

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1. Penyiapan Bahan

Bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun alpukat dan biji alpukat (*Persea americana* Mill). Determinasi dilakukan di Herbarium Bandung Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Daun dan biji alpukat (*Persea americana* Mill) yang di ambil tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua dalam satu pohon.

4.1.1 Pembuatan Simplisia

Daun alpukat dan biji alpukat (*Persea americana* Mill) setelah dibersihkan dari debu dan kotoran yang melekat lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di tempat yang tidak terkena matahari secara langsung agar kandungan bahan aktif tidak mudah rusak. Setelah kering daun digiling dengan mesin penggiling sehingga diperoleh serbuk.

4.1.2 Pembuatan Ekstrak

Serbuk simplisia daun dan biji alpukat (*Persea americana* Mill) tersebut diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% selama 24 jam dan diulangi sebanyak 3 kali. Ekstrak yang diperoleh kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C, hingga diperoleh ekstrak pekat. Penguapan kemudian dilanjutkan dengan menggunakan penangas air hingga diperoleh ekstrak kental, persen rendemen ekstrak dihitung dengan rumus: (Muhyini, 2004:19, Harborne, 1987 : 6-7).

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak (gr)}}{\text{bobot simplisia (gr)}} \times 100\%$$

4.1.3. Pembuatan Sediaan Uji

Ekstrak yang didapat disuspensikan dalam CMC Na 0,5 % ^{b/v} dibuat dengan cara 0,5 g CMC-Na dikembangkan dalam wadah yang berisi air suling panas sebanyak 20 ml, ditutup dan dibiarkan selama 30 menit hingga diperoleh massa yang transparan. Selanjutnya massa digerus sampai homogen dan ditambahkan akuades sampai diperoleh volume 100 ml.

Kemudian ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) dengan konsentrasi daun alpukat 100 mg/kgBB mencit, biji alpukat (*Persea americana* Mill) 315 mg/kgBB mencit, dan kombinasinya (1:1), kemudian disuspensikan dengan CMC Na 0,5 % ^{b/v}. Sediaan perbandingan dibuat dengan cara menggerus tablet yang mengandung glibenklamid dan ditimbang sesuai yang dibutuhkan kemudian disuspensikan dengan CMC Na 0,5 % ^{b/v}.

4.2 Standarisasi Bahan Uji

Standarisasi bahan uji meliputi penetapan kadar air dan penapisan fitokimia.

4.2.1 Penetapan Kadar Air

Pengukuran kadar air dilakukan dengan metode azeotrop. Metode azeotrop ini dapat mengukur secara langsung kadar air dari bahan uji. Tabung penerima dan pendingin dibilas dengan air. 25 g serbuk daun alpukat dan biji alpukat dimasukkan ke dalam labu bundar yang berisi lebih kurang toluena yang telah dijenuhkan dengan aquades, dihubungkan ke alat. Toluena dituangkan ke dalam tabung penerima melalui alat pendingin. Setelah toluena mulai mendidih, dilakukan penyulingan dengan kecepatan 2 tetesan per detik, hingga sebagian air

sudah tersuling, kemudian kecepatan penyulingan dinaikkan hingga 4 tetes tiap detik hingga semua air tersuling. Setelah itu bagian dalam pendingin dicuci dengan toluene, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Kemudian tabung penerima pendingin dibiarkan pada suhu kamar. Jika terdapat tetesan air melekat pada tabung penerima, maka perlu di gosok dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluene hingga tetesan air turun. Setelah air dan toluene memisah sempurna, volume air dalam tabung penerima dibaca, lalu kadar air dihitung dalam persen (WHO, 2011:35).

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{mL Air} \times \text{bj Air (g/mL)}}{\text{gram simplisia}} \times 100\%$$

4.2.2 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat pada simplisia dan ekstrak daun alpukat dan biji alpukat dengan metode dan prosedur di bawah ini:

a) Senyawa polifenolat

Satu spatel simplisia serbuk di tempatkan pada tabung reaksi, lalu ditambahkan air secukupnya, dan dipanaskan diatas penangas air kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan larutan pereaksi besi (III) klorida, apabila timbul warna hijau atau biru hijau, merah ungu, biru hitam menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat (Farnsworth, 1996: 265-266).

b) Flavonoid

Bahan digerus dalam mortir dengan sedikit air, kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi logam magnesium atau seng dan larutan HCl 2 N. Seluruh campuran dipanaskan 5-10 menit. Setelah disaring panas-panas dan filtrat dibiarkan dingin, kepada filtrat ditambahkan amil alkohol, lalu dikocok kuat-kuat. Adanya warna kuning hingga merah pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Farnsworth 1996: 262-264)

c) Tanin dan polifenol

Bahan digerus dengan air hingga lumat, kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan dididihkan selama beberapa menit. Setelah disaring, filtrat dibagi dua bagian. Ke dalam filtrat satu ditetaskan larutan pereaksi besi (III) klorida. Adanya warna biru hingga hitam menunjukkan adanya senyawa golongan tanin dan polifenol. Kedalam filtrat dua ditetaskan larutan gelatin, lalu diamati terjadinya pengendapan atau penggumpalan. Adanya penggumpalan menunjukkan bahwa dalam filtrat terkandung senyawa golongan tanin. Endapan gelatin disaring. Filtrat ditetesi larutan pereaksi besi (III) klorida. Bila terbentuk warna hitam, berarti bahwa dalam bahan tersebut terkandung golongan tanin dan polifenol (Farnsworth, 1996 : 264).

d) Kuinon

Bahan digerus dengan air. Saring melalui kapas. Kepada filtrat ditetaskan larutan basa kuat (NaOH atau KOH). Terjadinya warna merah menunjukkan bahwa dalam simplisia atau bahan yang diuji terdapat senyawa golongan kuinon (Farnsworth, 1996: 265-266).

e) Monoterpen dan sesquiterpen

Tiga spatel simplisia serbuk digerus dengan eter kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, kemudian ditambahkan larutan vanilin 10% dalam asam sulfat pekat dan apabila timbul warna-warna menandakan positif senyawa monoterpen dan sesquiterpen (Farnsworth, 1996: 265-266).

f) Triterpenoid dan steroid

Tiga spatel simplisia serbuk digerus dengan eter kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, kemudian ditambahkan larutan pereaksi Libermann Burchard dan apabila timbul warna merah ungu menandakan positif triterpenoid, sedangkan apabila timbul warna hijau biru menandakan positif steroid (Farnsworth, 1996 : 266-267).

g) Saponin

Bahan digerus dengan air hingga lumat, kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan lagi sedikit air dan dipanaskan. Setelah dingin, tabung dikocok kuat-kuat selama beberapa menit. Pembentukan buih atau busa diamati. Bila terjadi pembentukan buih atau busa setinggi minimal 1 cm dan bertahan selama 5-10 menit serta tidak menghilang dengan penambahan 1 tetes HCL 0,1 N, berarti bahwa bahan yang diuji mengandung saponin (Farnsworth, 1996 : 257-260).

h) Alkaloid

Bahan ditempatkan pada mortir, dibasakan dengan ammonia, kemudian ditambahkan kloroform, lalu digerus kuat. Cairan (kloroform) dipipet melalui kapas. Filtrat ditempatkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan larutan HCl 1 N, campuran dikocok, lalu dibiarkan hingga terjadi pemisahan fase. Fase air diambil, dibagi tiga bagian, masing-masing ditempatkan dalam tabung reaksi terpisah. Kedalam filtrat satu diteteskan larutan pereaksi Dragendorff. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan atau kekeruhan berwarna jingga coklat. Ke dalam filtrat dua diteteskan larutan pereaksi Mayer. Adanya endapan atau kekeruhan berwarna putih menunjukkan adanya senyawa kimia golongan alkaloid. Filtrat tiga digunakan sebagai blanko atau kontrol negatif (Farnsworth, 1996: 245-257).

4.3. Pengujian antihiperglikemia

Sebelumnya dilakukan aklimasi hewan uji selama 1 minggu, digunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*) jantan galur Swiss Webster berumur \pm 8 minggu, berat antara 25-30 g, sehat, bulu tidak kusam, peka terhadap rangsangan sekitar, gesit, dan diperhatikan pula keseragaman hewan coba. Hewan dipelihara selama jangka waktu tertentu (1 minggu). Kemudian selalu diamati kondisinya melalui penimbangan berat badan. Hewan coba mencit dipuaskan selama 18 jam sebelum dilakukan penelitian dan hanya diberi air minum saja.

Mencit dikelompokkan menjadi 6 kelompok secara acak dan tiap kelompok terdiri atas 5 ekor mencit. Mencit ditimbang beratnya dan satu jam sebelum percobaan dimulai mencit dipuaskan. Pengujian antihiperglikemia menggunakan

metode induksi aloksan monohidrat dosis 70 mg/kgBB diberikan secara intravena melalui ekor mencit. Induksi aloksan monohidrat dilakukan selama 3 hari berturut-turut setelah itu dipilih mencit yang memenuhi kriteria inklusi yaitu kadar glukosa darah >140 mg/dL kemudian diberikan perlakuan sesuai kelompok. Kelompok I (kontrol negatif) tidak diberi perlakuan apapun hanya diberikan air aquades, kelompok II (kontrol positif) yaitu mencit yang diinduksi aloksan dosis 70 mg/kgBB dan diberi suspensi CMC-Na 0,5%, kelompok III diberi induksi aloksan dosis 70 mg/kgBB dan ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill) dosis 100 mg/kgBB, kelompok IV diberi induksi aloksan dosis 70 mg/kgBB dan ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill) dosis 315 mg/kgBB , kelompok V diberi induksi aloksan dosis 70 mg/kgBB dan diberi ekstrak etanol daun dan biji alpukat (*Persea americana* Mill) dosis (½:½) 50 mg/kgBB : 157,5 mg/kgBB, kelompok VI diberi induksi aloksan dosis 70 mg/kgBB dan pembanding yaitu glibenklamid dosis 0,013 mg/kgBB. Pemberian sediaan uji diberikan secara peroral 1 hari sekali selama 7 hari.

Pada metode induksi aloksan setiap pengambilan darah mencit harus dipuasakan terlebih dahulu. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan sebelum induksi (t0) dan 3 hari, dan 7 hari setelah induksi aloksan monohidrat (t3) dan (t7) setelah pemberian perlakuan sediaan uji pada hari ke 14 hari (t14). Pengukuran kadar glukosa darah dengan cara melukai ekor mencit kemudian darahnya dimasukan pada alat glukometer sehingga terjadi reaksi enzimatik dan dapat diperoleh langsung kadar glukosa darah.

4.4. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan t-dependent, Anova dilanjut Tukey dan Anova dilanjut dengan uji Dunnet dengan selang kepercayaan 0,05 %.

