

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1. Pengumpulan Tanaman

Bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun mangga arumanis (*Mangifera indica* L. “arumanis”) yang diperoleh dari perkebunan di Indramayu. Determinasi dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Daun yang di ambil tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua dalam satu pohon.

4.2. Pembuatan Simplisia

Daun mangga 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.

4.3. Pembuatan Ekstrak

Serbuk simplisia daun mangga tersebut diekstraksi menggunakan metode soxhlet. Pelarut yang digunakan adalah etanol 95%. Sebanyak 100 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam kertas saring yang telah dibentuk silindris kemudian diletakkan dalam thimble soxhlet. Digunakan pelarut etanol 95% sebanyak 300 mL. Ekstraksi dilakukan sekitar 11-12 jam hingga cairan tidak berwarna. Ekstrak cair 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: (Harborne, 1987 : 6-7).

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

4.4. Pengujian Parameter Standar Simplisia dan Ekstrak

Pengujian parameter standar dilakukan terhadap simplisia dan ekstrak, terdiri dari parameter standar spesifik dan parameter standar nonspesifik. Parameter standar nonspesifik bertujuan untuk menetapkan kualitas ekstrak dan simplisia meliputi bobot jenis dan penetapan kadar air. Parameter standar spesifik yang diperiksa yaitu penapisan fitokimia, penetapan kadar sari larut air, dan penetapan kadar sari larut etanol.

4.4.1. Penetapan Bobot Jenis

Sejumlah 2 gram ekstrak dimasukkan ke dalam piknometer yang telah dikalibrasi dengan menentukan bobot piknometer dan bobot air yang baru di didihkan pada suhu 25°C dan ditimbang. Bobot piknometer yang telah diisi dikurang bobot piknometer yang kosong. Bobot jenis simplisia adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot simplisia dengan bobot air dalam piknometer pada suhu 25°C (Depkes RI, 2000).

Bobot jenis dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Bobot jenis} = \frac{W_3 \text{ (g)} - W_1 \text{ (g)}}{W_2 \text{ (g)} - W_1 \text{ (g)}}$$

Keterangan : w1 = Bobot piknometer kosong

$w_2 = \text{Bobot piknometer} + \text{air suling}$

$w_3 = \text{Bobot piknometer} + \text{simplisia}$

4.4.2. Penetapan Kadar Air

Pengukuran kadar air dilakukan dengan cara destilasi azeotroph. Tabung penerima dan pendingin dibersihkan dengan seksama, kemudian dibilas dengan air dan dikeringkan. Sebanyak 200 mL toluen P dan sekitar 2 mL air dimasukkan ke dalam labu kering. Labu dipanaskan hingga larutan mendidih selama 2 jam, dibiarkan dingin selama sekitar 30 menit dan volume air dibaca dengan akurasi 0,05 mL. Hasil yang diperoleh disebut volume destilasi pertama (n). Kemudian ke dalam labu tersebut dimasukkan 5 gram simplisia dan disertai labu didih. Labu dipanaskan dengan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mulai mendidih larutan disuling dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik, hingga sebagian air tersuling. Kemudian kecepatan penyulingan ditingkatkan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluen, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan telah dibasahi dengan toluen. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima pendingin dibiarkan hingga mencapai suhu kamar. Jika ada tetesan air yang melekat pada pendingin tabung penerima digosok dengan karet yang dikaitkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluen hingga tetesan air turun. Setelah air dan toluen memisah sempurna, volume yang terbaca disebut sebagai volume destilasi kedua (n_1) (WHO, 1998 : 31-33).

Kadar air dihitung dalam persen (%) dengan persamaan :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{(V_1 - B_{\text{air}})}{w_0} \times 100\%$$

4.4.3. Penetapan Kadar Sari Larut Air

Sejumlah 20 gram bahan yang telah dikeringkan, dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml air – kloroform P (1000 ml : 2,5 ml), menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Maserat disaring, sebanyak 20 ml filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, dipanaskan sisa pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 2000).

Kadar sari larut air dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{Berat sari larut air (g)}}{\text{Berat Bahan Awal (g)}} \times \frac{20}{100} \times 100\%$$

4.4.4. Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Sejumlah 20 gram bahan yang telah dikeringkan, dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol, menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Maserat disaring cepat dengan menghindarkan penguapan etanol, diuapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, sisanya dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut dalam etanol dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 2000).

Kadar sari larut etanol dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{Berat sari larut etanol (g)}}{\text{Berat Bahan Awal (g)}} \times \frac{20}{100} \times 100\%$$

4.5. Penapisan Fitokimia

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

4.5.1. 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: 243-265).

4.5.2. 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).

4.5.3. Tanin dan polifenol

Bahan digerus dengan air hingga lumat, kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan didihkan selama beberapa menit. Setelah disaring, filtrat dibagi dua bagian. Ke dalam filtrat satu diteteskan 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).

4.5.4. 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).

4.5.5. 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: 262-264).

4.5.6. 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).

4.5.7. 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).

4.5.8. 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 ditetaskan larutan pereaksi Dragendorff. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan atau kekeruhan berwarna jingga coklat. Ke dalam filtrat dua ditetaskan 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).

4.6. Pembuatan Sediaan Uji

4.6.1. Penyiapan kontrol

Dibuat CMC 0,5% ^{b/v} 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 aquadest sampai diperoleh volume 100 ml.

4.6.2. Penyiapan sediaan uji

Dibuat ekstrak daun mangga dengan konsentrasi 2,1 mg/20g BB mencit, 4,2 mg/20g BB mencit, dan 8,4 mg/20g BB mencit.

4.6.3. Penyiapan pembanding

Sediaan pembanding dibuat dengan cara menggerus tablet yang mengandung 5 mg glibenklamid dan ditimbang sesuai yang dibutuhkan kemudian disuspensikan dengan CMC 0,5% ^{b/v}.

4.7. Penyiapan hewan uji

Digunakan hewan uji mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster jantan berumur \pm 2-3 bulan, berat antara 20-35 g, sehat, bulu tidak kusam, peka terhadap rangsangan sekitar, gesit, dan diperhatikan pula keseragaman hewan uji. Hewan dipelihara selama jangka waktu tertentu (1 minggu). Kemudian selalu diamati kondisinya melalui penimbangan berat badan. Hewan uji mencit dipuaskan 1 jam sebelum dilakukan penelitian dan hanya diberi air minum saja.

4.8. Pengujian Aktivitas Antidiabetes dengan Metode Test Toleransi Glukosa Oral (TTGO)

Mencit dikelompokkan menjadi 6 kelompok secara acak dan tiap kelompok terdiri atas 5 ekor mencit. Pada kelompok I merupakan kelompok kontrol negatif (tidak diinduksi, diberi aquadest), kelompok II merupakan kelompok kontrol positif (diinduksi diabetes, diberi suspensi CMC 0.5% b/v), kelompok III merupakan kelompok pembanding (diinduksi diabetes, diberi suspensi glibenklamid 1,3 mg/kg BB mencit) secara peroral, kelompok IV merupakan kelompok yaitu uji I (diinduksi diabetes, diberi ekstrak daun mangga 2,1 mg/20g BB mencit), kelompok V merupakan uji II (diinduksi diabetes, diberi ekstrak daun mangga 4,2 mg/20g BB mencit), dan kelompok VI merupakan uji III (diinduksi diabetes, diberi ekstrak daun mangga 8,4 mg/20g BB mencit).

Setelah ditimbang dan dipuasakan selama 16 jam, hewan uji yang telah dikelompokkan secara acak diambil cuplikan darahnya (T_0) untuk penentuan kadar glukosa darah awal kemudian semua kelompok perlakuan diberi sediaan uji (pembawa, pembanding, atau ekstrak uji) secara oral sesuai kelompoknya. Setelah 30 menit kemudian, semua mencit diberi larutan glukosa 3,9 g/kg BB secara oral. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan pada 30, 60, 90, 120, 150, dan 180 menit setelah pemberian larutan glukosa (Adnyana, 2004) menggunakan alat glukometer (EasyTouch[®] GCU). Parameter yang diamati adalah penurunan kadar glukosa darah mencit.

4.9. Teknik Analisis Data

Untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan bermakna terhadap terjadinya aktivitas antidiabetes pada kelompok uji dengan kelompok kontrol maka dilakukan uji statistik yaitu dengan metode uji ANOVA, serta uji lanjutan LSD.

