

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1. Penyiapan Bahan dan Determinasi

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini kulit buah salak *Salacca zalacca* (Gaertner) Voss yang diperoleh dari Kampung Jambu, Sumedang, Jawa Barat. Kemudian determinasi dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung (ITB), untuk memastikan identitas tanaman yang digunakan.

Tahap penyiapan simplisia dimulai dari pengumpulan bahan (panen) buah salak. Kulit salak ini diambil dari buah yang sudah matang yaitu sekitar 5-6 bulan dimana warna kulit buah cokelat sampai kehitaman dan menghasilkan aroma khas yang cukup kuat. Kemudian dilakukan sortasi basah, pencucian menggunakan air mengalir hingga bersih dari tanah yang menempel. Setelah itu kulit buah salak dikupas, dipisahkan dengan buahnya dan dipotong-potong menjadi ukuran kecil untuk kemudian dikeringkan dengan cara diangin-angin selama 1 minggu. Setelah itu dilakukan sortasi kering dan simplisia dibungkus dengan kertas minyak dan plastik serta disimpan dalam wadah tertutup rapat.

4.2. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap simplisia dan ekstrak untuk mengetahui metabolit sekunder yang terkandung didalamnya. Penapisan fitokimia ini meliputi tes terhadap adanya golongan senyawa alkaloid, polifenolat,

flavonoid, saponin, tannin, kuinon, monoterpen dan sesquiterpen, serta steroid dan triterpenoid.

4.2.1. Alkaloid

Sejumlah simplisia uji atau ekstrak ditambahkan dengan 10 mL amonia 25%, lalu ditambah 20 mL kloroform dan digerus kuat. Campuran disaring dan filtrat digunakan untuk percobaan (larutan A). Larutan A diteteskan pada kertas saring dan diberi pereaksi Dragendroff. 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 dan hasil positif pada uji dengan pereaksi Dragendorff bila terbentuk endapan merah bata (Kusumardiyani, 1992:18).

4.2.2. Polifenolat

Sejumlah simplisia uji atau ekstrak ditambahkan dengan air secukupnya, dididihkan selama 5 menit, kemudian 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).

4.2.3. Flavonoid

Sejumlah simplisia uji atau ekstrak ditambahkan dengan air secukupnya, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan serbuk magnesium, asam klorida 2N dan amil alkohol, dan dikocok kuat-kuat dan

kemudian dibiarkan memisah. Terbentuknya warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya flavonoid (Kusumardiyani, 1992:53).

4.2.4. Saponin

Sejumlah simplisia uji atau ekstrak ditambahkan dengan air secukupnya, 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 (Kusumardiyani, 1992:36).

4.2.5. Tannin

Sejumlah simplisia uji atau ekstrak ditambahkan dengan air secukupnya, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi tiga. Pertama, filtrat ditambahkan dengan FeCl_3 akan terbentuk warna hijau, violet, atau hitam (tannin positif). Kedua, filtrat ditambahkan dengan gelatin 1% terbentuk endapan maka tannin positif, dan filtrat ketiga ditambahkan pereaksi Steasny, timbulnya endapan merah muda sampai merah bata menandakan positif tannin katekat (Farnsworth, 1966:264).

4.2.6. Kuinon

Sejumlah simplisia uji atau ekstrak ditambahkan dengan air secukupnya, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan larutan NaOH 5% apabila membentuk warna jingga menandakan positif kuinon (Farnsworth, 1966:265).

4.2.7. Monoterpen dan sesquiterpen

Sejumlah serbuk simplisia 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 (Depkes RI, 1977:132).

4.2.8. Triterpenoid dan steroid

Sejumlah serbuk simplisia uji atau ekstrak 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, merah atau merah muda yang timbul menandakan positif triterpenoid, sedangkan bila warna hijau biru atau biru yang timbul menunjukkan positif steroid (Farnsworth, 1966:259).

4.3. Pengujian Parameter Simplisia Non Spesifik

4.3.1. Kadar air

Kadar air pada simplisia ditetapkan dengan metode destilasi azeotrop. Disiapkan simplisia sebanyak ± 20 gram dan toluena jenuh 200 mL yang kemudian dimasukkan kedalam labu bundar dan dihubungkan dengan alat destilasi. Panaskan labu pada pemanas hingga toluena mendidih, atur kecepatan tetesan hingga 4 tetes per detik dan tunggu hingga air pada tabung penerima konstan. Bilas bagian pendingin dengan toluena dan lakukan penyulingan kembali selama 5 menit. Setelah itu matikan pemanas dan tunggu hingga air dan toluena

pada tabung penerima terpisah sempurna. Pengujian kadar air dilakukan secara duplo (Depkes, 2000: 16). Kadar air dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{volume air} \times \text{Bj air}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \quad (1)$$

4.3.2. Kadar abu total

Kurang lebih 2 gram serbuk simplisia dimasukkan kedalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara. Pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan dalam desikator dan ditimbang. Lakukan hingga bobot tetap dan dilakukan duplo (Depkes, 2000:17). Kadar abu total dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{berat abu}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \quad (2)$$

4.3.3. Kadar abu tidak larut asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25 mL HCl encer selama 5 menit, dan dikumpulkan abu yang tidak larut dengan menyaring pada kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas dan dipijarkan hingga bobot tetap, timbang. Pengujian dilakukan secara duplo (Depkes, 2000: 17). Kadar abu tidak larut asam dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{berat abu tidak larut asam}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \quad (3)$$

4.4. Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Salak

Ekstrak kulit salak dibuat dengan cara simplisia kulit buah salak diekstraksi secara remaserasi sebanyak 3x pada suhu kamar dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan simplisia dan pelarut (1:3) selama 4 hari. Maserat pertama ditampung setelah 48 jam dan dilakukan penggantian pelarut baru,

sedangkan maserat kedua dan ketiga ditampung setelah 24 jam. Ekstrak cair yang diperoleh, dipekatan menggunakan *rotary vaccum evaporator* dan selanjutnya dibuat lebih kental dengan menguapkan pelarut menggunakan *waterbath* sampai diperoleh ekstrak kental. Rendemen ekstrak yang diperoleh dapat dihitung dengan cara :

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \quad (4)$$

4.5. Pembuatan Sediaan

4.5.1. Pembuatan suspensi uji kulit buah salak

Berdasarkan hasil penelitian Kanon (2012) terbukti bahwa pada dosis 150 mg/kg BB dapat menurunkan glukosa darah pada tikus jantan galur Wistar yang diinduksi sukrosa. Sehingga dosis ekstrak terendah yang digunakan pada penelitian ini adalah 150 mg/kg BB tikus atau setara dengan 4,2 mg/20 g BB mencit dan selanjutnya penentuan dosis yang berjenjang menjadi 2x lipat yaitu 8,4 mg/20 g BB dan 16,8 mg/20 g BB. Ekstrak uji disuspensikan dalam CMC-Na 0,5% hingga homogen dan diberikan secara oral 0,25 mL/20 g BB.

4.5.2. Pembuatan suspensi pembanding

Dalam penelitian ini suspensi pembanding menggunakan tablet glibenklamid dosis 5 mg. Cara pembuatannya dengan menimbang tablet glibenklamid setara dengan glibenklamid 0,013 mg/20 g BB kemudian disuspensikan dalam CMC 0,5 % hingga homogen dan diberikan secara oral 0,25 mL/20 g BB.

4.6. Pengujian Efek Antidiabetes Induksi Aloksan

Hewan uji diaklimasi selama 2 minggu, diberi makan dan minum *ad-libitum*. Hewan uji yang digunakan yaitu 36 ekor mencit Swiss Webster jantan. Mencit dibagi menjadi 6 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol positif, kontrol negatif, uji I, uji II, uji III dan pembanding secara acak dengan sistem undian. Semua kelompok kecuali kontrol negatif disuntikkan larutan aloksan monohidrat secara intravena dosis tunggal 70 mg/kg BB, dan kontrol negatif disuntikkan larutan NaCl fisiologis. Hasil induksi setelah 3 hari, dipilih mencit yang masuk kriteria inklusi yaitu glukosa darah > 140 mg/dL lalu diberi perlakuan sesuai kelompok.

Kelompok I : Kontrol negatif yaitu tikus tidak diinduksi aloksan dan diberi suspensi CMC-Na 0,5%.

Kelompok II : Kontrol positif yaitu mencit diinduksi aloksan namun diberi suspensi CMC-Na 0,5%.

Kelompok III : Mencit diinduksi aloksan dan diberi ekstrak etanol kulit buah salak dosis 4,2 mg/20 g BB.

Kelompok IV : Mencit diinduksi aloksan dan diberi ekstrak etanol kulit buah salak dosis 8,4 mg/20 g BB.

Kelompok V : Mencit diinduksi aloksan dan diberi ekstrak etanol kulit buah salak dosis 16,8 mg/20 g BB

Kelompok VI : Mencit diinduksi aloksan dan diberi obat glibenklamid 0,013 mg/20 g BB

Perlakuan *treatment* terhadap semua kelompok dilakukan selama 21 hari.

4.7. Pengukuran Glukosa Darah

Setiap pengambilan darah mencit dipuasakan maksimal 16 jam terlebih dahulu. Pengukuran kadar glukosa darah mencit dilakukan dengan cara melukai vena ekor yang kemudian darahnya dimasukkan pada alat glukometer (*EasyTouch*) sehingga terjadi reaksi enzimatik dan didapatkan langsung hasil glukosa darah. Pengukuran glukosa darah dilakukan pada sebelum induksi (t_3), setelah induksi (t_0), dan setelah pemberian perlakuan setiap 7 hari selama 21 hari (t_7, t_{14}, t_{21}).

4.8. Analisa Data

Setelah pengukuran glukosa, dilakukan analisis data metode Anova dan uji lanjutan Tukey untuk melihat perbedaan bermakna secara statistik dari efek antidiabetes antar kelompok yaitu kelompok kontrol, kelompok uji dan kelompok pembandingan.