

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman bajakah tampala (*Spatholobus littoralis* Hassk) yang didapatkan dari Puruk Cahu, Kabupaten Murung Raya, Provinsi Kalimantan Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang bajakah tampala (*Spatholobus littoralis* Hassk) yang didapatkan di Pangkalan Bun, Kalimantan Tengah. Tanaman bajakah yang digunakan adalah akar bajakah jenis bajakah tampala yang berwarna merah, batang yang digunakan tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, dan tidak rusak.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah ekstrak dan fraksi n-heksan, etil asetat, dan air dari batang bajakah tampala.

Variabel utama yang kedua adalah aktivitas antidiabetes batang bajakah berupa penurunan kadar glukosa darah pada mencit jantan yang diinduksi aloksan.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama terdiri dari 3 jenis :

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas merupakan variabel yang akan diuji pengaruhnya terhadap variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi dari ekstrak etanol, fraksi n-heksan, etil asetat, dan air batang bajakah.

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung adalah variabel yang mudah terpengaruh variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antidiabetes ekstrak batang bajakah yang diinduksi aloksan. Daya antidiabetes fraksi n-heksan, etil asetat, dan air batang bajakah

2.3 Variabel terkendali. Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung. Variabel terkendali memerlukan pembuktian agar hasil yang diperoleh tidak berpisah dan dapat diulang oleh peneliti yang lain. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah jenis hewan uji, berat hewan uji, kondisi kandang, minum, dan makan hewan uji.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, batang bajakah (*Spatholobus littoralis* Hassk) adalah tanaman yang berada di daerah Pangkalan Bun, Kalimantan Tengah.

Kedua, ekstrak etanol batang bajakah (*Spatholobus littoralis* Hassk) adalah hasil ekstraksi dari simplisia tanaman bajakah (*Spatholobus littoralis* Hassk) yang dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% kemudian dilanjutkan metode remaserasi dan dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Ketiga, etanol 96% adalah pelarut yang mampu melarutkan senyawa polar ataupun non polar dan lebih efektif.

Keempat, maserasi adalah proses ekstraksi dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut pada suhu kamar. Remaserasi adalah metode ekstraksi yang diulang dengan penambahan pelarut setelah yang disaring maserat pertama dan seterusnya.

Kelima, fraksinasi adalah teknik pemisahan serta pengelompokkan kandungan kimia dari ekstrak berdasarkan dengan tingkat kepolarannya (polar, semi polar, dan nonpolar). Fraksi merupakan hasil pemisahan dalam jumlah yang lebih kecil dengan kandungan senyawa kimia.

Keenam, fraksi n-heksan adalah bagian yang diperoleh dari hasil fraksinasi dengan pelarut n-heksan dari ekstrak batang bajakah.

Ketujuh, fraksi etil asetat adalah bagian yang diperoleh dari hasil fraksinasi dengan pelarut etil asetat dari ekstrak batang bajakah.

Kedelapan, fraksi air adalah bagian yang diperoleh dari hasil fraksinasi dengan pelarut n-air dari ekstrak batang bajakah.

Kesembilan, hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan putih galur *Swiss Webster* sebanyak 30 ekor yang berumur 2-3 bulan dengan berat 20-30 gram

Kesepuluh, aktivitas antidiabetes adalah penurunan kadar gula pada mencit putih jantan yang diinduksi aloksan.

C. Alat dan bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sabit, kapak, pisau, sarung tangan, kran air, selang, wadah, alat timbang, khatam kayu, oven, mesin penggiling, ayakan no.40, bejana maserasi, kain flanel, corong, kertas saring, *moisture balance*, alat destilasi, *rotary evaporator*, corong pisah, destilasi toluen, botol *krush*, tabung reaksi, rak tabung

rekasi, mortir, stamfer, *Beaker glass*, *rotary evaporator*, sonde, spuit injeksi, alat glucometer.

2. Bahan

Tanaman bajakah yang diperoleh dari Pangkalan Bun, etanol 96%, glibenklamid, aloksan, CMC Na 0,5%, hewan uji mencit, n-heksan, etil asetat, air, MgSO₄, HCl pekat, HCl 2N, FeCl₃.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman bajakah

Determinasi tanaman dilakukan untuk memastikan kebenaran identitas, morfologi tanaman dan karakteristik makroskopik dari tanaman bajakah (*Spatholobus littoralis* Hassk) determinasi dilakukan untuk menghindari kesalahan pada saat pengumpulan bahan penelitian. Determinasi dilakukan di Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Obat Dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu.

2. Pengambilan bahan

Pengambilan bahan dilakukan di Kabupaten Murung Raya, Kalimantan Tengah. Bagian yang diambil dalam keadaan segar dan tidak layu. Pengambilan batang sebaiknya diambil pada saat awal musim kemarau pada siang atau sore hari karena dengan bantuan sinar matahari pada pagi hari dapat menghasilkan fotosintesis hasil yang maksimal. Sortasi basah pada tanaman seperti dibuang bagian tanaman yang tidak digunakan, dipisahkan dari kerikil, bahan yang rusak atau busuk, kemudian dicuci pada air mengalir agar supaya menghilangkan kotoran yang menempel. Bagian batang bajakah yang telah dibersihkan dilakukan proses pengeringan dan dilakukan sortasi kering.

3. Pembuatan serbuk

Pembuatan serbuk dilakukan dengan cara memotong batang bajakah secara tipis menggunakan khatam dan dikeringkan, setelah kering kemudian dihaluskan menggunakan mesin penggiling. Serbuk diayak menggunakan ayakan no.40 hingga diperoleh kehalusan serbuk yang seragam.

4. Penetapan susut pengeringan serbuk

Penetapan susut pengeringan dilakukan setelah melakukan pengeringan sampel. Susut pengeringan dilakukan menggunakan alat *moisture balance* dengan bentuk sampel adalah serbuk dengan suhu pengeringan 105°C. Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan memasukan 2 gram serbuk sampel di atas neraca timbangan, tutup alat

dan tunggu sampai alat berbunyi. Syarat susut pengeringan serbuk yang baik adalah tidak lebih dari 10% (Kemenkes RI, 2017).

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

5. Penetapan kadar air

Tujuan dari penetapan kadar air adalah memberikan minimal batasan dan rentang terkait kandungan air yang terdapat pada simplisia. Penetapan kadar air menggunakan destilasi toluen. Pertama timbang sampel sebanyak 20 gram kemudian dimasukkan ke dalam labu kering. Tambahkan 200 ml toluene dan rangkain alat destilasi. Pemanasan dihentikan apabila sudah tidak ada air yang menetes, air yang tertampung diukur dengan volum dan dilihat skala yang terdapat pada tabung *Sterling Bidwell* (FHI 2017). Persen kadar air :

$$= \frac{\text{volume air yang terdestilasi}}{\text{Berat bahan awal}} \times 100\%$$

6. Pembuatan ekstrak etanol akar bajakah

Pembuatan ekstrak batang bajakah dilakukan menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut 96% dengan perbandingan 1:10. Perendaman dilakukan selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk dan kemudian didiamkan selama 18 jam. Saring hasil maserat yang didapat menggunakan kain flanel dan kertas saring. Ulang proses penyarian dengan volume pelarut setengah dari penyarian pertama. Hasil maserat yang didapat dikumpulkan lalu diuapkan menggunakan alat *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak yang cukup kental dan diuapkan menggunakan oven dengan suhu 40-45°C. Rendemen yang didapatkan dihitung dengan menggunakan % bobot (b/b) antara bobot rendemen dan bobot serbuk simplisia (Kemenkes RI, 2017).

7. Uji kadar air ekstrak

Penetapan kadar air dilakukan dengan menimbang 10 gr ekstrak selanjutnya dimasukkan ke dalam botol krush yang telah ditara sebelumnya. Sampel dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 105°C, saat di dalam oven tutup botol kursh dibuka dan ditunggu selama 5 jam. Dinginkan *kursh* di dalam desikator dengan keadaan tertutup dan setelah itu ditimbang. Lakukan secara berulang dengan jeda waktu 1 jam hingga diperoleh perbedaan dua penimbangan berturut-turut hingga diperoleh bobot konstan tidak lebih dari 0,25% (Kemenkes RI, 2017).

8. Pembuatan fraksinasi ekstrak batang bajakah

Pembuatan fraksinasi dengan melakukan penimbangan ekstrak batang bajakah sebanyak 50 gram dan dimasukkan ke dalam corong pisah dan diberi pelarut aquades 75 ml. Ekstrak difraksinasi dengan pelarut n-heksana dan etil asetat sebanyak 75 ml dan masing masing pelarut dilakukan fraksinasi sebanyak 3 kali. Fraksinasi dilakukan menggunakan alat corong pisah untuk membentuk 2 lapisan cair yang terpisah, lapisan atas merupakan lapisan pelarut sedangkan lapisan bawah adalah lapisan air. Lapisan yang diambil adalah lapisan atas yang kemudian diuapkan dengan *water bath*. Fraksi air adalah residu yang diperoleh dari proses fraksinasi etil asetat. Fraksi air yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *water bath*.

9. Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak

9.1 Identifikasi flavonoid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dan 2 ml etanol 70% dimasukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan 0,5 gram serbuk MgSO_4 , dan 3 tetes HCl pekat. Kocok perlahan, tambahkan amil alkohol 1 ml, kemudian kocok kuat-kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna oranye-merah (Anggreany *et al.*, 2020).

9.2 Identifikasi saponin. Sepuluh ml air panas dinginkan di dalam tabung reaksi dan tambahkan 0,5 gram ekstrak etanol batang bajakah, kemudian dikocok dengan kuat kurang lebih 10 detik. Hasil positif apabila ditandai dengan terbentuknya buih yang stabil kurang lebih 10 menit dengan tinggi 1-10cm. Apabila ditambahkan HCl buih yang terbentuk tidak hilang.

9.3 Identifikasi tanin. Masukkan 0,5 gram ekstrak ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 10 ml air panas. Tetesi larutan dengan besi (III) atau klorida (FeCl_3) sebanyak 3-5 tetes. Hasil positif apabila terbentuk warna coklat kehijauan atau biru kehitaman.

9.4 Identifikasi fenolik. Masukkan 0,5 gram ekstrak kedalam tabung, dan tambahkan reagen FeCl_3 5%, apabila menunjukkan hasil positif akan terbentuk warna biru hingga kehitaman (Suryani *et al.*, 2017).

9.5 Identifikasi alkaloid. Dua mg sampel dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 0,5 mL HCl 2% dan larutan dibagi menjadi 3 tabung. Tabung 1 ditambahkan pereaksi Dagendorff, hasil positif terbentuk endapan kuning kecoklatan. Tabung II ditambah pereaksi Mayer, hasil positif menunjukkan endapan berwarna putih kekuningan. Tabung III ditambah pereaksi Wagner, hasil positif menunjukkan warna coklat (Marsuki *et al.*, 2024).

10. Penentuan dosis

10.1 Dosis glibenklamid. Dosis glibenklamid berdasarkan penggunaan pada manusia adalah 5mg/70 kg BB manusia. Dosis dikonversi ke mencit dengan berat mencit 20 gram. Faktor konversinya 0,0026. Jadi, apabila diubah menjadi 20.

10.2 Dosis aloksan. Dosis aloksan yang digunakan untuk membuat mencit diabetes adalah 200 mg/kgBB mencit (Widyasti *et al.*, 2019). Dosis aloksan yang digunakan untuk mencit 20 gram adalah $20\text{g}/1000\text{g} \times 200\text{mg} = 4\text{mg}/20\text{g}$ BB mencit

10.3 Dosis ekstrak batang bajakah. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Siska (2021) bahwa ekstrak etanol batang bajakah tampala memiliki aktivitas antidiabetes dengan dosis terbaik yaitu 400 mg/kgBB.

10.4 Dosis fraksi. Dosis fraksi etil asetat, fraksi n-heksan, dan fraksi air yang digunakan dalam penelitian ini adalah 400 mg/Kg BB mncit.

11. Pembuatan sediaan uji

11.1 Larutan CMC-Na 0,5%. Menimbang 500 mg CMC Na 0,5% dan masukkan ke dalam mortir hangat dengan ditambahkan aquades sedikit demi sedikit. Aduk hingga CMC Na mengembang kemudian masukkan ke dalam labu takar 100 ml, tambahkan aquades hingga tanda batas.

11.2 Aloksan. Larutan aloksan 1% adalah larutan penginduksi mencit agar diabetes. Larutan aloksan dibuat dengan melarutkan 1 g serbuk aloksan lalu dilarutkan dengan NaCl 0,9 % hingga batas 100 ml.

11.3 Glibenklamid 0,005%. Suspensi glibenklamide konsentrasi 0,005% dibuat dengan melarutkan tablet glibenklamid di dalam mortir dan ditambahkan CMC Na 0,5% hingga 100 ml.

11.4 Fraksi batang bajakah Larutan fraksi N-heksan dan etil asetat sebesar 14% dengan menimbang 7 g dimasukkan ke dalam mortir ditambahkan 50 ml CMC Na 0,5%. Fraksi air dibuat dengan konsentrasi 20% dengan menimbang 10 g fraksi air dilarutkan dalam 50 ml CMC Na.

11.5 Ekstrak batang bajakah 2%. Larutan ekstrak batang bajakah konsentrasi 2% dengan menimbang 2 g ekstrak lalu masukkan ke dalam mortir dan tambah 100 ml CMC Na 0,5%.

12. Perlakuan hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian adalah mencit jantan putih galur *Swiss webster* sebanyak 30 ekor yang berumur 2-3 bulan dengan berat 20-30 gram. Mencit diadaptasikan selama satu minggu dengan tujuan agar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan. Hewan uji yang digunakan dibagi menjadi 6 kelompok yang masing masing kelompok terdiri atas 5 ekor mencit. Pemberian pakan dengan menggunakan pelet dan air secukupnya. Hewan uji sebelum digunakan dipuasakan selama 16 jam dan dilakukan penimbangan berat badan pada masing-masing kelompok. Penimbangan dilakukan untuk mengetahui penambahan berat badan pada hewan uji selama perlakuan. Hari pertama dilakukan pengukuran kadar gula awal (T0) sebelum diberikan perlakuan, dihari yang sama diberikan larutan aloksan monohidrat sebanyak 4 mg/20 g BB diberikan secara intra peritoneal. Pengukuran kadar gula darah dilakukan setelah 5 hari perlakuan(T1). Mencit yang digunakan dalam penelitian adalah mencit dengan kadar gula darah >200 mg/dL. Larutan uji diberikan secara oral setiap hari pada pagi hari. Pengambilan darah menggunakan alat glukometer pada bagian ekor mencit.

- Kelompok I : Kelompok normal tanpa perlakuan
- Kelompok II : Kelompok kontrol negatif. Mencit diberi CMC Na 0,5%
- Kelompok III : Kelompok kontrol positif. Mencit diberi glibenklamid 0,013 mg/kg BB mencit
- Kelompok IV : Kelompok ekstrak etanol batang bajakah dengan dosis 400 mg/kg BB
- Kelompok V : Mencit diberi fraksi n-heksan ekstrak etanol batang bajakah dengan dosis 400 mg/kg BB
- Kelompok VI : Mencit diberi fraksi etil asetat ekstrak etanol batang bajakah dengan dosis 400 m g/kg BB
- Kelompok VII : Mencit diberi fraksi air ekstrak etanol batang bajakah dengan dosis 400 mg/kg BB

Prosedur pertama yang dilakukan yaitu cek kadar gula darah mencit sebelum diinduksi aloksan (T0), kemudian mencit diinduksi aloksan secara intra peritoneal. Hari ke-5 setelah penginduksian aloksan cek kembali kadar gula darah (T1), dihari yang sama diberikan sediaan uji dan cek kadar gula darah dilihat pada hari ke-7 (T2), dan hari ke-14 (T3).

13. Pengukuran kadar gula

Kadar gula darah hewan uji pada penelitian ini dilakukan 3 kali pengukuran kadar gula darah, yang meliputi:

T0 : Mencit sebelum diinduksi aloksan.

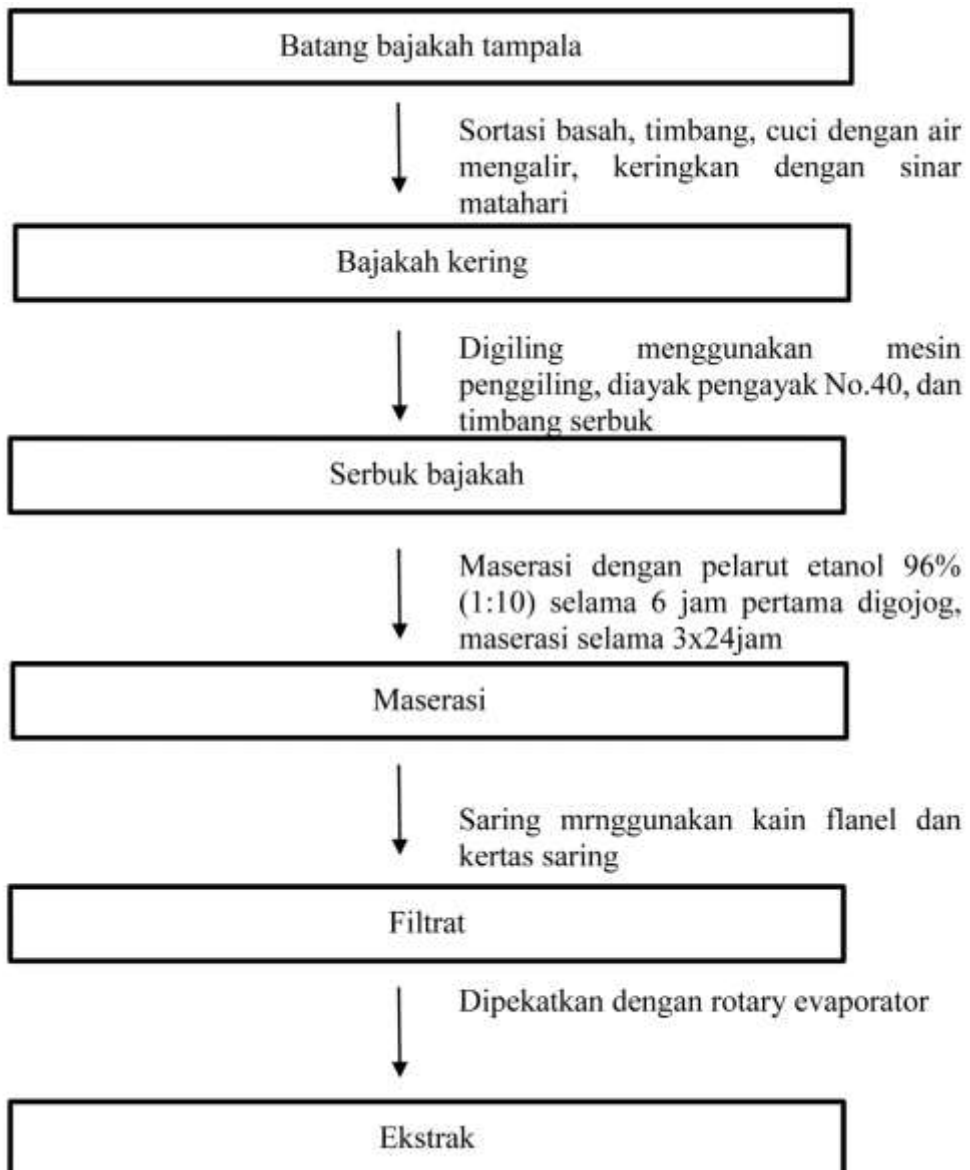
T1 : Setelah 5 hari diinduksi aloksan, mencit yang mengalami diabetes dengan kadar gula darah >200 mg/dL.

T2 : Hari ke-7 (setelah 7 hari diinduksi aloksan dan pemberian fraksi ekstrak akar bajakah).

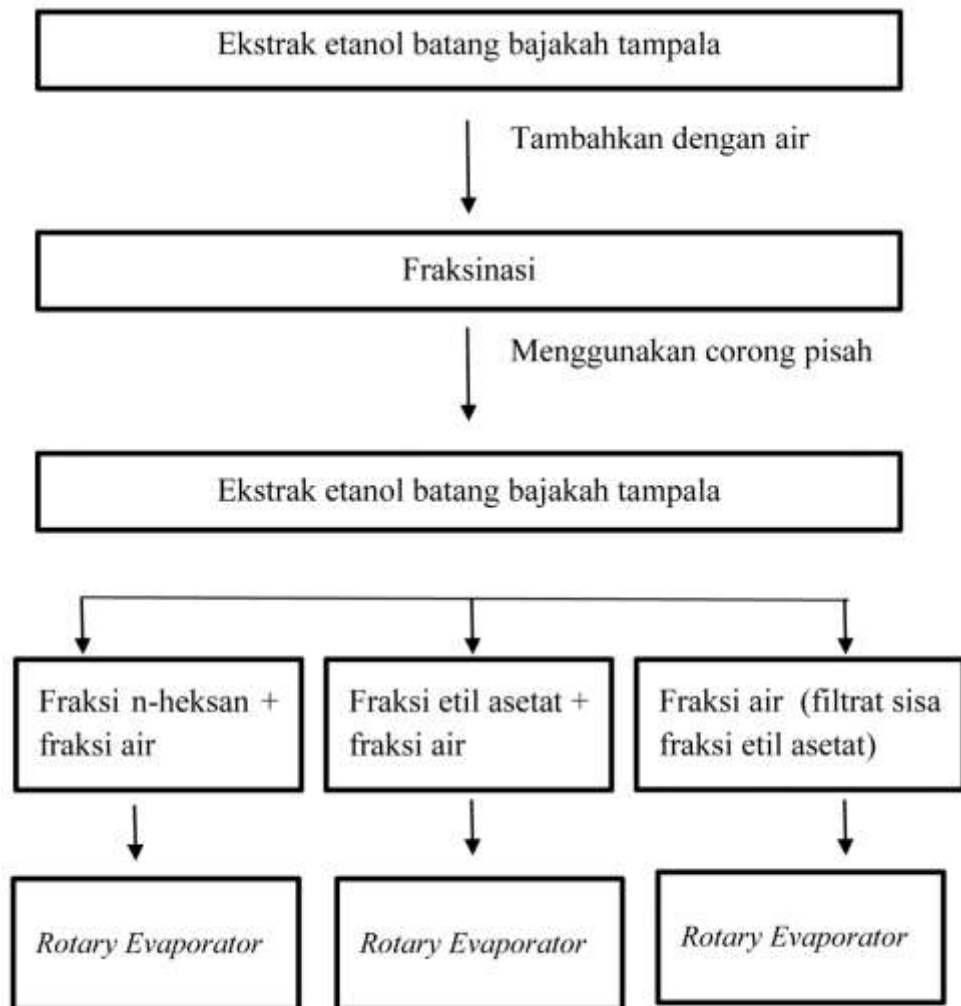
T3 : Hari ke-14 (setelah diinduksi fraksi ekstrak bajakah).

Pengukuran menggunakan alat glukometer, sampel darah ditetaskan pada strip zona sampel hingga berbunyi dan menunjukkan hasil yang diperoleh pada layar. Hasil yang dibaca adalah dalam mg/dL.

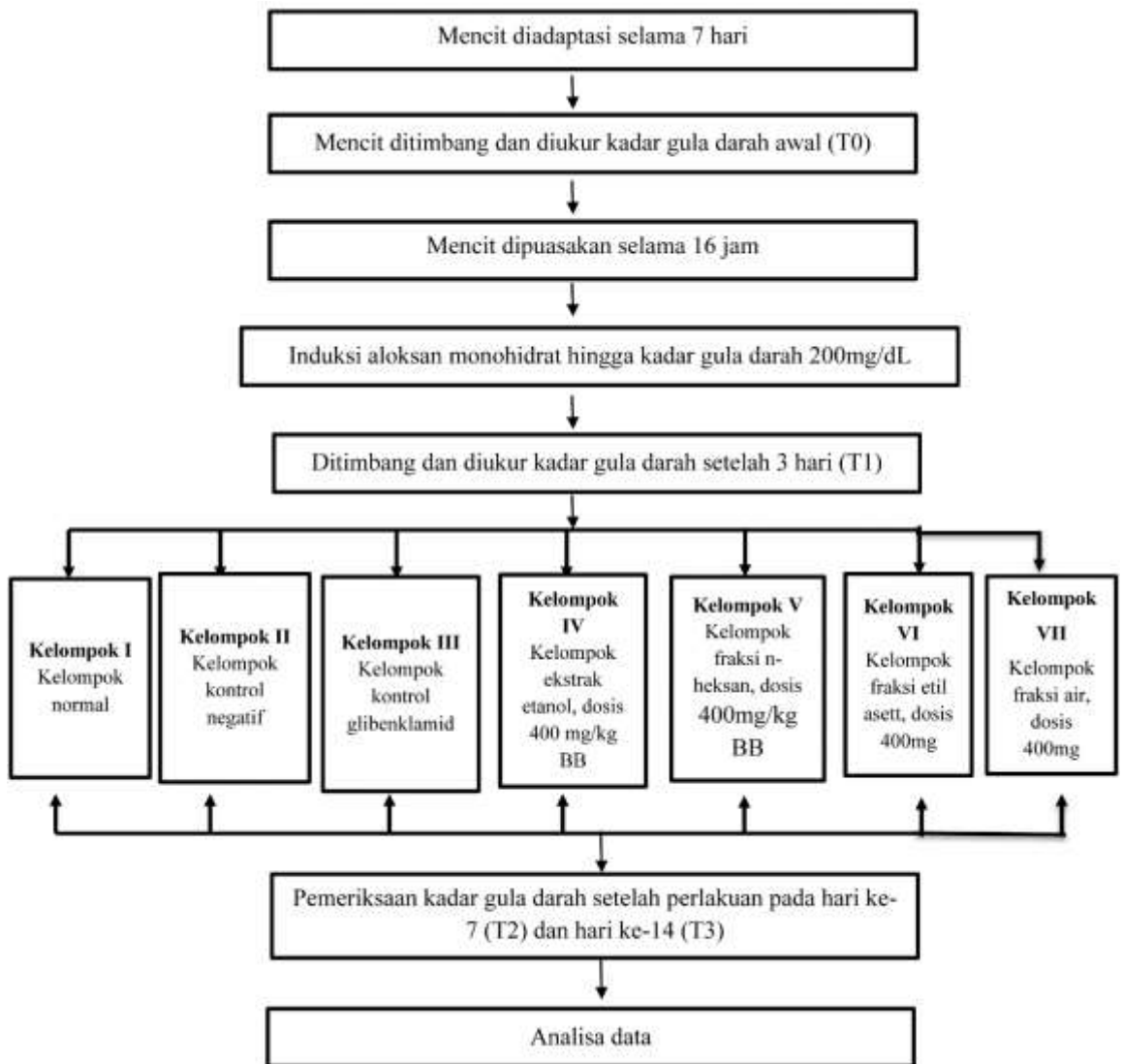
E. Skema Penelitian



Gambar 4. Skema maserasi



Gambar 5. Skema fraksinasi



Gambar 6. Skema pengujian aktivitas antidiabetes

F. Analisis Hasil

Analisa hasil menggunakan Uji *Shapiro Wilk* untuk mengetahui apakah data yang diperoleh berdistribusi normal. Data berdistribusi normal dan homogen ($\text{Sig} > 0,05$) maka dapat dilanjutkan dengan *Way ANOVA*, namun jika data yang diperoleh tidak berdistribusi normal dan homogen dengan ($\text{Sig} < 0.05$), dilanjutkan dengan uji non parametrik (*Kruskal Wallis*), dilanjutkan dengan Uji *Levene* untuk mengetahui homogenitas data, kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc* untuk melihat apakah terdapat perbedaan antara masing-masing kelompok perlakuan.