

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih merah yang diambil dari Tawamanggu, Solo Jawa Tengah pada bulan Januari 2019.

##### **2. Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih merah yang segar, dari tanaman daun sirih merah kecuali bagian akar dan batang yang sudah mengeras, bebas jamur, dan tidak busuk.

#### **B. Varian Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah aktivitas ekstrak daun sirih merah terhadap penurunan kadar gula darah pada tikus yang mengalami resistensi insulin, variasi dosis dengan menggunakan dosis 50 mg, 100 mg, dan 200 mg. Dengan menggunakan metode uji resistensi insulin.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang ditetapkan dalam klasifikasi ke macam-macam variabel yaitu:

**2.1 Variabel bebas.** Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk mengetahui pengaruh terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu ekstrak daun sirih merah dengan dosis yang berbeda.

**2.2 Variabel tergantung.** Variabel tergantung adalah inti dari persoalan yang merupakan kriteria dalam penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah penurunan kadar glukosa darah tikus putih jantan pada masing-masing perlakuan.

**2.3 Variabel terkendali.** Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan agar mendapatkan

hasil yang tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lainnya. Variabel terkendali dalam penelitian ini yaitu berat badan tikus, umur tikus, jenis kelamin, galur hewan uji, kondisi fisik, pakan yang diberikan, kondisi lingkungan dan keadaan laboratorium, dan kondisi penelitian.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, daun sirih merah adalah daun yang diambil saat keadaan segar, berwarna merah, pada bagian tanaman daun sirih semua berwarna merah kecuali bagian batang dan akar, tidak busuk, dan bebas dari hama yang didapatkan dari daerah Tawamangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, daun sirih merah adalah tanaman yang proses pengeringannya menggunakan oven dengan suhu 40°C, kemudian diblender menjadi sebuk halus, dan diayak dengan pengayak no 40.

Ketiga, ekstrak daun sirih merah adalah hasil maserasi daun sirih merah menggunakan pelarut etanol 70%, dengan perbandingan 1:10 yang dipisahkan dengan alat vacum evaporatory dengan suhu 40°C agar mendapatkan ekstrak kental.

Keempat, metformin adalah obat diabetes oral, dosis pada sediaan dengan dosis 500 mg.

Kelima, glukometer dengan menggunakan strip test yang diletakan pada alat, ketika darah diteteskan pada zona reaksi tes strip.

Keenam, Diabetes resistensi insulin pada tikus yang mengalami DM resistensi, bila kadar gula puasa yaitu >85 mg/dL (Wang *et al.* 2010).

Ketujuh, Dosis efektif adalah 200 mg/kg BB sebanding dengan kontrol positif.

## **C. Alat dan Bahan**

### **1. Alat**

Alat untuk maserasi terdiri dari blender, timbangan bahan, ayakan mesh no.40, oven, kertas saring, bejana maserasi, ember, nampan, pisau, kain flanel, vacum rotary evaporator, corong glass, waterbath, botol berwarna gelap, gelas ukur, gelas kaca, Erlenmeyer, beaker glass, batang pengaduk, labu takar, dan

kantong plastik. Alat yang diperlukan untuk mengukur kadar air yaitu Sterling-Bidwell. Alat yang diperlukan untuk mengukur kadar glukosa darah adalah glucometer.

## **2. Bahan**

**2.1 Bahan sampel.** Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sirih merah yang diambil dari Tawamangu, Solo Jawa Tengah.

**2.2 Bahan kimia.** Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah Insulin kerja panjang Lantus® 100 IU/mL (PT. Aventis Pharma), Metformin ((PT. Phapros), CMC-Na (Brataco), etanol 70%, dan aqua dest.

**2.3 Hewan uji.** Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan jalur wistar berusis 2-3 bulan dengan berat badan berkisar 170-200 gram.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi tanaman**

Determinasi digunakan untuk memastikan simplisia yang diteliti benar dengan cara memperhatikan makroskopis dan mikroskopis menggunakan data pustaka sebagai acuan. Determinasi dilakukan di Laboratorium Fakultas Universitas Setia Budi Surakarta.

### **2. Pengumpulan bahan**

Pengumpulan bahan dengan cara pengambilan daun sirih merah sebanyak  $\pm 10$  kg. Daun sirih merah didapatkan di daerah Tawamangu, Solo Jawa Tengah dalam kondisi segar.

### **3. Pencucian**

Pencucian dilakukan dengan membersihkan bagian daun, akar, dan batang hingga bersih menggunakan air mengalir, setelah itu ditiriskan.

### **4. Pengeringan**

Pengeringan dapat dilakukan dengan cara daun sirih merah diiris kecil-kecil, kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 40°C. Selanjutnya dihaluskan menggunakan blender, sehingga didapatkan daun sirih

merah dalam bentuk serbuk, setelah itu diayak dengan menggunakan ayakan no.40 dan ditimbang, dan disimpan dalam wadah bersih dan tertutup rapat (Depkes 1986).

### 5. Pembuatan ekstrak daun sirih merah

Dibuat dengan cara daun sirih merah diiris kecil-kecil yang kemudian di kering anginkan, setelah kering kemudian daun sirih dihaluskan, dan ditambahkan pelarut etanol 70%, ditutup dan dibiarkan selama dua hari terlindung dari cahaya, sambil sesekali diaduk, kemudian disaring hingga didapatkan maserat. Ampas yang didapat selanjutnya dimaserasi dengan etanol 70% dengan menggunakan prosedur yang sama, semua maserat etanol digabungkan dan diuapkan menggunakan vacum evaporatory dengan suhu  $\pm 40^{\circ}\text{C}$  hingga diperoleh ekstrak etanol kental (Maksum 2008).

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

### 6. Penetapan kadar air serbuk ekstrak daun sirih merah

Penetapan kadar air daun sirih merah dengan menggunakan alat Sterling-Bidewell. Caranya yaitu dengan menimbang serbuk daun sirih merah sebanyak 20g kemudian dimasukkan kedalam labu alat bulat dengan menggunakan alat Sterling-Bidwell, dan ditambahkan Toluena sebanyak 100 mL dan dipanaskan sampai tidak terdapat tetesan air. Selanjutnya diukur kadar airnya, dilihat volume skala alat dan dihitung % air dari berat sampel tersebut (Sudarmadji *et al.* 2003).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume terbaca}}{\text{Berat bahan}} \times 100\%$$

### 7. Tes bebas etanol

Tes bebas etanol pada ekstrak etanol daun sirih merah dengan menggunakan cara esterifikasi alkohol, dimana ekstrak daun sirih merah ditambahkan asam asetat encer dan asam sulfat pekat yang kemudian dipanaskan. Bila tidak tercium bau ester (etil asetat) menandakan sudah tidak ada etanol (Depkes 1986).



## **8. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun sirih merah dengan metode uji tabung**

**8.1 Identifikasi flavonoid.** Sebanyak 50 mg ekstrak ditambahkan 100 mL air dan dipanaskan selama 5 menit kemudian disaring diperoleh filtrat yang digunakan sebagai larutan percobaan (larutan A). Sebanyak 5 mL larutan percobaan dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan serbuk magnesium secukupnya ditambahkan 1 mL asam klorida pekat dan 5 mL amilalkohol dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Warna yang terbentuk yaitu warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amilalkohol menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

**8.2 Identifikasi alkaloid.** Sebanyak 50 mg ekstrak dimasukkan kedalam cawan, ditambahkan 5 mL ammonia 30% dan digerus kuat dalam mortir kemudian ditambahkan 20 mL kloroform digerus kemudian disaring. Filtrat berupa larutan organik (sebagai larutan A). Beberapa tetes larutan A ditetaskan pada kertas saring disemprot atau ditetesi dengan pereaksi Dragendorff. Warna yang terbentuk yaitu warna merah atau jingga pada kertas saring menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Larutan A dibagi dalam dua tabung reaksi, masing-masing ditambahkan pereaksi Dragendorff dan Mayer, hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan merah bata dengan pereaksi Dragendorff dan endapan putih dengan pereaksi Mayer menunjukkan adanya senyawa alkaloid.

**8.3 Identifikasi tanin.** Sebanyak 50 mg ekstrak ditambahkan 100 mL air dididihkan selama 15 menit didiamkan sampai dingin dan disaring kemudian filtrat dibagi menjadi dua bagian (filtrat A dan B). Filtrat A ditambahkan larutan ferriklorida 1% secukupnya. Warna yang terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa golongan tanin. Filtrat B ditambahkan 15 mL pereaksi *Stiasny* (formaldehid 30%:asam klorida pekat 2:1) dipanaskan di atas penangan ais. Endapan terbentuk warna merah muda menunjukkan adanya tanin.

**8.4 Identifikasi saponin.** Sebanyak 10 mL larutan percobaan (larutan A) dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dikocok kuat selama 10 detik secara vertikal kemudian dibiarkan selama 10 menit. Terbentuknya busa yang stabil

dalam tabung reaksi menunjukkan adanya senyawa golongan saponin, bila ditambahkan 1 tetes asam klorida 1% (encer) busa tetap stabil.

**8.4 Identifikasi minyak atsiri.** Sebanyak 50 mg ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 10 mL petroleum eter. Pada mulut tabung dipasang corong yang diberi lapisan kapas yang telah dibasahi dengan air, kemudian dipanaskan selama 10 menit di atas tangan air. Dan setelah dingin, disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh diuapkan pada cawan penguapan sampai kering sehingga diperoleh residu. Residu larutkan dalam etanol sebanyak 5 mL dan disaring dengan kertas saring. Filtratnya diuapkan pada cawan penguapan, jika residu berbau aromatik menunjukkan adanya senyawa golongan minyak atsiri.

## 9. Penetapan dosis

**9.1 Dosis metformin.** Dosis metformin yang digunakan dengan berat badan 70 kg adalah 500 mg. Faktor konversi manusia (70 kg) ketikus (200g) adalah 0,018. Dosis :  $0,018 \times 500 \text{ mg} = 9 \text{ mg}/200\text{g BB tikus} = 45 \text{ mg/kg BB}$ . Dosis metformin untuk kontrol positif yaitu 45 mg/kg BB/ hari. Membuat 25 mL CMC-Na 0,5% dengan air hangat, hingga terbentuk bubur menggunakan magnetik strirer, dan pembuatan stok metformin 20 mg/mL dilakukan dengan menimbang 500 mg metformin. Kemudian dicampurkan ad homogen. Hasil suspensi metformin dimasukan ke dalam labu takar 50 mL.

**9.2 Dosis Insulin.** Penyuntikan Insulin pada tikus dewasa menurut penelitian (Fitriana 2012), tikus DM tipe 2 yang mengalami resistensi insulin dapat dibuat dengan cara pemejanaan insulin eksogen 1,8 IU/kg BB/hari selama 14 hari. Sehingga dosis yang digunakan untuk membuat tikus resistensi insulin adalah 1,8 IU/kg BB/hari.

**9.3 Sediaan uji ekstrak daun sirih merah.** Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih merah dengan dosis 50 mg/kg BB, dan dosis 100 mg/kg BB dapat menurunkan kadar glukosa darah tikus putih jantan, maka diperoleh dosis awal sebagai dosis orientasi yang selanjutnya akan digunakan sebagai penetapan dosis ekstrak daun sirih merah dalam beberapa konsentrasi dengan variasi dosis yang berbeda, yaitu 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB,

dan 200 mg/kg BB ekstrak etanol daun sirih merah ditimbang sebanyak 8% kemudian dilarutkan dengan CMC-Na sebanyak 10 mL yang telah dibuat sebelumnya dan diaduk hingga homogen, sediaan uji dibuat 100 mL dengan berdasarkan volume ideal yang dapat dimasukkan ke dalam tubuh hewan percobaan secara oral.

## **10. Pembuatan suspensi**

**10.1 Suspensi CMC Na 0,5%.** larutan CMC dengan konsentrasi 0,5% dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 0,5 gram CMC pada aquades hangat menggunakan magnetik strirer, sedikit-sedikit kemudian diaduk hingga volume 100 mL aquadest. Diberikan pada kelompok kontrol negatif.

## **11. Pengelompokan dan perlakuan hewan uji**

Sebanyak tiga puluh ekor tikus dibagi menjadi 6 kelompok secara acak dan dipuasakan selama 18 jam dan diberi minum. Hewan uji diadaptasikan dengan alat uji selama 2-3 menit, sebelum hewan uji diberikan larutan terlebih dahulu dihitung. Kelompok uji tersebut adalah sebagai berikut:

Kelompok 1 : Kelompok normal tanpa perlakuan.

Kelompok 2 : Kontrol negatif, tikus diberikan CMC-Na 0,5%.

Kelompok 3 : Kontrol positif, tikus diberikan metformin 135 mg/kg BB.

Kelompok 4 : Tikus diberikan ekstrak etanol daun sirih merah dengan dosis yaitu 50 mg/kg BB tikus.

Kelompok 5 : Tikus diberikan ekstrak etanol daun sirih merah dengan dosis yaitu 100 mg/kg BB tikus

Kelompok 6 : Tikus diberikan ekstrak etanol daun sirih merah dengan dosis yaitu 200 mg/kg BB tikus

## **12. Prosedur pengujian**

Prinsip pengujian DM tipe 2 yang mengalami resistensi insulin ini menggunakan metode dengan memicu resistensi reseptor insulin, disebabkan keadaan hipersulinemia dalam waktu yang lama sehingga dapat menginduksi terjadinya DM tipe 2. Dengan cara tikus diberikan tanda pengenalan, tikus yang digunakan pada penelitian ini jumlahnya 36 ekor tikus putih jantan. Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar yang telah berumur 2-3

bulan dengan kisaran berat badan yaitu 170-200 gram. Hewan uji dibagi menjadi 6 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri atas lima ekor tikus.

Tiga puluh ekor tikus diberi perlakuan dengan insulin eksogen 1,8 IU/kgBB/hari (s.c) selama 14 hari kecuali kelompok normal. Kemudian dilakukan pemejanaan selama 14 hari, tikus dibiarkan selama 3 hari, sebelum dilakukan penelitian, dilakukan lebih dahulu pengukuran kadar glukosa darah tiap 30 menit selama 2 jam setelah pemberian glukosa dosis 2 g/KgBB per oral pada setiap tikus pada kelompok perlakuan dan kontrol.

Tikus yang diinduksi insulin eksogen dinyatakan mengalami DM tipe-2 bila kadar GDP pada hari ke-17 yaitu  $> 85$  mg/dL (Wang *et al.* 2010). Sebelum perlakuan sediaan uji, terlebih dahulu dipuasakan selama 18 jam, kemudian dilakukan pengukuran kadar GDP. Sediaan uji diberikan pada tikus DM tipe 2 pada masing-masing kelompok selama 14 hari peroral.

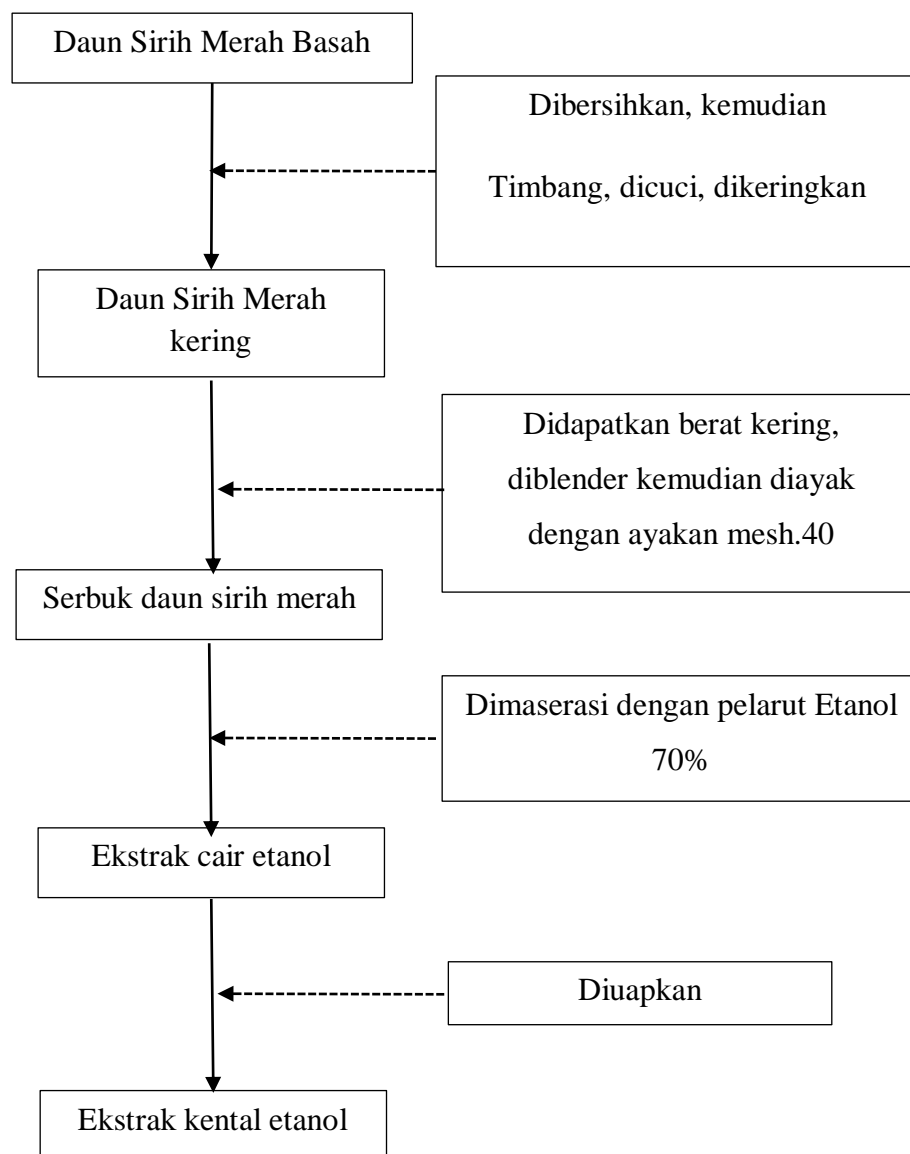
Kemudian masing-masing kelompok diberikan CMC-Na 0,5% (kelompok kontrol negatif), larutan metformin (kelompok kontrol positif), ekstrak daun sirih merah 100 mg/kg BB tikus, 200 mg/kg BB tikus, 400 mg/kg BB tikus, secara oral selama 7 hari. Setelah pemberian sediaan uji, dilakukan pengukuran kadar GDP untuk melihat efek antidiabetes. Efek antidiabetes dapat dilihat dengan membandingkan kadar GDP sebelum dan sesudah pemberian sediaan uji (Anas *et al.* 2015).

Tikus yang akan diukur kadar glukosanya di puasakan dahulu selama 18 jam, keberbedaan bermakna ditandai dengan nilai signifikan  $< 0,05$ . Ekor tikus diusap dengan kapas alkohol 70% kemudian dilukai hingga terbentuk luka kecil. Darah yang digunakan yaitu darah pada tetesan ke-4 (Anas *et al.* 2015). Darah ditetaskan pada ujung strip berwarna hitam. Kemudian  $\pm 10$  detik terlihat hasil pembacaan kadar glukosa pada layar glukometer.



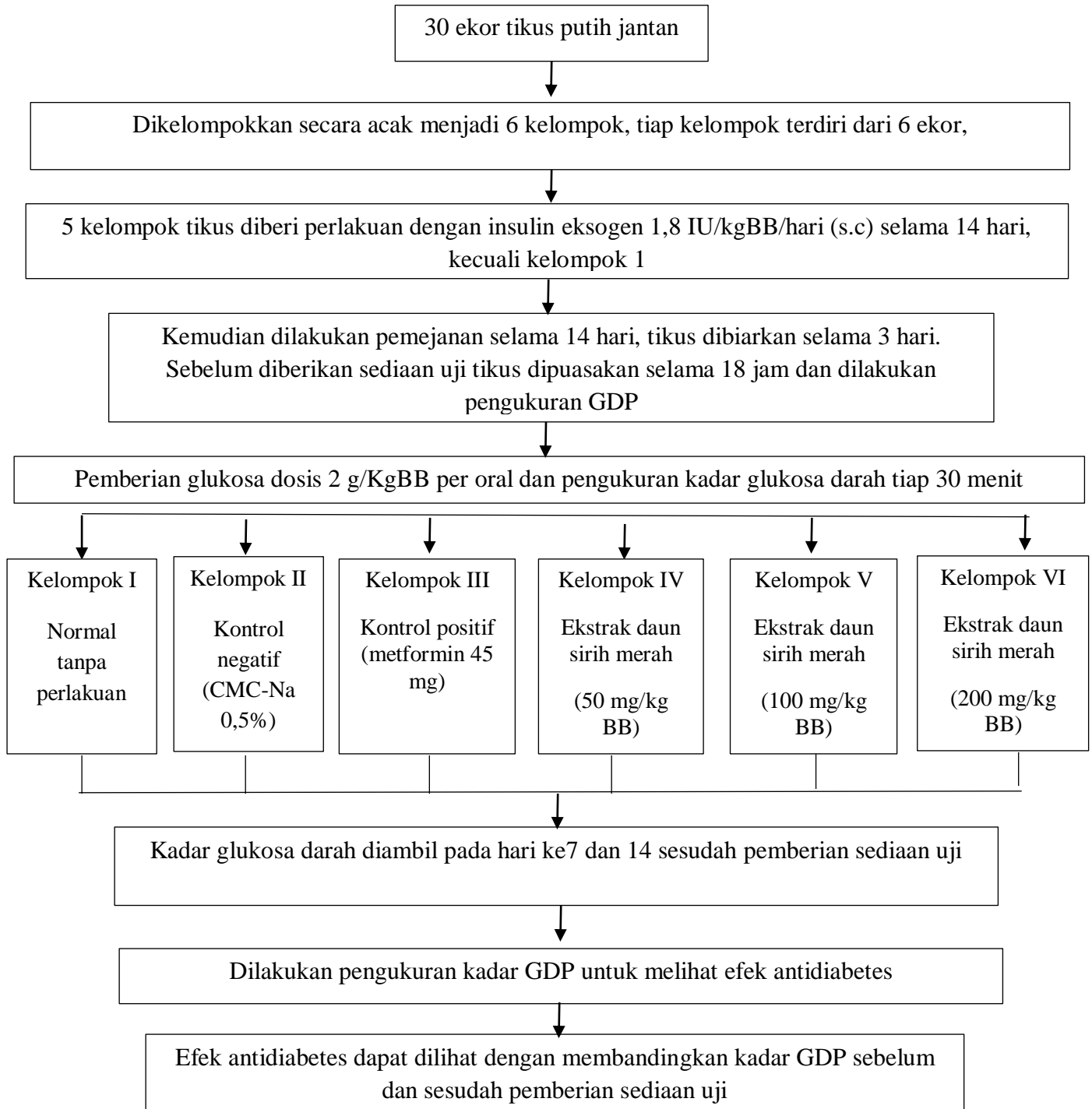
### E. Alur Penelitian

Cara pembuatan ekstrak etanil daun sirih merah, proses dapat dilihat pada skema dibawah ini:



**Gambar 3. Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Merah**

## Skema Prosedur Pengujian :



Gambar 4. Skema uji antidiabetes ekstrak etanol daun sirih merah dengan variasi dosis

## F. Analisis Data

Tahap pertama, data kadar GDP induksi DM tipe-2 pada tikus jantan galur Wistar yang mengalami resistensi insulin selama perlakuan insulin diuji dulu dengan uji normalitas dan uji homogenitas varian. Analisa untuk normalitas menggunakan Shapiro-Wilk dan data dikatakan normal bila nilai signifikansi  $>0,05$ . Sedangkan untuk analisis homogenitas menggunakan *Homogeneity of Variance Test* dan varian data dikatakan homogen bila nilai signifikansi  $>0,05$ . Jika analisa data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen, maka analisa data dilanjutkan dengan metode statistik non parametik yaitu Mann-Whitney dengan perbedaan kadar GDP ditentukan dari nilai signifikansi  $<0,05$  dengan taraf kepercayaan sebesar 95%.

Tahap kedua, data kadar GDP uji aktivitas antidiabetes diuji dahulu dengan uji normalitas dan homogenitas varian. Hasil uji normalitas menggunakan metode shapiro wilk, dikatakan homogen jika menunjukkan signifikansi  $>0,05$ . Data selanjutnya dianalisa dengan menggunakan metode statistik non parametik dengan uji Anova.

Tahap ketiga, data perbandingan efek antidiabetes. Data penurunan kadar GDP masing-masing sediaan uji, diuji terlebih dahulu dengan uji normalitas dan uji homogenitas varian. Jika hasil uji normalitas dan uji homogenitas menunjukkan adanya data homogen tetapi tidak terdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan transformasi data sehingga dibuat dalam bentuk log. Data akan homogen, dilihat pada homogenenius subset untuk mengetahui kebermaknaannya.