

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1. Penyiapan Bahan dan Determinasi

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dan buah okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) yang diperoleh dari Kota Singkawang, Kalimantan Barat. Determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung (ITB), untuk memastikan identitas tanaman yang digunakan. Simplisia atau bahan yang digunakan adalah berupa daun dan buah segar.

4.2. Pembuatan Ekstrak Daun dan Buah Okra

Ekstrak etanol 70% dari daun dan buah okra dibuat dengan metode maserasi, yakni merendam masing-masing simplisia uji dengan etanol 70% hingga simplisia terendam. Maserasi dilakukan selama 3× 24 jam sambil sesekali diaduk. Maserat yang diperoleh dipisahkan menggunakan kertas saring. Tiap 24 jam dilakukan penampungan maserat dan penggantian pelarut baru. Semua maserat yang diperoleh dikumpulkan. Maserat kemudian diuapkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C (BPOM, 2004), lalu dipekatkan kembali diatas *water bath* dengan suhu 37°C hingga diperoleh ekstrak kental dari daun dan buah okra.

4.3. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap simplisia daun uji yaitu simplisia daun dan buah okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) untuk mengetahui adanya golongan senyawa alkaloid, polifenolat, flavonoid, saponin, tanin, kuinon, steroid dan triterpenoid yang terkandung di dalam simplisia tersebut.

4.3.1. Alkaloid

Sejumlah simplisia daun dan buah segar masing-masing ditambahkan dengan amonia 25%, ditambah 20 mL kloroform dan digerus kuat. Campuran disaring dan filtrat digunakan untuk percobaan (larutan A). Larutan A ditetaskan pada kertas saring dan diberi pereaksi Dragendorff. Warna jingga yang timbul pada kertas saring menunjukkan alkaloid positif. Sisa larutan A dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan dengan asam klorida 10% lalu lapisan air atau fraksi asamnya dipisahkan (larutan B). Masing-masing 5 mL larutan B dalam tabung reaksi diuji dengan pereaksi Mayer, hasil positif bila endapan putih yang terbentuk bertahan selama 15 menit dan hasil positif pada uji dengan pereaksi Dragendorff bila terbentuk endapan merah bata yang bertahan selama 15 menit (Farnsworth, 1966: 253).

4.3.2. Polifenolat

Simplisia segar daun dan buah okra ditempatkan dalam tabung reaksi yang berbeda, ditambahkan air secukupnya, lalu dipanaskan di atas 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).

4.3.3. Flavonoid

Sejumlah simplisia segar dari daun dan buah uji masing-masing ditambahkan dengan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan serbuk magnesium, asam klorida 2 N dan amil alkohol, dan dikocok kuat-kuat dan kemudian dibiarkan memisah. Terbentuknya warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya flavonoid (Farnsworth, 1966: 263).

4.3.4. Tanin

Sejumlah simplisia segar daun dan buah uji ditempatkan pada tabung reaksi dan ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi dua. Pertama, filtrat ditambahkan dengan FeCl_3 akan terbentuk warna hijau, violet, atau hitam (tanin positif). Kedua, filtrat ditambahkan dengan gelatin 1% terbentuk endapan maka tanin positif (Farnsworth, 1966: 264).

4.3.5. Saponin

Sejumlah simplisia segar dari daun dan buah uji masing-masing ditambahkan dengan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat dalam tabung reaksi dikocok vertikal selama 10 detik,

kemudian dibiarkan selama 10 menit. Terbentuknya busa selama kurang lebih 10 menit dengan ketinggian 1-10 cm maka saponin positif. Busa ditambah dengan asam klorida 2 N beberapa tetes, apabila busa hilang maka saponin negatif sedangkan jika busa tidak hilang maka saponin positif (Farnsworth, 1966: 256).

4.3.6. Kuinon

Sejumlah simplisia segar dari daun dan buah uji ditempatkan pada tabung reaksi dan ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan larutan NaOH 5% apabila membentuk warna jingga menandakan positif kuinon (Farnsworth, 1966:265).

4.3.7. Monoterpen dan Sesquiterpen

Sejumlah simplisia segar atau ekstrak digerus dengan eter, kemudian dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, ditambahkan larutan vanillin 10% dalam asam sulfat pekat. Warna-warna yang timbul menandakan positif senyawa monoterpen dan sesquiterpen (JFI, 2014: 21).

4.3.8. Triterpen dan Steroid

Sejumlah simplisia segar daun dan buah uji digerus dengan eter, lalu dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, lalu ditambahkan larutan pereaksi Liebermann Burchard. Warna ungu yang timbul menandakan positif

triterpenoid, sedangkan bila warna hijau biru yang timbul menunjukkan positif steroid (Farnsworth, 1966: 259).

4.4. Parameter Non Spesifik

Parameter non spesifik meliputi kadar abu dan kadar abu yang tidak larut dalam asam dan bobot jenis (Dirjen POM, 2000:13-24).

4.4.1. Parameter Kadar Abu

Sejumlah 2 g simplisia yang telah halus dimasukkan ke dalam krus silikat, kemudian dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis. Waktu pemijaran selama 8 jam dan suhu yang digunakan 600 – 700 °C. Abu didinginkan, ditimbang dan kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Dirjen POM, 2000:17).

$$\%Kadar = \frac{\text{berat abu}}{\text{berat sampel}} \times 100 \%$$

4.4.2. Parameter Kadar Abu yang Tidak Larut Dalam Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu, dididihkan dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, saring melalui kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dipijarkan hingga bobot tetap dan ditimbang. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Dirjen POM, 2000:17).

$$\%Kadar = \frac{\text{berat abu}}{\text{berat sampel}} \times 100 \%$$

4.5. Pembuatan Sediaan

4.5.1. Pembuatan Sediaan Suspensi Uji Ekstrak Daun dan Buah Okra

Suspensi uji yang digunakan dalam penelitian terdiri dari tiga macam, yaitu suspensi ekstrak daun, buah dan kombinasi ekstrak okra dengan dosis 1,12 g/Kg BB mencit. Dosis yang diperoleh mengacu dari konversi dosis pada penelitian Uraku (2011), yaitu pada dosis 800 mg/Kg BB tikus. Ketiga jenis ekstrak yang digunakan diberikan secara per oral dengan volume pemberian 0,5 mL/20 g bb mencit.

4.5.2. Pembuatan Suspensi Pembanding

Dalam penelitian ini suspensi pembanding menggunakan metformin. Cara pembuatannya dengan menimbang tablet metformin yang setara dengan metformin 65 mg/Kg BB mencit ditambahkan suspensi PGA 3% sampai 0,5 ml sambil diaduk hingga homogen.

4.6. Orientasi Induksi Glukosa

Sebelum penelitian, dilakukan uji orientasi induksi oleh glukosa terhadap 3 ekor mencit. Uji orientasi induksi glukosa ini dilakukan untuk melihat signifikansi kenaikan kadar glukosa darah 30 menit setelah pemberian glukosa. Dosis glukosa yang akan digunakan pada orientasi adalah 9,75 g/Kg BB mencit. Dosis ini merupakan hasil konversi dari manusia ke hewan uji mencit pada TTGO (Tes Toleransi Glukosa Oral) dengan standart WHO menggunakan beban glukosa

yang setara dengan 75 g glukosa anhidrus yang dilarutkan ke dalam air (dapat dilihat pada **tabel I.3**) (Perkeni, 2011: 6).

4.7. Pengujian Efek Antidiabetika

Selanjutnya dilakukan penentuan kadar glukosa darah dengan menggunakan metode toleransi glukosa oral. Pengujian ini menggunakan mencit jantan swiss webster yang dikelompokkan secara acak dan masing-masing mempunyai bobot badan rata-rata adalah 23-33 g. Semua mencit dipuaskan dahulu selama 8-16 jam, kemudian masing-masing mencit diukur kadar glukosa darah puasanya dengan alat test glukosa darah. Segera setelah dihitung kadar glukosa darah puasanya, kemudian tiap kelompok mendapat perlakuan sebagai berikut :

- a. Kelompok 1 kontrol negatif, mencit tidak diberi perlakuan apapun;
- b. Kelompok 2 kontrol positif, mencit diberi larutan glukosa 9,75 g/Kg BB mencit;
- c. Kelompok uji 3 yang diberikan ekstrak etanol daun okra dengan dosis 1,12 g/Kg BB mencit;
- d. Kelompok uji 4 yang diberikan ekstrak etanol buah okra dengan dosis 1,12 g/Kg BB mencit;
- e. Kelompok uji 5 yang diberikan kombinasi ekstrak etanol daun dan buah okra (1/2+1/2) dengan dosis 1,12 g/Kg BB mencit;
- f. Kelompok 6 pembanding yang diberikan suspensi metformin dengan dosis 65 mg/Kg BB mencit.

4.8. Pemeriksaan Glukosa Darah

Pengukuran kadar glukosa darah mencit dilakukan dengan cara melukai vena lateral ekor mencit yang kemudian darahnya ditempelkan pada strip yang telah terpasang pada alat tes glukosa (Glukometer). Hasil pengukuran kadar glukosa darah akan muncul dalam beberapa detik. Kemudian angka kadar glukosa darah akan terlihat di layar alat tes glukosa kemudian dicatat.

4.9. Analisis Data

Untuk melihat perbedaan bermakna secara statistik dari efek antidiabetes antar kelompok, urutannya adalah:

- a. Kelompok kontrol positif – kelompok kontrol negatif;
- b. Kelompok kontrol negatif – kelompok pembanding;
- c. Kelompok pembanding – kelompok kontrol positif;
- d. Kelompok uji – kelompok kontrol negatif;
- e. Kelompok uji – kelompok kontrol positif;
- f. Kelompok uji – kelompok pembanding.

maka digunakan uji statistika yaitu Analisis Varian (Anava) pada α : 0,05 dengan asas kepercayaan 95% dan uji lanjutan Tukey HSD.