

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1. Pengumpulan Tanaman Uji dan Determinasi Tanaman

Tanaman uji yang digunakan adalah daun kentut (*Paederia foetida* L.) yang diperoleh dari dua tempat yang berbeda berdasarkan perbedaan tempat tumbuh daun yaitu di Kecamatan Banjaran Kabupaten Bandung dengan ketinggian 600 – 700 m dpl dan di Kecamatan Cikelet Kabupaten Garut dengan ketinggian 100 m dpl.

Sebelum dilakukan proses penelitian, daun kentut (*Paederia foetida* L.) yang diperoleh dideterminasi terlebih dahulu di (SITH) Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati di Institut Teknologi Bandung (ITB), untuk memastikan kebenaran tanaman tersebut.

4.2. Pembuatan Simplisia Uji

Untuk proses pembuatan simplisia uji bagian yang digunakan adalah daun kentut yang berwarna hijau serta ukuran daun yang besar dan yang kecil, kemudian dibersihkan dari kotoran seperti tanah, kerikil ataupun pengotor lainnya menggunakan air bersih. Setelah itu dilakukan proses pengeringan, menggunakan alat pengering buatan, agar kadar air dalam simplisia kurang dari 10%, tandanya simplisia sudah kering adalah mudah patah atau mudah untuk diremas. Daun kentut yang sudah kering, dirajang dengan menggunakan blender dan diayak menggunakan mesh 60. sehingga diperoleh serbuk dan ditimbang. Serbuk yang

diperoleh dikumpulkan dan disimpan dalam wadah tertutup rapat serta tidak boleh terkena sinar matahari secara langsung. Penyimpanannya harus teratur dan rapih serta simplisia yang disimpan harus diberi label yang mencantumkan identitas dan jumlah simplisia (Depkes RI, 1979:XXXIV; dan Kurnia, 2011:4-5).

4.3. Pembuatan Ekstrak Uji

Pembuatan ekstrak uji daun kentut dilakukan dengan metode maserasi. Cara pembuatannya dengan menimbang 300 gram daun kentut yang telah halus, kemudian di masukan ke dalam alat maserator dan di tambahkan pelarut 900 ml etanol 96%, kemudian di tutup dengan rapat bagian bawah maserator dan di diamkan selama 24 jam pada suhu kamar, setelah 24 jam pertama pelarut dikeluarkan dan diganti dengan pelarut yang baru. Ekstraksi dilakukan selama 3 x 24 jam. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan *vacum rotary evaporator*. Ekstrak hasil pemekatan kemudian diuapkan dengan cawan penguap di atas waterbath sampai diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 2000:10-11; dan Harbone, 1987: 6).

4.4. Penetapan Karakteristik Awal Simplisia

Penetapan karakteristik awal simplisia meliputi parameter spesifik, parameter non spesifik.

4.4.1. Parameter spesifik

Parameter spesifik meliputi organoleptik, penetapan kadar sari larut air dan penetapan kadar sari larut etanol.

a. Organoleptik

Parameter organoleptik simplisia meliputi rasa, bau, warna dan bentuk (Depkes RI, 2000:31).

b. Penetapan kadar sari larut air

5 gram serbuk simplisia yang telah dikeringkan, kemudian dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml air dan ditambahkan 25 ml kloroform menggunakan labu bersumbat sambil diaduk sesekali dan dikocok pada 6 jam pertama, kemudian biarkan selama 18 jam dan disaring. Ambil 20 ml filtrat, kemudian diuapkan sampai kering dalam cawan dan sisanya dipanaskan pada suhu 105⁰C sampai bobot nya tetap (Depkes RI, 2000:31). Kadar sari larut air dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{berat cawan+simplisia}-\text{berat cawan kosong}}{\text{berat simplisia}} \times \frac{100\text{ml}}{20\text{ml}} \times 100 \% \quad (1)$$

c. Penetapan kadar sari larut etanol

5 gram serbuk simplisia yang telah dikeringkan kemudian dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol (96%) menggunakan labu bersumbat sambil diaduk sesekali dan dikocok pada 6 jam pertama, kemudian biarkan selama 18 jam dan disaring dengan cepat. Ambil 25 ml filtrat, kemudian diuapkan sampai kering dalam cawan dan sisanya dipanaskan pada suhu 105⁰C sampai bobot nya tetap (Depkes RI, 2000:31). Kadar sari larut etanol dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{berat cawan+simplisia}-\text{berat cawan kosong}}{\text{berat simplisia}} \times \frac{100\text{ml}}{20\text{ml}} \times 100 \% \quad (2)$$

4.4.2. Parameter non spesifik

Parameter non spesifik simplisia uji meliputi susut pengeringan, kadar air, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam

a. Susut pengeringan

Mengatur oven pada suhu 105⁰C, kemudian dipanaskan menggunakan cawan penguap pada suhu pemanasan selama 30 menit. Timbang 1-2 gram simplisia, di dalam cawan penguap yang sudah ditara kemudian diratakan permukaan ekstraknya. Pengeringan dilakukan pada suhu 105⁰C selama 10 menit, dan dimasukkan kedalam desikator hingga suhu dingin dan ditimbang. Percobaan dilakukan secara duplo, perbedaannya tidak kurang dari 0,25% (Depkes RI, 2000:13). Susut pengeringan dihitung dengan rumus :

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{berat cawan sesudah dipanasin} - \text{berat cawan akhir}}{\text{berat simplisia}} \times 100 \% \quad (3)$$

b. Kadar air

Menggunakan metode azeotrof yaitu dengan membilas terlebih dahulu tabung penampung dan kondensor dengan air kemudian dikeringkan dan dimasukkan kedalam lemari pendingin dan dilakukan proses penjuenan toluena dengan memasukan 200 ml toluen dan 2 ml air dimasukkan ke dalam labu destilasi dan dididihkan selama 2 jam. Kemudian ditambahkan 20 gram simplisia ke dalam labu destilasi yang telah berisi toluen yang sudah dijenuhkan dan jika perlu batu didih dimasukkan ke dalam labu destilasi untuk mempercepat proses pemanasan. Jika telah mendidih kecepatan penyulingan diatur 2 tetes/detik hingga sebagian besar air tersuling, kemudian kecepatan dinaikan menjadi 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam kondensor dibilas menggunakan toluena dan destilasi dilanjutkan selama 5 menit kemudian proses pemanasan dihentikan. Setelah itu tabung penerima didinginkan pada suhu kamar dan diusahakan tidak ada tetesan air yang menempel pada dinding tabung penerima.

Kemudian air dan toluena dibiarkan memisah pada tabung penerima dan di catat berapa volume air yang terukur dan menghitung berapa banyak kadar air dalam persen (%) (Depkes RI, 2000 : 16). Kadar air dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{n(\text{ml}) - n_1(\text{ml})}{g \text{ simplisia}} \times 100\% \quad (4)$$

c. Kadar abu total

Penetapan kadar abu total dilakukan dengan cara menimbang terlebih dahulu kurang lebih 2-3 gram simplisia, kemudian dimasukkan kedalam krus silikat yang telah dipijar dan ditara. Krus silikat yang berisi ekstrak, dipijarkan secara perlahan sampai terbentuk arang dan lama kelamaan akan habis, kemudian didinginkan dan ditimbang. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 2000:17). Kadar abu dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar abu total (\%)} = \frac{(\text{berat abu} + \text{krus akhir}) - \text{krus kosong}}{g \text{ simplisia}} \times 100\% \quad (5)$$

d. Kadar abu tidak larut asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu dipanaskan dengan 25 ml asam sulfat encer P selama 5 menit, bagian yang tidak larut asam dikumpulkan kemudian disaring menggunakan kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas kemudian dipijarkan hingga bobot konstan dan ditimbang (Depkes RI, 2000:17)

$$\text{kadar abu tidak larut asam (\%)} = \frac{(\text{berat abu} + \text{krus akhir}) - \text{krus kosong}}{g \text{ simplisia}} \times 100\% \quad (6)$$

4.5. Penetapan Karakteristik Awal Ekstrak Uji

Penetapan karakteristik awal ekstrak uji meliputi parameter spesifik dan parameter non spesifik.

4.5.1. Parameter spesifik

Parameter spesifik ekstrak uji yaitu organoleptik meliputi rasa, bau, warna dan bentuk (Depkes RI, 2000:31).

4.5.2. Parameter non spesifik

Parameter non spesifik ekstrak uji yaitu bobot jenis. Ekstrak cair yang bersuhu kurang lebih 20°C, kemudian masukan ke dalam piknometer yang telah dikalibrasi dan telah ditetapkan bobotnya. Piknometer yang telah diisi ekstrak cair ditimbang dan bobot yang diperoleh dikurangi dengan bobot piknometer kosong. Bobot jenis ekstrak cair adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air, dalam piknometer pada suhu 25°C (Depkes RI, 2000:13). Bobot jenis dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Bobot jenis} = \frac{W3 - W1}{W2 - W1} \times 100\% \quad (7)$$

4.6. Penapisan fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap ekstrak dan simplisia uji tujuannya untuk menentukan golongan senyawa meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, kuinon, monoterpen dan sesquiterpen, triterpenoid dan steroid, polifenolat.

4.6.1. Alkaloid

Sejumlah serbuk simplisia, ditambahkan dengan amonia 25% dan digerus menggunakan mortar. Kemudian ditambahkan kloroform dan digerus dengan kuat. Campuran tersebut disaring dan filtrat digunakan untuk percobaan (Larutan A). Larutan A ditetaskan pada kertas saring dan diberi pereaksi Dragendroff. Warna jingga yang timbul pada kertas saring menunjukkan positif alkaloid. Sisa

larutan A diekstraksi dua kali dengan HCl 10% lalu lapisan air atau fraksi asamnya dipisahkan (Larutan B), Masing-masing 5 ml larutan B dalam tabung reaksi diberi pereaksi Mayer dan pereaksi Dragendroff. Hasil positif ditunjukkan bila endapan putih yang terbentuk bertahan selama 15 menit pada pereaksi Mayer dan hasil positif ditunjukkan bila terbentuk endapan merah bata yang bertahan selama 15 menit pada pereaksi Dragendroff (Farnsworth, 1966:245).

4.6.2. Flavonoid

Menimbang 1 gram serbuk simplisia, kemudian ditambahkan 100 ml air panas, dididihkan selama 15 menit dan disaring. Filtrat yang diperoleh (Larutan C) diambil sebanyak 5 ml, kemudian tambahkan serbuk Mg, 1ml asam klorida P dan amil alkohol, setelah bercampur, dikocok dengan kuat agar terjadi pemisahan. Jika terbentuk warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan positif golongan flavonoid (Farnsworth, 1966:262).

4.6.3. Saponin

Larutan C yang telah dibuat, diambil sebanyak 10 ml dan masukan kedalam tabung reaksi. Kemudian dikocok secara vertikal selama 10 menit. Pembentukan busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit, menunjukkan positif mengandung saponin. Dan jika ditambahkan 1 tetes HCL 2N, busa tidak akan hilang (Farnsworth, 1966:257).

4.6.4. Tanin

Menyiapkan 15 ml larutan C, kemudian dibagi menjadi 3 bagian dan dimasukan kedalam tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan FeCl_3 , jika terbentuk warna hijau, violet atau hitam maka positif golongan tanin. Tabung

kedua ditambahkan gelatin 1 %, jika terbentuk endapan maka positif golongan tanin. Tabung ketiga ditambahkan pereaksi steasny, kemudian dipanaskan diatas penangas air, jika terbentuk endapan merah muda maka positif tanin katekat (Farnsworth, 1966:264).

4.6.5. Kuinon

Sebanyak 1 gram serbuk simplisia (*Paederia foetida* L.) dimasukan ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 100 ml air panas, kemudian didihkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat ditambahkan larutan NaOH 5%. Jika terbentuk warna jingga menunjukkan positif mengandung kuinon (Farnsworth, 1966:265).

4.6.6. Monoterpen dan sesquiterpen

Mengambil sejumlah serbuk simplisia, kemudian digerus dan disaring. Setelah itu diuapkan sampai kering dan ditambahkan vanilin dalam HCL p, jika terjadi pembentukan warna maka positif monoterpenoid dan sesquiterpen.

4.6.7. Triterpenoid dan steroid

Mengambil sejumlah gram simplisia, kemudian digerus dengan eter dan disaring. Filtrat yang diperoleh, dikeringkan dan ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Jika terbentuk warna hijau atau biru menunjukkan adanya steroid sedangkan warna merah atau ungu menunjukkan triterpenoid (Farnsworth, 1966:268).

4.6.8. Polifenolat

Simplisia dan ekstrak uji ditempatkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan air secukupnya. Dipanaskan diatas penangas air dan disaring. Larutan pereaksi besi (III) klorida ditambahkan ke dalam filtrat dan timbulnya

warna hijau atau biru-hijau, merah ungu, biru hitam hingga hitam menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat (Farnsworth, 1966 : 225).

4.7. Pembuatan Sediaan Uji

Pembuatan sediaan uji meliputi pembuatan suspensi uji ekstrak daun kentut dan pembuatan suspensi pembanding.

4.7.1. Pembuatan suspensi uji ekstrak daun kentut

Ekstrak kental daun kentut yang diperoleh kemudian dibuat suspensi. Cara pembuatannya dengan penambahan CMC-Na 0,5%. Suspensi dibuat dengan konsentrasi tertentu untuk mencapai dosis 70mg/20g BB mencit dan 35mg/20g BB mencit.

4.7.2. Pembuatan suspensi pembanding

Dalam penelitian ini menggunakan sitagliptin sebagai pembanding. Cara pembuatannya dengan menimbang tablet sitagliptin yang telah digerus yang setara dengan 0,13 mg/20g BB mencit ditambahkan suspensi CMC Na 0,5% kemudian diaduk hingga homogen.

4.8. Orientasi Induksi Glukosa

Orientasi induksi glukosa dilakukan untuk memastikan induksi yang digunakan berhasil. Sebelum dilakukan penelitian, terlebih dahulu dilakukan uji orientasi induksi glukosa terhadap mencit dengan dosis 195mg/20g BB mencit yang merupakan hasil konversi dari manusia ke hewan uji pada metode Tes Toleransi Glukosa Oral (TTGO) dengan standar WHO menggunakan beban

glukosa yang setara dengan 75 gram glukosa anhidrus yang dilarutkan ke dalam air (PERKENI, 2011:7).

4.9. Penyiapan Hewan Uji

Pada penelitian ini digunakan 35 ekor mencit, sebelum dilakukan pengujian, mencit diadaptasi selama 7 hari untuk penyesuaian diri terhadap lingkungan, selama adaptasi diberi makan dan minum secara normal. Kemudian 35 ekor mencit dibagi secara acak dalam 7 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok pembanding dan 4 kelompok uji yaitu diberi suspensi ekstrak daun kentut dari Banjaran dan Cikelet masing-masing diberi dosis 70mg/20g BB mencit dan 35mg/20g BB mencit.

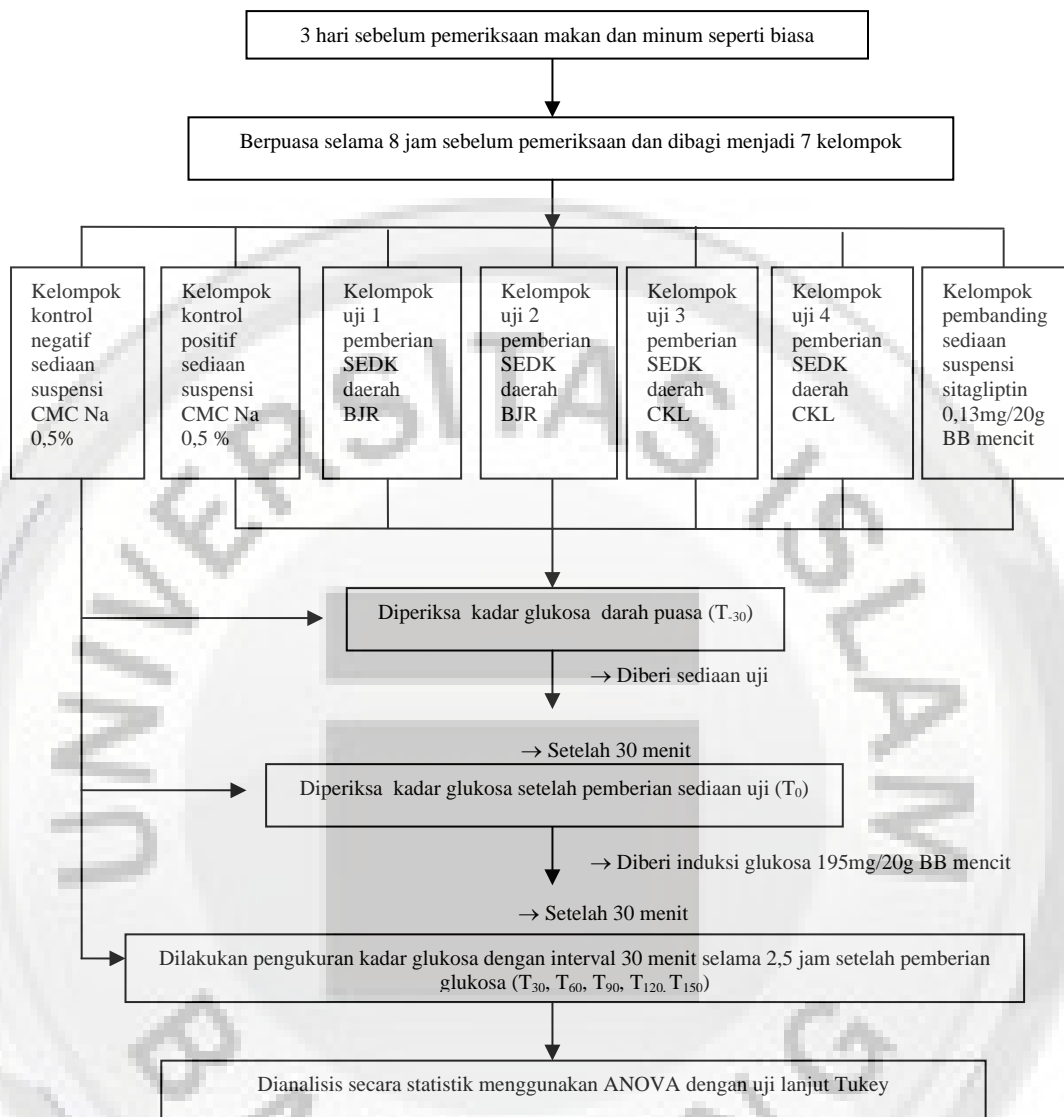
4.10. Pengujian Efek Hipoglikemik

Pengujian efek hipoglikemik menggunakan metode Tes Toleransi Glukosa Oral (TTGO). Pengujiannya dilakukan setelah semua mencit diadaptasi selama 7 hari, kemudian dipuasakan selama 8 jam sebelum pemeriksaan, diperiksa kadar glukosa darah puasa (T_{-30}). Sebelum dilakukan proses pengambilan darah, hewan uji yang akan digunakan terlebih dahulu ditimbang, dan diberi tanda pengenal. Setelah itu semua mencit diberikan secara oral untuk kelompok uji masing-masing diberi suspensi ekstrak daun kentut yaitu di Banjaran dan di Cikelet, masing-masing diberi dua sediaan dosis uji yaitu 70mg/20g BB mencit dan 35mg/20g BB mencit. Untuk kelompok pembanding diberi suspensi sitagliptin dengan dosis 0,13mg/20g BB mencit, kelompok kontrol positif dan negatif diberi

sediaan suspensi CMC Na 0,5%. Setelah 30 menit, semua mencit diperiksa kadar glukosa darah sesudah pemberian sediaan (T_0). Selanjutnya, diinduksi dengan glukosa sebesar 195mg/20g BB mencit kecuali kelompok kontrol negatif dan dilakukan pengukuran kadar glukosa darah mencit pada menit ke 30, 60, 90, 120,150 setelah pemberian glukosa. Semua sampel darah diperoleh dengan cara memotong ekor mencit dan kadar glukosa darah diukur dengan glukometer (PERKENI, 2011:8; dan Wong, dkk., 2009:348).

4.11. Analisis Data

Data yang diperoleh, dianalisis secara statistik menggunakan metode ANOVA dan uji lanjut Tukey HSD. ANOVA merupakan metode statistik parametrik yang digunakan untuk menganalisis sejumlah sampel dengan jumlah rata-rata yang sama atau berbeda tiap kelompok (Wahyono, 2010:171). Dan dilanjutkan dengan uji Tukey HSD untuk melihat kebermaknaan glukosa darah antar kelompok. Sehingga dapat melihat signifikansi perbedaan kadar glukosa darah tiap kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok pembanding dan kelompok uji (Wahyono, 2010:18).



Gambar IV. 1 Skema Pengujian Kadar Glukosa Darah Mencit

Keterangan :

SEDK = Suspensi Ekstrak Daun Kentut

CKL = Cikelet

BJR = Banjaran

Uji 1 dan uji 3 dosis (70mg/20g BB mencit)

Uji 2 dan uji 4 dosis (35mg/20g BB mencit)