalah dosis obat uji yang memberikan efek penurunan kadar gula darah yang setara dengan pemberian glibenklamid.

Kesepuluh, target terapi adalah penurunan kadar glukosa darah hingga mencapai kadar normal (62,8-176 mg/dL) tetapi tidak sampai dibawah batas kadar normal (Raymond *et al.*, 2020).

C. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya adalah sarung tangan, erlenmeyer, timbangan analitik, pisau, blender, ayakan no 40, bejana maserasi, penangas air, batang pengaduk, kertas saring, kertas timbang, kain flanel, kain hitam, corong pisah, gelas Beker, alat *vacum rotary evaporator*, alat waterbath, kandang mencit, botol kaca, mortar dan alu, timbangan elektronik, timbangan analitik, spuit injeksi, sonde oral, *glukometer Easy Touch*, glucose strip test, jarum suntik, gelas ukur, *stopwatch*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet.

2. Bahan

Bahan yang di gunakan pada penelitian ini di antaranya yaitu daun namu-namu, etanol 70%, asam sulfat (H_2SO_4) 2 N, pereaksi Dragendorff, pereaksi Bouchardat, serbuk magnesium (Mg), asam

klorida pekat (HCL), amil alkohol ($C_5H_{12}O$), besi (III) klorida ($FeCl_3$), aquadest, n-heksana, aloksan, mencit putih jantan, kandang, pakan dan minum mencit, NaCl 0,9%, Na CMC 0,5% (kontrol negatif), dan glibenklamid (kontrol positif).

3. Hewan uji

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

D. Jalan Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tujuan dari determinan tanaman namu-namu ini yaitu untuk menentukan ketepatan sampel yang berhubungan dengan ciri-ciri morfologi secara makroskopis tanaman pada pustaka. Determinasi tumbuhan namu-namu dilaksanakan Universitas Setia Budi.

2. Pengumpulan dan penyiapan bahan

Daun namu-namu (*Cynometra cauliflora* L.) di petik dalam keadaan segar di pilih yang telah membuka sempurna dan terletak di bagian cabang atau batang yang menerima sinar matahari sempurna. Daun di ambil pada saat terjadi kegiatan asimilasi yang sempurna, maksimal antara pukul 9-10 pagi (Depkes RI, 1985). Sampel berasal dari daerah Manado, Sulawesi Utara.

3. Pembuatan serbuk daun namu-namu

Daun namu-namu yang sudah terkumpul, disortasi basah untuk menghilangkan kotoran yang menempel ketika proses pemetikan. Daun kemudian dicuci bersih menggunakan air mengalir, lalu dirajang kemudian di lakukan pengeringan dengan cara dijemur di bawah sinar matahari dan ditutup menggunakan kain hitam. Daun namu-namu setelah kering di hancurkan menggunakan alat *toothed disc mills* dan di haluskan dengan *grinder*, kemudian serbuk simplisia daun namu-namu diayak menggunakan ayakan *mesh* nomor 40 untuk memperoleh serbuk dengan ukuran yang sama guna dilakukan maserasi.

4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun namu-namu

Susut pengeringan yaitu penurunan bobot simplisia setelah dilakukan pengeringan menggunakan cara yang sudah ditentukan. Tujuan di lakukan susut pengeringan yaitu untuk mengetahui jumlah senyawa yang hilang akibat proses pengeringan. Tahap awal sebelum melakukan penentuan susut pengeringan, serbuk ditimbang secara

seksama sebanyak 2 g. Serbuk dimasukan ke dalam *moisture balance* dengan temperatur 105°C dan alat di jalankan hingga di peroleh bobot stabil. Syarat dari susut pengeringan yaitu tidak boleh melebihi 10% (Kemenkes RI, 2013).

5. Penetapan kadar air pada serbuk daun namu-namu

Penetapan kadar air di lakukan menggunakan alat *Sterling Bidwell* dan pelarut yang digunakan yaitu toluen jenuh air. Kadar air pada serbuk simplisia yang dipersyaratkan yaitu <10%. Cara yang dilakukan dalam penetapan kadar air yaitu dengan menyiapkan toluen jenuh air terlebih dahulu. Pembuatan toluen jenuh air dilakukan dengan cara menggojog sejumlah toluen sebanyak 200 mL dalam 10 mL *aquadest* lalu di biarkan memisah dan lapisan airnya di buang. Serbuk daun namu-namu ditimbang sebanyak 20 g kemudian di masukkan ke dalam labu alas bulat lalu ditambahkan dengan 200 mL toluen jenuh air kemudian dipasang rangkaian alatnya. Tahap selanjutnya di panaskan dengan api kecil selama 30 menit. Pemanasan dihentikan apabila dalam penampung sudah tidak ada lagi air yang menetes, setelah itu kadar air diukur kemudian persen kadar airnya dihitung dengan rumus sebagai berikut (Depkes, 2017).

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{Volume yang terbaca}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

6. Penetapan kadar air pada ekstrak etanol daun namu-namu

Penetapan kadar air ekstrak bersumber dari Farmakope Herbal Indonesia 2017. Pertama yang harus dilakukan yaitu menara botol kurs kemudian timbang ekstrak 10 g, kemudian masukan ke dalam oven pada suhu 105°C dengan durasi 5 jam dan timbang. Masukan kembali ke dalam oven dengan jeda waktu 1 jam hingga terdapat perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% atau 0,005 g (Depkes, 2017).

7. Pembuatan ekstrak etanol daun namu-namu

Pembuatan ekstrak yaitu serbuk kering di rendam dengan pelarut yang cocok menggunakan cara maserasi. Satu bagian serbuk kering dimasukan ke dalam maserator, kemudian tambahkan 10 bagian pelarut. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali di aduk, kemudian di amkan selama 18 jam (Depkes, 2017). Serbuk daun namu-namu di timbang sebanyak 1200 g, serbuk tersebut di masukan ke dalam botol coklat maserasi lalu di tambahkan dengan etanol 70% sebanyak 10 L. Rendam selama 6 jam sambil sekali-sekali di gojok, kemudian di diamkan sepanjang 18 jam. Proses penyarian diulangi menggunakan

jenis pelarut yang pertama sejumlah 5 L. Maserasi yang di saring terlebih dahulu untuk memisahkan fitrat. Maserasi yang telah di peroleh di pekatkan menggunakan *rotary evaporato* pada suhu 70°C hingga menghasilkan ekstrak kental. Rendemen dihitung dengan rumus berikut.

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

8. Uji bebas etanol ekstrak daun namu-namu

Uji bebas etanol pada ekstrak daun namu-namu di lakukan melalui proses esterifikasi alkohol. Sampel ekstrak daun namu-namu di larutkan menggunakan H₂ SO₄ pekat pada tabung reaksi, kemudian di tambahkan dengan asam asetat dan dipanaskan hingga mendidih. Ekstrak yang tidak menimbulkan bau ester atau etil asetat maka dapat dikatakan bahwa ekstrak sudah tidak terdapat etanol (Vifta *et al.*, 2020).

9. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun namu-namu.

Tujuan dilakukan identifikasi pada kandungan kimia yaitu agar mengenal kandungan senyawa di dalam daun namu-namu. Persepsi senyawa flavonoid, saponin, tanin, alkaloid, dan steroid (Sumerlin *et al.*, 2018). Uji kualitatif diteliti di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

9.1 Identifikasi alkaloid. Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 g, ditambah 10 mL kloroform-amonia dan diaduk dan disaring. Filtrat ditambahkan 3-5 tetes H₂SO₄ 2 N, kemudian di kocok hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan asam (terdapat pada bagian atas) di pipet dalam dua tabung reaksi lain, lalu ditambahkan beberapa tetes pereaksi Dragendorff pada tabung A dan pereaksi Bourchardat pada tabung B. Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan jingga sampai merah coklat.

9.2 Identifikasi flavonoid. Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 g, ditambah dengan 10 mL air panas, dan didihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat sebanyak 5 mL ditambahkan HCl pekat, 10 tetes C₅H₁₂O (amil alkohol), dan 0,05 mg serbuk magnesium (Mg), kemudian dikocok kuat-kuat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga.

9.3 Identifikasi tanin. Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 g, ditambah 10 tetes FeCl₃ 1%. Sampel positif mengandung tanin apabila menghasilkan warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam pekat.

9.4 Identifikasi saponin. Ekstrak sebanyak 0,5 g ekstrak, di tambah air panas sebanyak 5 mL dalam tabung reaksi dan di kocok. Sampel dinyatakan positif mengandung saponin apabila terbentuk busa

dengan ketinggian 1-3 cm yang bertahan selama 15 menit. Tambahkan 1 tetes HCl 2 N, busa tidak hilang (Depkes RI, 2013).

9.5 Identifikasi steroid/triterpenoid. Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 g di tambah dengan 1 mL n-heksana dan didiamkan selama 1-2 jam. Sampel disaring dan tambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 2 tetes HCl pekat. Hasil Steroid memberikan warna biru atau hijau, sedangkan untuk triterpenoid memberikan warna merah atau ungu (Taena, 2022).

10. Perhitungan dosis

10.1 Dosis aloksan. Dosis aloksan yang di berikan secara intraperitoneal adalah 150 mg/kgBB mencit (Hidayaturrahmah *et al.*, 2017).

10.2 Dosis glibenklamid. Dosis glibenklamid pada manusia dewasa adalah 5 mg, maka konversi dosis glibenklamid untuk mencit 20 g adalah $5 \text{ mg} \times 0.0026 = 0.013 \text{ mg}$ sehingga dalam satuan kgBB mencit adalah $\frac{1000 \text{ g}}{20 \text{ g}} \times 0.013 \text{ mg} = 0,65 \text{ mg /kgBB}$ (Widiana dan Marianti, 2022).

10.3 Dosis ekstrak etanol daun namu-namu. Penelitian yang sudah dilakukan oleh Seyedan *et al.* (2019) menunjukan bahwa ekstrak daun namu-namu dengan dosis 400 mg/kgBB memberikan efek penurunan hiperglikemik pada mencit.

11. Pembuatan larutan uji

11.1 Larutan aloksan 2%. Aloksan ditimbang 0,3 g lalu dilarutkan dengan menggunakan NaCl hingga 50 mL.

11.2 CMC Na 0,5 %. Pembuatan larutan CMC konsentrasi 0,5 % yaitu 2,5 g CMC di masukan ke dalam mortir hangat kemudian ditambahkan aquadest hangat sedikit demi sedikit sambil diaduk *ad homogen*, kemudian tambah aquadest hingga volume 500 mL.

11.3 Larutan glibenklamid 0,005%. Larutan stok glibenklamid sebagai kontrol positif, cara membuatnya 5 mg serbuk glibenklamid dilarutkan dalam 50 mL CMC Na sampai tanda batas 50 mL.

11.4 Sediaan uji ekstrak etanol daun namu-namu 2%. Sediaan uji ekstrak daun namu-namu di buat dengan cara, menimbang 3360 mg ekstrak daun namu-namu menggunakan cawan porselin yang sudah ditara. Ekstrak dimasukan ke dalam mortir hangat kemudian ditambahkan CMC Na hangat sedikit demi sedikit sambil diaduk *ad*

homogen. Tambahkan ekstrak daun namu-namu aduk *ad* homogen, kemudian tambahkan CMC Na hingga 50 mL diaduk *ad* homogen.

12. Pengelompokan dan perlakuan hewan uji

Hewan uji di aklimatisasi selama 7 hari dengan kondisi di laboratorium yang standar, suhu standar kandang pada suhu 22 ± 2 °C dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap. Hewan uji dipuasakan terlebih dahulu selama 10-12 jam (Gunawan *et al.*, 2018). Hewan uji yang dipakai sebanyak 25 mencit dibagi menjadi 5 kelompok dan dipuasakan selama 10-12 jam dan diberikan minum. Kelompok uji tersebut adalah sebagai berikut :

Kelompok I : kelompok diabetes (diberikan CMC Na 0,5 %)

Kelompok II : kelompok obat (diberikan glibenklamid 0,65 mg/kgBB)

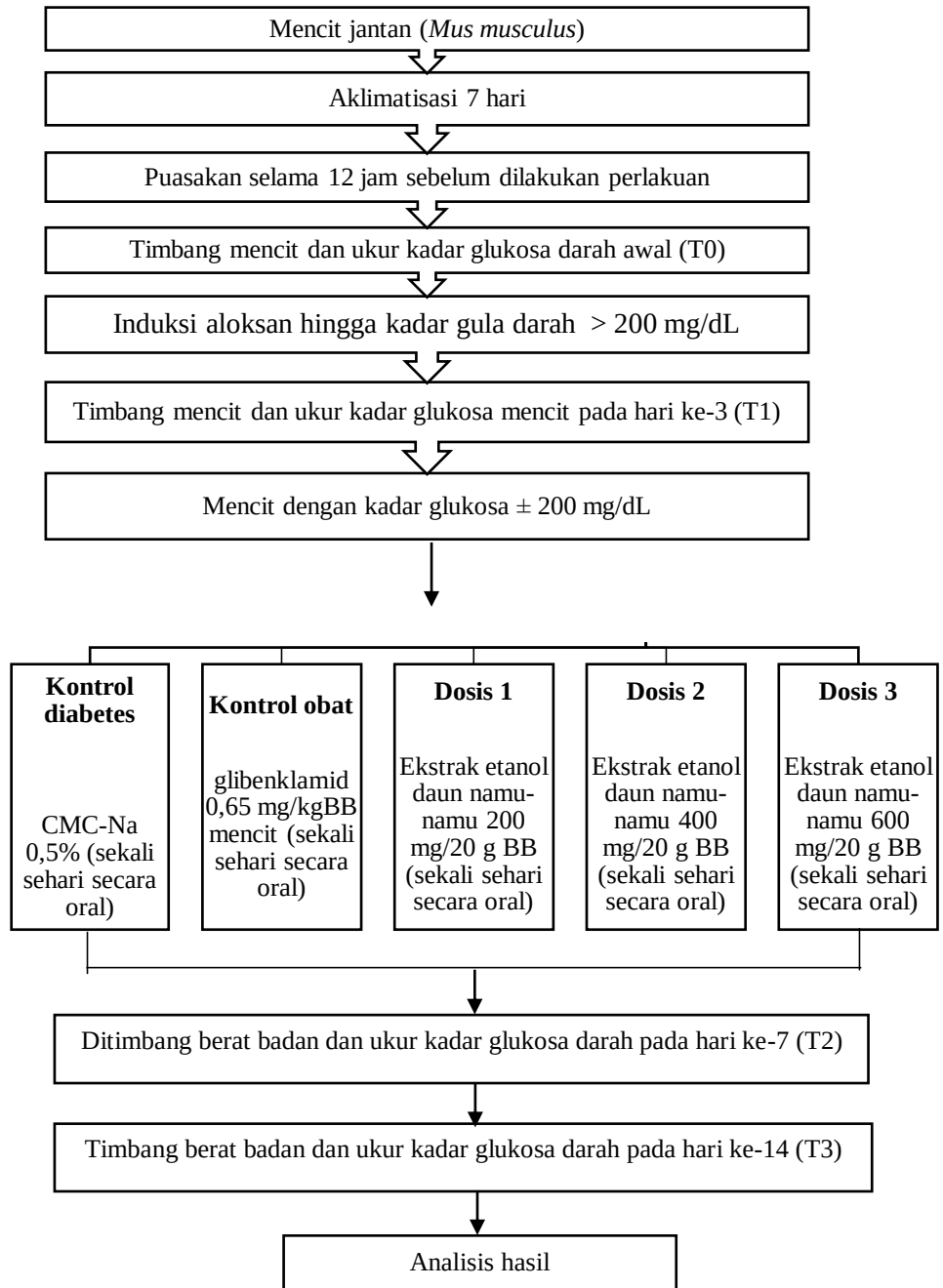
Kelompok III : Dosis 1 ekstrak etanol daun namu-namu 200 mg/kg BB

Kelompok IV : Dosis 2 ekstrak etanol daun namu-namu 400 mg/kg BB

Kelompok V : Dosis 3 ekstrak etanol daun namu-namu 600 mg/kg BB

Prosedur pertama yaitu dilakukan cek kadar gula darah mencit sebelum penginduksian aloksan (T0), setelah itu mencit diinduksi aloksan diberi secara intraperitoneal. Hari ke-3 setelah penginduksian aloksan kadar gula darah dilihat (T1), setelah diberikan sediaan uji di cek kadar gula darah pada hari ke-7 (T2), dan hari ke-14 (T3).

13. Skema penelitian perlakuan hewan uji



Gambar 4. Skema penelitian perlakuan hewan uji.

14. Analisis data

Analisis hasil yang di gunakan pada penelitian ini adalah di pilih berdasarkan data hasil penelitian yang diperoleh. Uji yang di gunakan untuk menguji apakah data hasil penelitian terdistribusi normal atau tidak yaitu dengan uji distribusi normal dan *Shapiro wilk*. Data yang didapat tidak terdistribusi normal dan tidak homogen ($p < 0,05$), maka di lanjutkan uji non paramertik dengan *Kruskal wallis* dan *Mann Whitney*. Data yang didapat terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$), maka di lanjutkan uji parametrik yaitu uji ANOVA. Uji di lanjutkan dengan tes *Post Hoc* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara masing-masing kelompok hewan perlakuan.