

## **BAB III METODE PENELITIAN**

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

#### **1. Populasi**

Populasi merupakan seluruh objek yang diteliti (Notoatmodjo, 2012). Penelitian ini menetapkan tanaman iler sebagai populasi, di mana diperoleh dari kebun B2P2T2TOOT Tawangmangu.

#### **2. Sampel**

Sampel adalah bagian dari populasi, dimana memiliki kesamaan karakteristik dan bahkan terkadang jumlah (Sugiyono, 2017). Penelitian ini menetapkan daun tanaman iler yang berwarna kemerahan segar sebagai sampel yang diperoleh dari kebun B2P2T2TOOT Tawangmangu.

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Variabel**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah berbagai fraksi mulai dari fraksi polar, semi polar, dan non-polar dari ekstrak etanol daun iler. Konsentgaluri pada fraksi yang diperoleh dibuat sama.

Variabel terikat pada penelitian ini adalah aktivitas antihiperqlikemiknya dengan indikator kadar gula darah hewan uji yang dicek menggunakan alat glukometer, diambil darahnya melalui ekor.

#### **2. Definisi Operasional Variabel**

Pertama, sampel daun iler (*Plectranthus scutellariodes*) adalah daun iler yang dipetik dari pohonnya dalam keadaan segar, tidak busuk dan tidak layu, diambil dari kebun B2P2T2TOOT Tawangmangu.

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

Ketiga, ekstrak daun iler adalah daun iler yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70%.

Keempat, fraksi daun iler adalah daun iler yang sudah difraksinasi menggunakan pelarut etil asetat dan n-heksana.

Kelima, dosis ekstrak dan fraksi daun iler adalah kontraksi atau dosis ekstrak dan fraksi yang dibuat sama kemudian diberikan kepada mencit secara oral.

Keenam, hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan galur swiss yang berumur (2-3 bulan) dengan bobot (20-30 gram).

Ketujuh, glibenklamid adalah obat yang digunakan untuk menurunkan kadar glukosa darah dan juga digunakan sebagai kontrol positif dalam penelitian.

Kedelapan, fraksi efektif adalah fraksi yang optimal dalam memberikan pengaruh penurunan kadar glukosa pada darah yang setara dengan pemberian glibenklamid.

Kesembilan, target terapi adalah penurunan kadar glukosa hingga mencapai kadar normal (62,8 – 176 mg/dL) tetapi tidak sampai bawah batas kadar normal.

Kesepuluh, aktivitas antihiperglikemik adalah kemampuan suatu senyawa obat untuk menurunkan kadar gula darah namun tidak sampai menyebabkan hipoglikemik

### **C. Bahan dan Alat**

#### **1. Bahan**

Bahan penelitian antara lain : daun iler, etanol teknis 70%, senyawa aloksan, aquadest, aqua *water for injection*, glibenklamid, CMC Na, etil asetat teknis, kloroform teknis, n-heksana teknis, pereagen dragendrof, pereaksi meyer, toluene, ammonia 10%, magnesium, amin alkohol, FeCl<sub>3</sub>, gelatin 1%, kalium hidroksida 5%, eter, pereagen Lieberman-bouchardat, vanillin asam sulfat, mencit jantan galur Swiss.

#### **2. Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah glukometer, spuit 1cc, sonde, jarum ujung lancip, wadah mencit/kandang mencit, neraca analitik. Prinsip glukometer yang digunakan untuk mendeteksi kadar glukosa darah adalah pada saat darah diambil menggunakan jarum, kemudian darah ditempel dan dimasukkan ke strip tes gula darah yang telah dipasang pada glukometer secukupnya. Saat strip terhubung dengan alat glukometer, gula darah akan bereaksi dengan enzim yang terdapat pada strip, kemudian akan tercipta arus listrik yang terkoneksi dengan glukometer. Intensitas arus listrik tersebut akan setara dengan

kadar glukosa dalam darah yang terbaca sebagai bentuk angka di layar glukometer.

#### **D. Jalannya Penelitian**

##### **1. Determinasi Tanaman Iler**

Daun iler yang sudah sesuai dengan kriteria yang ditetapkan oleh peneliti diujikan untuk dilakukan determinasi di Laboraturium Biologi Universitas Setia Budi Surakarta. Proses ini dilakukan untuk memastikan secara spesifik dan mencocokkan tanaman daun iler yang digunakan dengan literatur yang menjadi pedoman.

##### **2. Pengumpulan dan Penyerbukan Daun Iler**

Daun iler yang telah dideterminasi, dilakukan pengumpulan dari kebun B2P2T2TOOT Tawangmangu, dipilih daun yan berwarna hijau segar, dilakukan sortasi basah kemudian dicuci dengan air mengalir dan diangin-anginkan supaya kering. Pencucian dilakukan untuk memastikan simplisia yang digunakan bebas pengotor-pengotor yang menempel. Setelah air ditiriskan kemudian dilakukan proses pengeringan menggunakan lemari pengering dengan suhu antara 40<sup>0</sup>C – 50<sup>0</sup>C, hal ini dilakukan agar senyawa aktif yang akan disari tidak rusak oleh pemanasan yang tinggi. Setelah daun iler kering, kemudian diserbukkan menggunakan blender dan disaring dengan ayakan nomor 40 mesh (Depkes RI., 2016).

##### **3. Kontrol Kualitas Serbuk Simplisia**

Kontrol kualitas serbuk meliputi beberapa hal, organoleptis, susut pengeringan dan berat rendemen.

**3.1 Susut pengeringan.** Susut pengeringan dilakukan dengan menimbang serbuk 1-2 gram serbuk kulit buah markisa kemudian panaskan serbuk ke dalam oven pada suhu 105 °C selama 30 menit. Timbang serbuk setelah dikeringkan ulangi Langkah tersebut hingga bobot yang diperoleh konstan (Rivai *et al.*, 2014)

**3.2 Organoleptis.** Pengujian dilakukan dengan pengamatan secara organoleptis meliputi bau, warna, galura dan tekstur dari serbuk simplisia yang telah diayak.

**3.3 Perhitungan randemen (AOAC,2005).** Rendemen merupakan produk akhir dari proses yang diukur menurut persentase berat akhir produk yang dihasilkan (bobot ekstrak kental) terhadap berat bersih bahan basah yang digunakan. Perhitungan rendemen dengan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak kental} \times 100\%}{\text{Berat Simpisia kering}}$$

#### 4. Proses Ekstraksi Daun Iler dengan Metode Maserasi

Proses ekstraksi daun iler menggunakan metode maserasi. Serbuk daun iler yang telah dilakukan pengeringan, ditimbang sejumlah 500 g dan dimasukkan ke dalam bejana kaca, kemudian diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 3750 mL selama 2x24 jam, selanjutnya dipisahkan antara filtrate dan ampas/residu. Residu ditambahkan dengan etanol 70% sebanyak 1250 mL selama 1x24 jam lalu dipisahkan antara filtrat/maserat dan residu. Hal tersebut bertujuan agar sisa ampas tidak tercampur dalam maserat, sehingga didapat maserat yang bebas dari partikel serbuk. Hasil penyarian lalu disaring dengan kain flannel lalu dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* dengan tekanan 125 mBar dan suhu 50°C (Depkes RI, 2017). Hasil proses evaporasi diperoleh ekstrak etanol daun iler dalam bentuk kental.

#### 5. Fraksinasi Ekstrak Etanol Daun Iler

Sebanyak 40 gram ekstrak etanol daun iler, ditambahkan 5 tetes etanol 70% kemudian ditambahkan aquades sebanyak 400ml (1:10), dimasukkan ke corong pisah, kemudian ditambahkan n-heksana dengan volume yang sama lalu diekstraksi. Lama ekstraksi dilakukan 10-15 menit, kemudian dibiarkan memisah menghasilkan 2 jenis larutan yang berbeda berat jenisnya. Filtrat n-heksana (nonpolar) diambil lalu diuapkan, sisa fraksi air ditambahkan pelarut etilasetat (semipolar) sebanyak tahap awal dengan perbandingan yang sama, dikocok 10-15 menit, lalu terjadi pemisahan. Hasil larutan organik diambil dan ditampung lalu diuapkan menjadi ekstrak kental. Sisa fraksi air dilakukan penguapan bersama. Hasil fraksi kental ditimbang sebagai rendemen dan dianalisis organoleptisnya.

#### 6. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Iler (Serbuk *Simplisia* dan Ekstrak)

Identifikasi senyawa kimia ekstrak daun iler dilakukan dengan pengujian skrining fitokimia menggunakan metode uji tabung. Adapun zat-zat yang diidentifikasi antara lain sebagai berikut (Widyaningrum *et al.*, 2019) :

**6.1 Uji Alkaloid.** Zat ditambah HCl 1% (10 ml) di tabung reaksi lalu dipanaskan 30 menit. Kemudian disaring, dibagi menjadi 2

bagian sama banyak. Larutan A direaksikan dengan pereaksi Dragendroff dan larutan B direaksikan dengan pereaksi Mayer. Adanya endapan di kedua larutan tersebut menandakan positif alkaloid.

**6.2 Uji Polifenol.** Zat ditambah air lalu dipanaskan 10 menit, lalu disaring selagi panas, kemudian didinginkan dan direaksikan dengan  $\text{FeCl}_3$ . Adanya polifenol ditandai dengan terbentuk warna hijau-biru.

**6.3 Uji Tannin.** Zat ditambah air dan dipanaskan selama 30 menit di atas penangas air, kemudian disaring, filtrat direaksikan dengan larutan  $\text{NaCl}$  2% (1 ml). Jika terbentuk suspensi atau endapan, disaring, dan filtrat direaksikan dengan larutan gelatin 1% (5 ml). Adanya endapan menunjukkan positif tannin atau zat samak.

**6.4 Uji Saponin.** Zat 500mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan 10 ml air panas, dinginkan, dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terdapat buih yang mantap selama 10 menit, setinggi 1 cm sampai 10 cm, lalu pada penambahan 1 tetes  $\text{HCl}$  2N buih tidak hilang maka dinyatakan positif saponin.

**6.5 Uji Flavonoid.** Sejumlah zat, dilarutkan dalam 2 ml etanol, lalu direaksikan dengan serbuk  $\text{Mg}$  dan  $\text{HCl}$  pekat sebanyak 5 tetes. Flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah atau jingga.

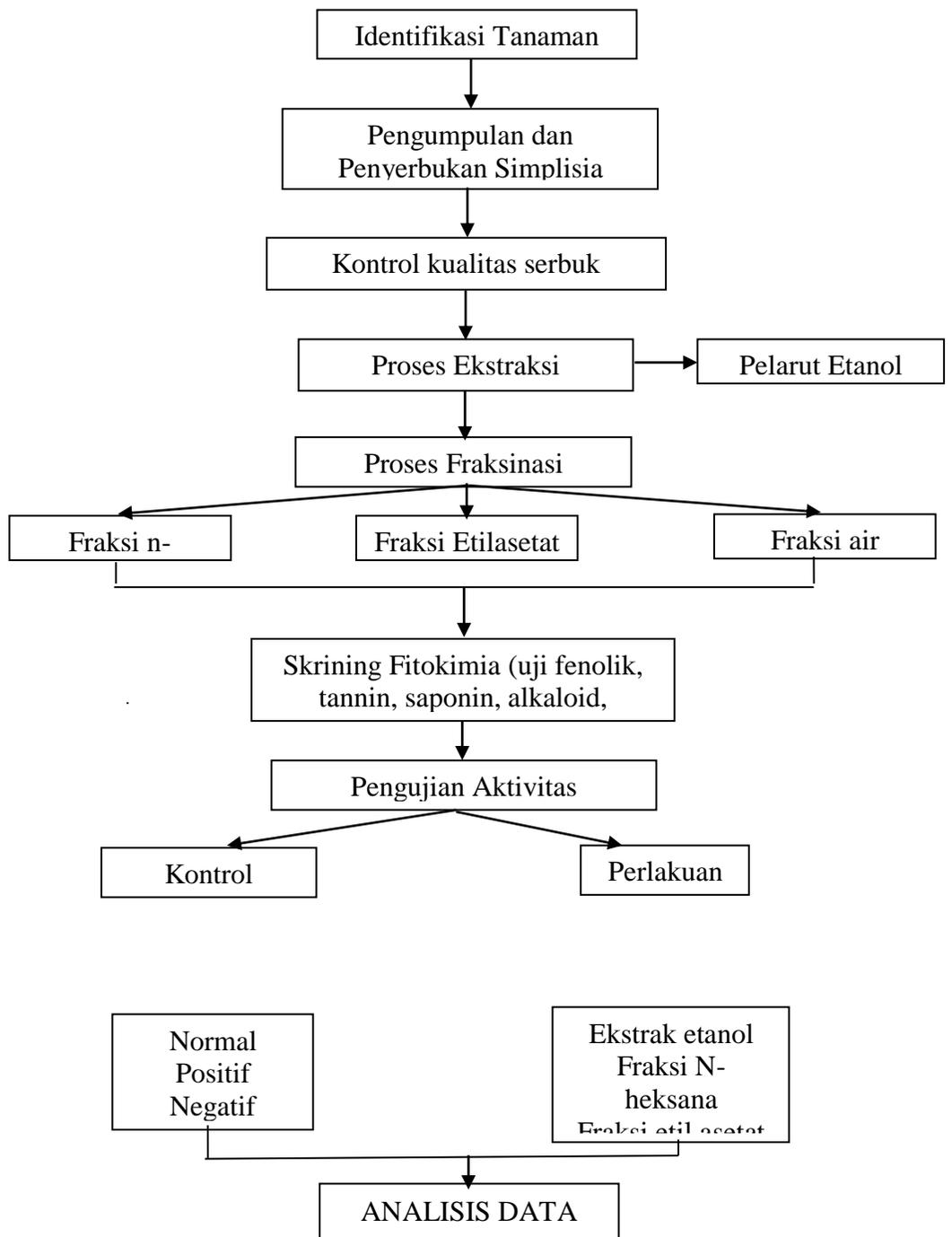
## **7. Pengujian Aktivitas Antihiperlikemik dengan Induksi Aloksan**

Langkah awal penelitian ini dengan mencit dipuaskan selama 18 jam, kemudian diukur kadar gula darahnya menggunakan alat glukometer, dan dijadikan sebagai kadar gula darah awal ( $T_0$ ). Setelah itu dilakukan induksi diabetes mellitus dengan aloksan i.p dosis 150 mg/kgBB, kecuali pada mencit kelompok kontrol normal. Setelah 2 hari, mencit menunjukkan kadar gula darah naik, lalu dikelompokkan menjadi 7 kelompok, kontrol positif, kontrol negatif, kontrol normal, fraksi n-heksanaa, fraksi etil asetat, dan fraksi etanol. Selanjutnya kelompok-kelompok tersebut diberikan sediaan peroral selama 6 hari berturut-turut:

- a. Kelompok kontrol normal (tidak diinduksi aloksan) diberikan suspensi CMC Na 1%.
- b. Kelompok kontrol negatif diberikan suspensi CMC Na 1% dengan dosis 200mg/kgBB mencit
- c. Kelompok kontrol positif diberikan glibenklamid dengan dosis 0,65mg/kgBB dalam suspensi CMC Na 1%.

- d. Kelompok uji ekstrak etanol dengan dosis 200mg/kgBB mencit dalam suspensi CMC Na 1%
- e. Kelompok uji fraksi n-heksana dengan dosis 200mg/kgBB mencit dalam suspensi CMC Na 1%
- f. Kelompok uji fraksi etil asetat dengan dosis 200mg/kgBB mencit dalam suspensi CMC Na 1%
- g. Kelompok uji fraksi air dengan dosis 200mg/kgBB mencit dalam suspensi CMC Na 1%

Pengukuran kadar gula darah dilakukan setiap hari selama 7 hari sejak pemberian sediaan, menggunakan metode pengukuran alat glukometer. Dari data kadar gula darah yang diperoleh, kemudian dihitung persentase penurunan kadar gula darah relatif masing-masing kelompok uji. Alur penelitian adalah sebagai berikut :



Gambar 3. Bagan alur penelitian

### E. Analisis Data

1. Metode pengumpulan data menurut Notoatmojo (2012), proses pengolahan data meliputi *editing* (pengecekan dan memperbaiki), *coding* (mengubah data dari kalimat menjadi angka), *entry data* (memasukkan data yang dihasilkan dalam bentuk kode dan terakhir adalah *cleaning* (kegiatan pengecekan kembali).
2. Data persentase penurunan kadar gula darah relatif diuji secara statistika menggunakan analisis *one way* ANOVA dengan bantuan SPSS, yang sebelumnya dilakukan pengujian persyaratan menggunakan uji normalitas dan homogenitas. Jika pada uji ANOVA ditemukan perbedaan bermakna, kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc* melalui uji Duncan menggunakan taraf kepercayaan 0,05 (Susilowati *et al.*, 2016).