

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun jamblang (*Syzygium cumini*) yang diperoleh dari Tawangmangu, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun jamblang (*Syzygium cumini*) yang diperoleh dari Tawangmangu, Jawa Tengah dengan kondisi daun segar dan tidak busuk.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Identifikasi variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah fraksi etil asetat daun jamblang dengan menggunakan pelarut etanol 96%.

Variabel utama kedua adalah aktivitas fraksi etil asetat daun jamblang terhadap kadar glukosa darah pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan.

Variabel utama yang ketiga adalah aktivitas fraksi etil asetat daun jamblang terhadap antihiperglikemia pada tikus yang diinduksi aloksan.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama diklasifikasikan menjadi 3 macam, yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah fraksi etil asetat daun jamblang dengan pelarut etanol 96% dalam berbagai dosis.

Variabel tergantung merupakan variabel akibat dari variabel utama. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah selisih kadar glukosa darah sebelum dan sesudah perlakuan, dengan pemberian fraksi etil asetat daun jamblang dalam berbagai dosis.

Variabel terkendali adalah variabel yang memengaruhi variabel tergantung. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah jenis kelamin, umur dan berat badan tikus, kondisi lingkungan kandang, kondisi laboratorium dan kondisi peneliti.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun jamblang adalah daun yang diperoleh dari daun yang berasal dari Tawangmangu, Jawa Tengah kemudian dikeringkan dan dibuat serbuk.

Kedua, ekstrak etanol daun duwet adalah ekstrak yang dihasilkan dari penyarian dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Ketiga, hewan uji dalam penelitian ini tikus, adalah tikus wistar jantan berumur 2-3 bulan dengan berat badan antara 120-220 gram sebanyak 30 ekor yang diinduksikan dengan aloksan 200 mg/kgBB sehingga mengalami diabetes.

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

Kelima, kadar glukosa darah adalah kadar glukosa darah yang diambil melalui vena lateralis ekor tikus jantan yang ditetapkan kadarnya dengan alat glukometer.

Keenam, peningkatan kadar glukosa darah adalah naiknya kadar glukosa darah setelah diinduksi aloksan (T1) terhadap kadar glukosa darah awal (T0) sebelum diinduksi aloksan.

Ketujuh, penurunan kadar glukosa darah adalah turunnya kadar glukosa darah setelah diberi sediaan uji pada hari ke 7 (T2) , hari ke 14 (T3), hari ke -21 (T4) dan hari ke-28 (T5) terhadap kadar glukosa darah setelah diinduksi aloksan (T1).

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan digital, oven, blender, ayakan no.30, bejana maserasi, evaporator, kain, flanel, kertas saring, corong pisah, alat gelas, alat glukometer, spuit oral, kandang tikus.

2. Bahan

2.1. Bahan Sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jamblang yang diperoleh dari Tawangmangu, Jawa tengah.

2.2. Bahan Kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96% sebagai bahan penyari, untuk uji

farmakologi digunakan glibenclamida (indofarma), aloksan (sigma), aquadest, CMC Na 0,5%.

3. Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah Tikus galur wistar jantan dengan berat badan antara 120-220 g sebanyak 25 ekor.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Daun Jamblang

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri makroskopis dan mikroskopisnya. Hal ini dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri morfologis tanaman pada pustaka yang dibuktikan dengan identifikasi yang dilakukan di Laboratorium Program Studi Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengumpulan Pengeringan dan Pembuatan Serbuk

Sampel penelitian yang digunakan adalah daun jambang yang diperoleh dari Tawangmangu Jawa Tengah. Sampel daun jambang yang diperoleh disortasi basah lalu dicuci. Sampel kemudian dirajang dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Setelah itu dilakukan sortasi kering dan diserbukkan dengan menggunakan blender serta diayak menggunakan pengayak mesh 40 sampai didapatkan serbuk daun duwet yang diinginkan.

3. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Jambang

Pembuatan ekstrak etanol daun jambang dilakukan dengan metode maserasi dengan perbandingan 1:10. Serbuk daun duwet ditimbang 600 gram dimasukkan ke dalam botol berwarna coklat kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 4000 ml, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya, dengan pengocokan 3 kali sehari. Cairan hasil ekstraksi disaring dengan kain flanel. Ampas kemudian dicuci kembali dengan etanol 96% sebanyak 1250 ml dengan pengocokan 3 kali sehari. Kemudian filtrat dipekatkan dengan rotay evaporator pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental (Depkes, 1986).

4. Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun jamblang dilakukan dengan cara menimbang serbuk dan ekstrak daun jamblang sebanyak 20 gram, dimasukkan dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut etanol sampai serbuk terendam, kemudian memasang alat Sterling-Bidwell, dipanaskan dengan api kecil, setelah mendidih apinya dibesarkan. Pemanasan dihentikan bila pada tetesan sudah tidak ada air yang menetes dan diukur kadar airnya dengan menggunakan alat Sterling-Bidwell dengan melihat volume pada skala alat tersebut selanjutnya dihitung kadar air dalam satuan persen (Sudarmadji *et al*, 1997).

5. Penetapan Susut Pengerinan

Penetapan susut pengerinan serbuk dan ekstrak etanol daun jamblang menggunakan alat *moisture balance*. Suhu yang digunakan adalah 105°C dan waktu pengerinan secara manual yaitu 5 menit, kemudian dimasukkan dalam neraca timbang dengan posisi 0,00 dan memasukkan sampel daun jamblang 2 gram. Menunggu sampai alat berbunyi yang menandakan hasil analisa telah selesai. Susut pengerinan memenuhi syarat dimana suatu serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10% (Voight, 1995).

6. Uji bebas etanol

Esterifikasi etanol digunakan untuk melakukan uji bebas etanol pada daun jamblang. Ekstrak ditambahkan asam asetat dan asam sulfat, dipanaskan, jika tidak ada bau ester, sampel tersebut bebas etanol.

7. Identifikasi Kandungan Senyawa

7.1. Identifikasi Flavonoid. Ekstrak etanol daun jamblang dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk, ditambah 2 ml larutan Mg dan pelarut Hcl pekat, lalu dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau kuning atau jingga pada amil alkohol (Robinson, 1995).

7.2. Identifikasi Tanin. Sejumlah ekstrak ditambah 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 tanin positif maka akan terbentuk warna hijau violet setelah direaksikan dengan larutan besi (III) klorida (Depkes RI, 1995).

7.3. Identifikasi Alkaloid. Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan cara sebanyak 500 mg ekstrak ditambahkan dengan 5 ml amoniak 25% dan digerus dalam mortar lalu ditambahkan 20 ml kloroform dan digerus kuat. Campuran disaring sehingga diperoleh lapisan air dan lapisan pelarut organik. Lapisan air ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendroff atau pereaksi Mayer. Jika terbentuk warna oranye dengan pereaksi Dragendroff atau terbentuk endapan putih dengan penambahan pereaksi Mayer berarti ekstrak mengandung alkaloid (Depkes RI, 1979).

7.4. Identifikasi Terpenoid/Steroid. Sejumlah tertentu ekstrak ditambahkan dengan satu tetes Liebermann Burchard yang terdiri dari 1 ml asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat 1 tetes. Terpenoid menunjukkan reaksi positif dengan adanya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan. Sedangkan steroid menunjukkan reaksi positif apabila muncul cincin biru kehijauan (Sarker, 2006).

8. Penentuan Dosis

Volume maksimal larutan uji dapat diberikan pada tikus dengan berat badan 200 gram secara oral sebesar 2 ml.

8.1. Dosis Aloksan Monohidrat. Dosis aloksan yang digunakan untuk membuat diabetes pada tikus putih adalah 200 mg/kg BB secara intra peritoneal (Szkudelski, 2001).

8.2. Dosis Suspensi Glibenklamid. Dosis terapi glibenklamid untuk manusia dengan berat badan 70 kg adalah 5 mg. Faktor konversi manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018 maka dosis glibenklamid untuk tikus sebesar 0,09 mg/200 g BB tikus (0,45 mg/kg BB tikus).

8.3. Dosis Sediaan Uji. Dosis fraksi daun jambang yang digunakan dalam penelitian ini adalah dosis 125, 250 dan 500 mg/kgBB. Dosis terkecil yang diambil 125 mg/kgBB tikus yang efektif menurunkan antihyperglisemia pada tikus (Roy, 2011).

9. Pembuatan Sediaan Uji

9.1. Aloksan. Larutan aloksan dengan konsentrasi 1% dibuat dengan cara melarutkan 1 gram aloksan monohidrat dalam larutan CMC 0,5% pada volume 100 ml.

9.2. CMC Na 0,5%. CMC Na 0,5% digunakan sebagai kontrol negatif. CMC Na 0,5% dibuat dengan cara melarutkan 0,5 gram CMC Na dengan aquadest hangat sedikit demi sedikit, kemudian dimasukkan

ke dalam mortir dan digerus sampai halus. Setelah itu, aquadest ditambahkan hingga 100 ml, diaduk hingga homogen.

9.3. Glibenklamid 0,09 mg/ml. Suspensi glibenklamid 0,09 mg/ml dibuat dengan cara melarutkan serbuk glibenklamid dalam CMC Na 0,5% sampai volume 100 ml.

9.4. Fraksi Etil Asetat Daun Duwet. Larutan fraksi etil asetat ekstrak etanol daun duwet 5% dibuat dengan cara melarutkan fraksi daun jamblang sebanyak 5 gram dalam CMC Na 0,5% sampai volume 100 ml.

10. Perlakuan Hewan Uji

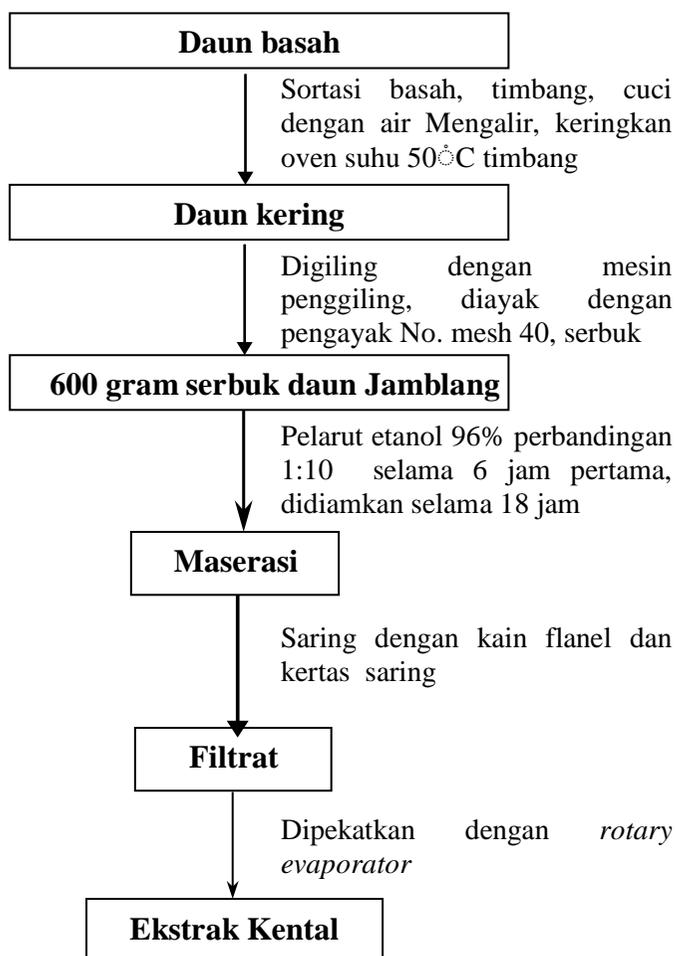
Hewan uji dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar, usia 2-3 bulan dengan berat badan antara 180-220 gram. Tikus ditimbang dan masing masing diberi tanda pengenal, tikus yang digunakan sebanyak 25 ekor dan dibagi dalam 5 kelompok. Kemudian tikus dipuasakan selama 16 jam untuk mengukur kadar glukosa darah awal (T0). Alokasan diinjeksikan sekali sebanyak 200 mg/kg BB secara intraperitoneal kecuali pada kelompok tikus sebagai kontrol normal. Setelah 7 hari, kadar glukosa darah tikus kembali diukur (T1). Seleksi dilakukan untuk tikus yang masuk dalam kriteria diabetes dengan kadar glukosa darah lebih dari 200 mg/dl. Selanjutnya semua tikus diberi perlakuan sesuai kelompok selama 28 hari dengan pembagian kelompok sebagai berikut:

- Kelompok I : Kontrol normal tanpa perlakuan
- Kelompok II : Kontrol negatif, tikus diberikan CMC Na 0,5%
- Kelompok III : Kontrol positif, tikus diberikan glibenklamid dosis 0,45mg/kg BB tikus.
- Kelompok IV : Tikus diberi fraksi etil asetat daun jamblang dosis 125 mg/kg BB tikus
- Kelompok V : Tikus diberi fraksi etil asetat daun jamblang dosis 250 mg/kg BB tikus
- Kelompok VI : Tikus diberi fraksi etil asetat daun jamblang dosis 500 mg/kg BB tikus

Larutan uji diberikan secara oral setiap hari pada pagi hari. Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke-7 (T2) , hari ke-14 (T3), hari ke 21 (T4) dan hari ke 28 (T5) untuk diukur kadar glukosa darah setelah perlakuan.

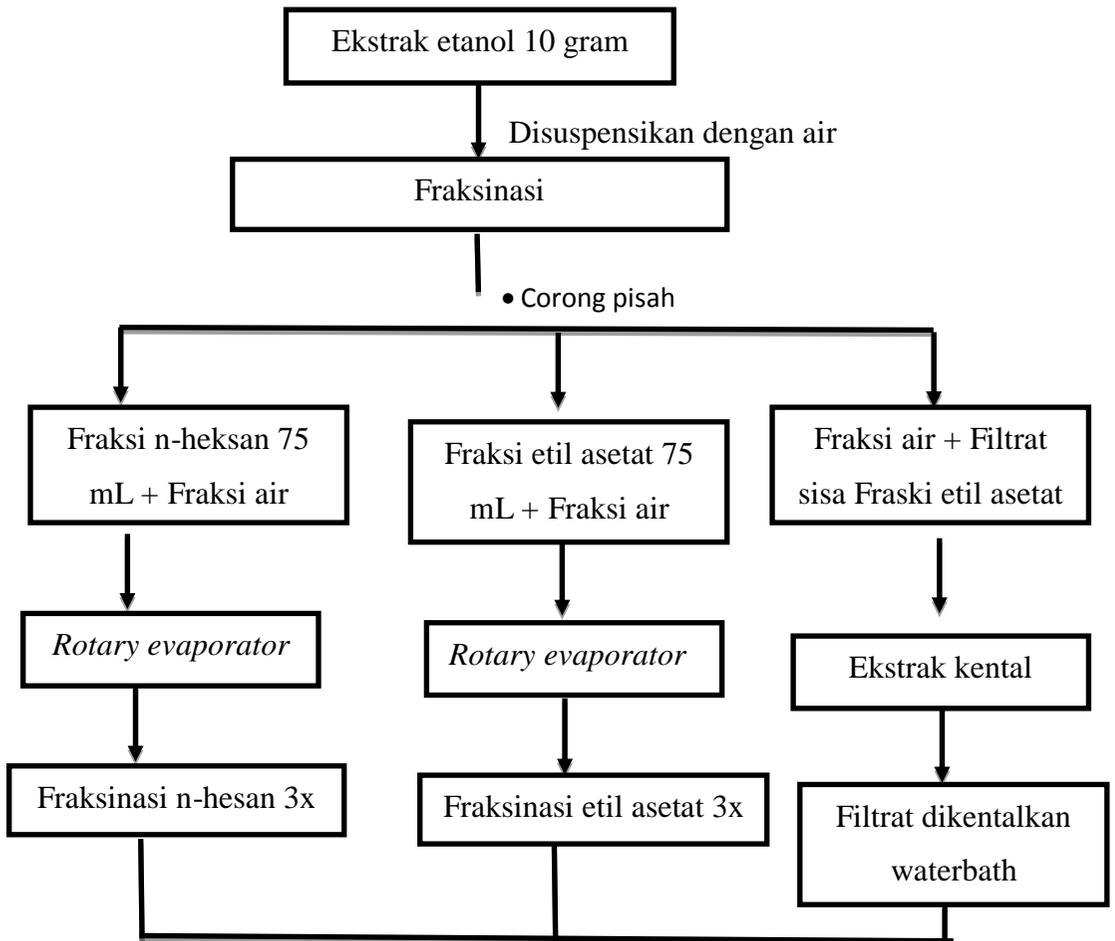
E. Analisa Statistik

Dalam penelitian ini untuk melihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak maka digunakan analisis statistik yaitu dengan menggunakan uji distribusi normal (One-Sample Kolmogorov-Smirnov). Apabila data yang ada terdistribusi normal ($p > 0,05$) maka analisis data dapat dilanjutkan dengan menggunakan uji parametrik one way ANOVA untuk mengetahui perbedaan yang nyata antara perlakuan yang diberikan.



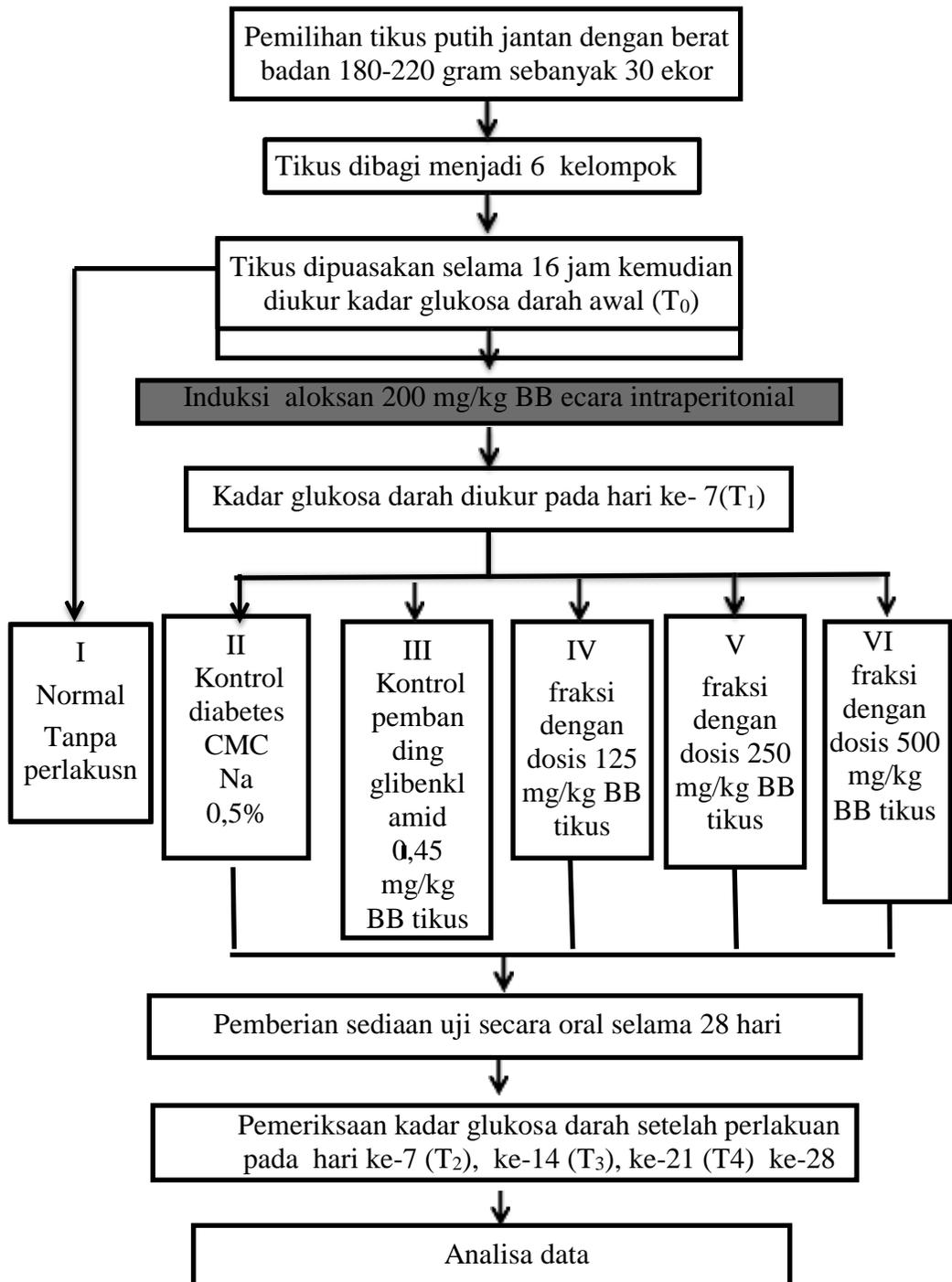
Gambar 4. Skema Pembuatan Ekstrak

F. Skema Fraksinasi



Gambar 5. Skema pembuatan fraksinasi

G. Alur Penelitian



Gambar 6. Alur Penelitian