

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides* (Benth). S. Moore).

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides* (Benth). S. Moore) secara acak berwarna hijau, tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda dan tidak rusak, yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah diambil pada bulan Februari 2018.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variable utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah aktivitas ekstrak daun sintrong hasil maserasi dengan pelarut etanol 96%.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis ekstrak daun sintrong yang mempunyai aktivitas antidiabetes.

Variabel tergantung merupakan variabel akibat dari variabel utama, variabel tergantung dalam penelitian ini adalah selisih penurunan kadar glukosa darah pada hewan uji sesudah dan sebelum diberi perlakuan.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat.

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah metode ekstraksi daun sintrong, kondisi fisik hewan uji meliputi berat badan mencit, galur, jenis kelamin, kondisi percobaan, laboratorium, zat penginduksi, dan peneliti.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun sintrong adalah seluruh daun pada tanaman sintrong yang segar, berwarna hijau, tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda dan tidak rusak yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah diambil pada bulan Februari 2018.

Kedua, serbuk adalah simplisia kering daun sintrong yang dikeringkan di oven dengan suhu 40°C. Kemudian dihaluskan menggunakan blender menjadi serbuk halus dan diayak dengan pengayak ukuran mesh 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun sintrong adalah hasil dari penarikan sari dari daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides* (Benth). S. Moore) dengan cara maserasi menggunakan penyari etanol 96%, kemudian diuapkan dengan evaporator untuk mendapatkan ekstrak kental.

Keempat, hewan uji yang dipakai adalah tikus jantan galur wistar dengan berat badan 150-200 gram.

Kelima, kadar glukosa darah yang diambil melalui venous plexus pada mata tikus dan ditetapkan kadarnya dengan menggunakan metode GOD-PAP.

Keenam, aktivitas glutathion peroksidase adalah aktivitas yang ditetapkan dari data supernatant hati menggunakan enzim glutathion peroksidase.

Ketujuh, aloksan adalah bahan yang diberikan secara intra peritoneal untuk merusak sel β pankreas pulau Langerhans yang fungsinya menghasilkan insulin sehingga terjadi diabetes.

C. Alat dan Bahan

1. Bahan

1.1 Bahan sampel. yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides* (Benth). S. Moore) yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Februari tahun 2018.

1.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 96 % sebagai cairan penyari. Untuk uji farmakologi digunakan induksi aloksan monohidrat, glibenlamid, CMC 0,5 %, larutan fisiologis NaCl 0,9 %, phosphate buffer, GSH, glutation peroksidase assay, reagen GOD-PAP.

1.3 Hewan uji. Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih galur wistar kelamin jantan, umur 2-3 bulan dengan berat badan rata-rata 150-200 g sebanyak 30 ekor. Pengelompokan dilakukan secara acak masing-masing 5 ekor per kelompok. Semua tikus dipelihara dengan cara yang sama, mendapat diet yang sama, ukuran kandang yang sesuai dengan temperature $\pm 28^{\circ}\text{C}$. Penerangan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap. Selama penelitian kebutuhan makanan dan minuman harus selalu terkontrol agar mencegah kematian tikus terutama saat diinduksi aloksan untuk membuat tikus diabetes.

2. Alat

Alat untuk membuat simplisia yaitu pisau untuk merajang, oven dengan suhu rendah dan konstan, mesin penggiling dan ayakan no. 40. Alat penyari yang digunakan adalah Alat untuk penyari adalah seperangkat alat maserasi, evaporator, bejana maserasi, kain flannel, neraca elektrik, pipet, tabung reaksi, *beaker glass*. Alat untuk perlakuan hewan uji adalah timbangan analitik, jarum oral, spuit injeksi insulin 1.0 ml merck, pipa kapiler, gelas ukur dan *beaker glass*. Alat untuk pengujian glutation peroksidase antara lain spektrofotometer, lemari beku -80°C , sentrifugase dingin *Ependrof*, tabung EDTA LOT, mikropipet *Ependrof*, *microsentrifugase tube ependrof* dan vortex.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman sintrong

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi tanaman daun sintrong. Determinasi tanaman bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel tanaman berkaitan dengan ciri-ciri mikroskopis dan makroskopis, serta ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman terhadap

pustaka yang dilakukan di laboratorium biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Jawa Tengah.

2. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel daun sintrong yang segar, berwarna hijau, tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda dan tidak rusak yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah diambil pada bulan Februari 2018.

3. Pembuatan serbuk daun sintrong

Daun sintrong yang telah dikumpulkan selanjutnya dibersihkan dengan cara dicuci menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada daun. Daun sintrong dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40 °C. Pengerinan dilakukan untuk mendapatkan simplisia yang awet dan tidak mudah ditumbuhi mikroba dalam penyimpanan jangka lama, proses pengerinan juga dapat menghentikan reaksi enzimatis sehingga kandungan senyawa yang terdapat dalam daun sintrong lebih stabil.

Daun sintrong yang telah kering kemudian diserbukkan untuk memperbesar luas permukaan simplisia sehingga dapat mempermudah proses penarikan senyawa kimia dalam simplisia pada saat ekstraksi.

4. Penetapan kadar air

Penetapan kadar air serbuk daun sintrong dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta dengan menggunakan alat *sterling-Bidwell*. Menimbang serbuk daun sintrong sebanyak 20 gram dimasukan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut xilena 100 ml sampai serbuk terendam, kemudian memasang alat *sterling-Bidwell* dan dipanaskan. Pemanasan dihentikan bila air pada penampung tidak menetes lagi, kemudian diukur kadar airnya dengan melihat volume padaskala alat tersebut dan dihitung persen kadar airnya (Sudarmadji *et al* 2010).

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

5. Pembuatan ekstrak daun sintrong

Ditimbang 500 gram daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides* Benth. S. Moor.), kemudian dimasukan serbuk simplisia ke dalam bejana maserasi.

Dituang secara perlahan pelarut etanol 96% sebanyak 3,75 L ke dalam bejana maserasi yang berisi serbuk simplisia. Biarkan cairan penyari merendam seluruh serbuk simplisia selama 5 hari sambil digojog secara periodik. Campuran kemudian disaring dan ampasnya direndam lagi dengan cairan penyari yang baru. Proses penyarian selanjutnya dilakukan sebanyak 1 kali dengan hasil akhir 100% etanol 96% secukupnya. Ekstrak cair dikumpulkan kemudian dipekatkan dengan menggunakan alat rotavapor (*rotary evaporator vacuum*) hingga diperoleh ekstrak kental.

6. Uji bebas etanol

Uji bebas etanol ekstraksi maserasi dilakukan dengan cara esterifikasi etanol di mana ekstrak ditambahkan asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, bila tidak ada bau ester (etil asetat) berarti di dalam ekstrak sudah tidak terdapat etanol (DepKes 1995).

7. Identifikasi senyawa kimia

7.1 Identifikasi flavonoid. Sejumlah tertentu ekstrak ditambah 100 ml air panas kemudian dididihkan selama 5 menit, disaring dan diambil filtratnya 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan serbuk magnesium (Mg) secukupnya + 1 ml asam klorida dan 2 ml amil alkohol, dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Terbentuknya warna merah/kuning/jingga pada lapisan amil alcohol menunjukkan positif flavonoid (Sarker 2006).

7.2 Identifikasi tanin. Sejumlah ekstrak ditambahkan 20 ml air panas kemudian dididihkan selama 15 menit, setelah dingin disaring. Sebanyak 5 ml filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi larutan besi (III) klorida 1%. Jika tannin positif maka akan terbentuk warna hijau violet setelah direaksikan dengan larutan besi (III) klorida (Depkes 1995).

7.3 Identifikasi saponin. Sejumlah ekstrak ditambah dengan air panas 10 ml, didinginkan lalu dikocok selama 10 detik. Kemudian didiamkan selama 10 menit. Saponin menunjukkan hasil positif akan terbentuk buih yang tinggi 1-10 cm. pada penambahan asam klorida 2N buih tidak hilang (Robinson 1995).

7.4 Identifikasi Steroid. Sejumlah ekstrak tertentu ditambah dengan 1 tetes Liebermann Burchard yang terdiri dari 1 ml asam asetat anhidrat dan asam

sulfat pekat 1 tetes. Steroid menunjukkan hasil positif ditunjukkan dengan adanya cincin kecoklatan (Sarker 2006).

8. Pembuatan larutan uji

8.1 Larutan suspensi CMC Na 0,5%. CMC Na konsentrasi 0,5 % adalah larutan yang digunakan sebagai kontrol negatif, dibuat dengan cara menimbang serbuk CMC Na sebanyak 500 mg kemudian dimasukkan ke dalam cawan penguap dan ditambah sedikit aqudest. Selanjutnya dipanaskan sampai mengembang kemudian dimasukkan ke dalam mortar dan menggerusnya dan menambahkan sedikit demi sedikit aquadest hingga 100 ml, diaduk hingga homogen.

8.2 Larutan glibenklamid. Larutann konsentrasi glibenklamid 0,09 % dibuat dengan cara melarutkan serbuk glibenklamid sebanyak 9 mg dalam CMC Na 0,5 % sampai volume 100 ml.

8.3 Larutan garam fisiologis. Larutan fisiologis 0,9 % dibuat dengan cara melarutkan 0,9 g NaCl dalam air suling pada volume 100 ml.

8.4 Larutan aloksan monohidrat. Larutan aloksan monohidrat konsentrasi 1% dibuat dengan cara melakukan 1 gram aloksan monohidrat dalam larutan garam fisiologis pada volume 100 ml.

9. Penentuan dosis

9.1 Dosis glibenklamid. Dosis glibenklamid dihitung dari dosis lazim. Faktor konversi manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018. Dosis terapi glibenklamid untuk manusia dengan berat badan 70 kg adalah 5 mg. Dosis glibenklamid tikus sebesar 0,09 mg/200g bb tikus. Glibenklamid tidak larut dalam air untuk itu glibenklamid diberikan dalam bentuk suspensi hewan uji dengan menggunakan reagen pensuspensi *carboxy methyl cellulose* (CMC) 0,5 %.

9.2 Dosis aloksan. Dosis aloksan yang digunakan untuk membuat tikus diabetes adalah 150 mg /kg BB secara intraperitoneal. Tikus yang digunakan adalah tikus yang memiliki berat sekitar 200 g, sehingga didapatkan dosis aloksan yang digunakan pada penelitian ini adalah 30 mg/200 g berat badan tikus.

9.3 Dosis sediaan uji. Dosis sediaan diberikan berdasarkan literatur. Dibuat tiga variasi dosis ekstrak etanol daun sintrong yaitu dosis 75 mg/kg BB, dosis 150 mg/kg BB, dan dosis 300 mg/kg BB.

10. Perlakuan hewan uji

Pengujian dilakukan dengan metode induksi aloksan terhadap 6 kelompok tikus masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Tikus ditimbang dan masing-masing diberi tanda pengenal, tikus yang digunakan sebanyak 30 ekor. Semua tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 16 jam dan diperiksa kadar gula darah awalnya dan diinduksi dengan aloksan kecuali pada tikus kelompok I sebagai kontrol negatif pada penelitian ini. Induksi aloksan dengan dosis 30 mg/200g bb tikus, kemudian dilihat kadar gula darahnya pada hari ke 3. Jika kadar gula darah lebih dari 200 mg/dl maka tikus dikatakan sudah diabetes. Pemberian sediaan uji secara peroral selama 14 hari pada kelompok tikus.

Kelompok I = Kontrol normal (hanya diberi makan dan minum)

Kelompok II = Kontrol negatif (CMC 0,5 %)

Kelompok III = Ekstrak etanol daun sintrong dosis 75 mg/kg BB

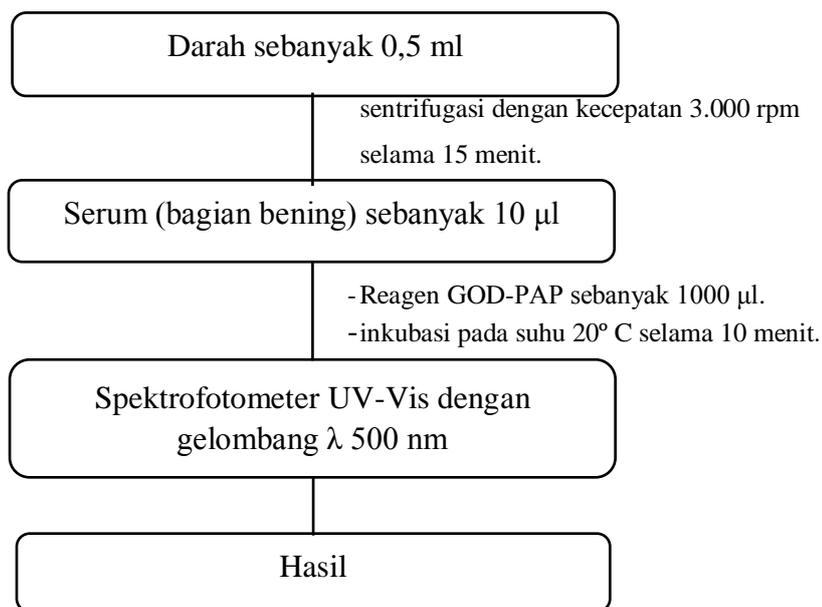
Kelompok IV = Ekstrak etanol daun sintrong dosis 150 mg/kg BB

Kelompok V = Ekstrak etanol daun sintrong dosis 300 mg/kg BB

Kelompok VI = Kontrol positif (glibenklamid) dosis 0,45 mg/kg BB

11. Pengukuran kadar glukosa darah

Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan 3 hari setelah diinduksi aloksan (T1) dan hari ke-14 (T2) setelah pemberian sediaan uji. Pengukuran kadar glukosa darah dengan metode GOD-PAP. Darah sebanyak 0,5 ml ditampung di dalam tabung ependorf kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit agar didapatkan serum. Serum (bagian bening) sebanyak 10 µl ditambah reagen GOD-PAP sebanyak 1000 µl. Larutan diinkubasi pada suhu 20° C selama 10 menit, kemudian diukur dengan panjang gelombang 500 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.



Gambar 2. Pengukuran kadar glukosa.

12. Pemeriksaan enzim glutathion peroksidase

Pemeriksaan kadar GPx dilakukan dengan Glutation Peroksidase Assay disimpan pada suhu -20°C , di mana penyimpanannya terlindung dari sinar matahari langsung.

12.1 Pembuatan supernatan hati. Pembuatan homogenat hati yang akan dipergunakan untuk pemeriksaan GPx menggunakan jaringan hati dengan berat ± 100 mg. Jaringan hati dilumatkan dengan *micropestle* dan homogenizer dalam 1 ml buffer fosfat 0,1 M pH 7,0 dan PMSF. Homogenat kemudian disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit. Lalu supernatan dituang dalam tabung yang bersih dan digunakan untuk pengukuran selanjutnya (Zainuri 2012).

12.2 Pengukuran aktivitas GPx. Sebanyak 200 μl supernatan jernih hati ditambahkan 200 μl buffer fosfat 0,1 m pH 7,0 yang mengandung 0,1 mM EDTA, 200 μl glutathion tereduksi (GSH) 10 mM dan 200 μl glutathion reduktase (2,4 unit). Kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C , ditambahkan 200 μl NADPH 1,5 mM dan diinkubasi lagi selama 3 menit pada suhu yang sama, dan dilanjutkan dengan penambahan 200 μl H_2O_2 1,5 mM. Absorbansi dilakukan antara waktu sampai dua menit dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm. Skema penelitian dapat dilihat pada gambar 3.

Perhitungannya adalah sebagai berikut :

$$M \text{ unit GSH-Px} = \frac{Abs \times Vt \times 2 \times 1000 \times 1/mg \text{ protein}}{6,22 \times Vs}$$

Abs = perubahan absorbansi

Vt = volume total

6,22 = koefisiensi ekstrinsik dari NADPH

2 = 2 mol GSH yang setara dengan 1 mol NADPH

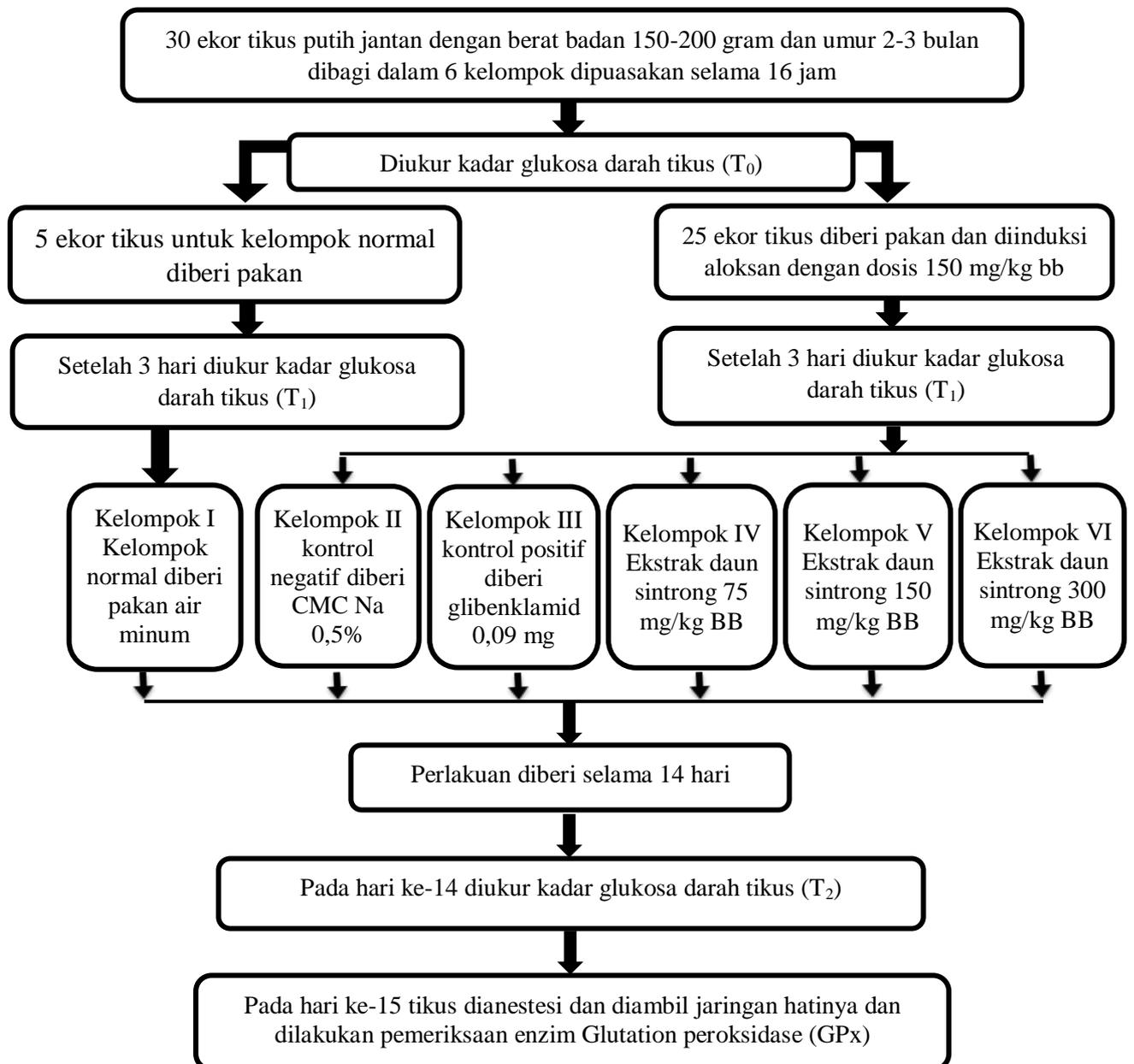
1000 = perubahan menjadi mili unit

Vs = volume sampel

E. Analisis Statistik

Data yang terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan uji parametrik *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan yang nyata di antara kelompok. Bila nilai signifikannya kecil dari 0,05 memiliki arti bahwa terdapat perbedaan antar kelompok, sedangkan nilai signifikannya besar dari 0,05 memiliki arti bahwa tidak ada perbedaan antar kelompok apapun. Jika hasil uji *One Way ANOVA* dan *uji Lavene Statistic* menunjukkan hasil normal ($> 0,05$), maka selanjutnya dilakukan uji *Post Hoc* untuk melihat penurunan kadar glukosa darah yang efektif di antara kelompok perlakuan. Namun, jika hasilnya tidak normal ($p < 0,05$), maka dilakukan uji non parametrik menggunakan uji *Mann-Whitney*.

F. Skema Penelitian



Gambar 3. Skema penelitian