

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1. Penyiapan Bahan dan Determinasi

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun keji beling (*Strobilanthes crispata* (L.) Blume) dan daun tapak dara (*Catharanthus roseus* (L.) G.Don) yang diperoleh dari daerah Lembang (manoko), Kabupaten Bandung, Jawa Barat. Determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, untuk memastikan identitas tanaman yang digunakan.

Simplisia disiapkan dengan mengeringkan daun dengan cara diangin-anginkan di suhu ruangan. Daun uji kemudian dihaluskan hingga diperoleh simplisia serbuk daun uji kering.

4.2. Pembuatan Ekstrak Daun Keji Beling dan Ekstrak Daun Tapak Dara

Ekstrak etanol 70% dari daun keji beling dan daun tapak dara (daun uji) dibuat dengan metode maserasi, yakni merendam masing-masing simplisia uji dengan etanol 70% hingga simplisia terendam. Maserasi dilakukan selama 3 x 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 dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40 °C sampai diperoleh ekstrak daun keji beling dan daun tapak dara (BPOM, 2004).

4.3. Uji Parameter Nonspesifik Simplisia Daun Keji Beling (*Strobilanthes crispata* (L.) Blume) dan Daun Tapak Dara (*Catharanthus roseus* (L.) G.Don)

Uji parameter nonspesifik simplisia dilakukan untuk mengetahui kualitas dari simplisia yang digunakan, apakah simplisia uji naik untuk digunakan atau tidak.

4.3.1. Penetapan kadar air

Tujuan pengujian untuk memberikan batasan minimal atau rentang tentang besarnya kandungan air di dalam bahan (Depkes, 2000: 14). Penetapan kadar air dilakukan dengan metoda azeotroph, tahapannya yaitu tabung penampung dan kondensor dibersihkan dengan cara dibilas dengan asam, lalu dibilas dengan air, kemudian dikeringkan dalam oven. Ke dalam labu destilata dimasukkan 200 ml toluena yang telah dijenuhkan dengan aqua destilata. Simplisia sebanyak 20 gram dimasukkan ke dalam labu bundar. Labu dididihkan perlahan-lahan selama kurang lebih 15 menit (tambahkan serpihan porselen), setelah mendidih disuling dengan kecepatan 2 tetes/detik hingga sebagian besar air tersuling kemudian kecepatan penyulingan dinaikkan menjadi 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam kondensor dibilas dengan toluena, selanjutnya penyulingan dilanjutkan selama 5 menit, kemudian pemanasan dihentikan. Tabung penerima didinginkan sampai suhu kamar. Tetesan air yang menempel pada dinding tabung penerima dihilangkan. Air dan toluena dibiarkan memisah dalam tabung penerima, kemudian volume air dalam tabung penerima diamati. Kadar air dihitung dalam persen.

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{ml air} \times \text{bobot jenis air}}{\text{berat simplisia (ekstrak)}} \times 100\%$$

4.3.2. Penetapan kadar abu total

Dua gram sampel ditimbang, dimasukkan ke dalam krus porselen yang telah dipijarkan dan ditara, selanjutnya diratakan. Krus berisi simplisia dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, kemudian didinginkan dan ditimbang. Apabila dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan maka dapat ditambahkan air panas, kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring bebas abu. Pijarkan kertas saring dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan, pijarkan hingga bobot tetap, kemudian ditimbang. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Dirjen POM, 2000: 17)

$$\text{Kadar Abu} = \frac{\text{berat abu (g)}}{\text{berat bahan awal}} \times 100\%$$

4.4. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia ini bertujuan untuk mengetahui golongan kandungan kimia metabolit sekunder dalam suatu simplisia dan ekstrak. Penapisan fitokimia simplisia dan ekstrak meliputi pemeriksaan kualitatif senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponon, kuinon, tanin, dan monoterpenoid/triterpenoid, steroid atau triterpenoid (Farnsworth, 1966: 245-266).

4.4.1. Penapisan golongan senyawa alkaloid

Simplisia dan ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi lalu diasamkan dengan asam klorida 2N, lalu disaring. Filtrat dibasakan dengan larutan amonia 10%, kemudian ditambahkan kloroform dan dikocok kuat-kuat. Lapisan kloroform disaring, kemudian ditambahkan asam klorida 2N lalu dikocok kuat-kuat sampai terdapat dua lapisan kembali. Lapisan asam dipipet dan dibagi

kedalam tiga tabung, pada tabung 1 ditambahkan pereaksi Mayer, apabila timbul endapan putih atau kekeruhan menandakan positif alkaloid. Pada tabung 2 ditambahkan pereaksi Dragendorff, apabila timbul endapan jingga-kuning atau kekeruhan menandakan positif alkaloid, dan tabung 3 digunakan sebagai blangko (Farnsworth,1966: 245).

4.4.2. Penapisan golongan senyawa flavonoid

Simplisia dan ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan air 5-10 mL, kemudian dicampur dengan serbuk magnesium dan asam klorida 2N, larutan dicampurkan dan dipanaskan di atas penangas air selama 5-10 menit kemudian disaring. Filtrat yang didapat ditambahkan amil alkohol lalu dikocok kuat-kuat. Apabila timbul warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol menandakan positif flavonoid (Farnsworth,1966: 263).

4.4.3. Penapisan golongan senyawa polifenolat

Simplisia dan ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan air 5-10 mL kemudian dipanaskan diatas penangas air dan disaring filtratnya. Filtrat yang didapat ditambahkan larutan pereaksi besi (III) klorida. Apabila timbul warna hijau atau biru-hijau, merah ungu, biru-hitam hingga hitam menandakan positif adanya fenolat. Jika timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat (Farnsworth,1966: 255).

4.4.4. Penapisan golongan senyawa saponin

Simplisia dan ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan air 5-10 mL, kemudian dipanaskan di atas penangas air selama 30 menit, lalu disaring. Filtrat dibiarkan sampai dingin, lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik

dengan arah vertikal. Apabila muncul bujsa setinggi ± 1 cm yang bertahan selama 10 menit dan busa tersebut tetap bertahan (tidak hilang) setelah ditambahkan beberapa tetes asam klorida maka menandakan positif saponin (Farnsworth,1966: 257).

4.4.5. Penapisan golongan senyawa tannin

Simplisia dan ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan air 10-20 mL, kemudian dipanaskan di atas penangas air lalu disaring dan dibagi menjadi 2 bagian dalam tabung reaksi yang berbeda. Pada tabung reaksi 1 ditambahkan larutan gelatin 1%, apabila muncul endapan putih menandakan positif tanin. Pada tabung reaksi 2 ditambahkan pereaksi Steasny 15 mL, lalu dipanaskan diatas penangas. Terbentuknya endapan merah muda menunjukkan adanya tanin katekat. Filtrat daritabung reaksi 2 dijenuhkan dengan penambahan natrium asetat, kemudian ditambahkan beberapa tetes besi(III)klorida 1%. Terbentuknya warna biru tinta menunjukkan adanya tanin galat (Farnsworth,1966: 264).

4.4.6. Penapisan golongan senyawa kuinon

Simplisia dan ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan air 5-10 mL, kemudian dipanaskan di atas penangas air lalu disaring. Kepada filtrat ditambahkan larutan kalium hidroksida 5%. Apabila timbul warna kuning hingga merah menandakan positif kuinon (Farnsworth,1966: 265).

4.4.7. Penapisan golongan senyawa steroid-triterpenoid

Simplisia dan ekstrak ditambahkan eter kemudian digerus dan disaring hingga halus. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap

sampai kering, lalu ditambahkan larutan perekasi Liebermann Burchard. Apabila timbul warna merah-ungu menandakan positif triterpenoid, sedangkan apabila timbul warna hijau-biru menunjukkan positif steroid (Farnsworth, 1966: 257-259).

4.4.8. Penapisan golongan senyawa monoterpen/sesquiterpen

Sejumlah 50mg simplisia dan ekstrak digerus dengan 20 mL eter kemudian disaring. Filtrat sebanyak 5 mL dibiarkan menguap dalam cawan penguap sampai kering, ditambahkan vanilin 10% dalam asam sulfat pekat. Terbentuknya warna-warna menunjukkan positif monoterpen/sesquiterpen (Depkes RI, 1977: 132).

4.5. Pembuatan Suspensi Uji Ekstrak Daun Keji Beling, Ekstrak Daun Tapak Dara dan Glibenklamid

Suspensi uji yang digunakan dalam penelitian terdiri dari tiga macam, yaitu suspensi ekstrak daun keji beling tunggal (500 mg/kg BB tikus), suspensi ekstrak daun tapak dara tunggal (400 mg/kg BB tikus) dan suspensi kombinasi (1/2+1/2) setengah dosis ekstrak daun keji beling (250 mg/kg BB tikus) setengah dosis ekstrak daun tapak dara (200 mg/kg BB tikus). Pembanding yang digunakan adalah glibenklamid. Cara pembuatannya dengan menimbang tablet glibenklamid setara dengan glibenklamid 0,65 mg/kg BB mencit. Kemudian ekstrak dan glibenklamid disuspensikan dalam 50 ml CMC-Na 0,5% yang dibuat dengan cara 250 mg serbuk CMC-Na dilarutkan dalam aquadest 50 ml. Ketiga ekstrak dan pembanding diberikan secara per oral dengan volume pemberian 15 mL/kg BB mencit.

4.6. Orientasi Induksi Aloksan

Sebelum penelitian, dilakukan uji orientasi induksi oleh aloksan terhadap 6 ekor mencit. Uji orientasi induksi aloksan ini dilakukan untuk melihat kemampuan aloksan dalam merusak fungsi pankreas dan juga untuk melihat dosis yang dapat digunakan dalam pengujian. Dosis aloksan yang akan digunakan pada orientasi adalah 120 mg/kg BB tikus. Dosis ini merupakan dosis standar yang digunakan untuk menjadikan kondisi hiperglikemik pada tikus (Yuriska, 2009: 7).

4.7. Pengujian Efek Antihiperglikemik

Selanjutnya dilakukan penentuan kadar glukosa darah dengan menggunakan metode uji induksi aloksan. Pengujian ini menggunakan mencit jantan yang dikelompokkan secara acak dan masing-masing mempunyai bobot badan rata-rata antara 20-30 gram sebagai hewan uji yang dibagi menjadi 6 kelompok masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor mencit jantan, kelompok terdiri dari kelompok kontrol positif, kontrol negatif, uji I, uji II, uji III dan pembanding. Dosis ekstrak daun uji diambil dari konversi dosis penelitian sebelumnya, ekstrak daun keji beling 500 mg/kg BB dan ekstrak daun tapak dara 400 mg/kg BB.

Semua mencit diukur terlebih dahulu kadar glukosa darahnya sebelum diinduksi aloksan. Kemudian tiap kelompok mencit diinduksi dengan aloksan dosis 120 mg/kg BB kecuali kelompok kontrol negatif. Pada hari ke 8 dan 14 dilakukan pengukuran kadar glukosa untuk mengetahui efek perusakan pankreas oleh aloksan yang menyebabkan kondisi hiperglikemik mencit. Selanjutnya

setelah tercapainya kondisi hiperglikemik, masing masing kelompok mendapat perlakuan sebagai berikut :

- I. Kelompok kontrol negatif (suspensi CMC Na 0,5%)
- II. Kelompok kontrol positif (suspensi CMC Na 0,5%)
- III. Kelompok uji ekstrak daun *Strobilanthes crispera* (L) Blume. (suspensi ekstrak daun keji beling dosis 500 mg/kg BB)
- IV. Kelompok uji ekstrak daun *Catharanthus roseus* (L.) G.Don (suspensi ekstrak daun tapak dara dosis 400 mg/kg BB)
- V. Kelompok uji ekstrak kombinasi *Strobilanthes crispera* (L.) Blume dan *Catharanthus roseus* (L.) G.Don Dengan perbandingan 1/2+1/2 dari dosis tunggalnya (suspensi ekstrak daun keji beling dosis 250 mg/kg BB + suspensi ekstrak daun tapak dara dosis 200 mg/kg BB)
- VI. Kelompok pembanding (suspensi glibenklamid) dengan dosis 5 mg/70 kg BB.

Selama pengujian mencit diberi pakan standar seperti biasa. Sediaan uji diberikan satu kali setiap harinya selama 7 hari setelah efek aloksan terlihat (kondisi hiperglikemik). Dan dilakukan pengukuran pada hari ke 22. Kemudian dilakukan analisa data statistika.

4.8. Pengukuran Glukosa Darah

Pengukuran kadar glukosa darah tikus dilakukan dengan cara melukai (memotong) vena lateral ekor tikus yang kemudian darahnya diteteskan pada striptest. Kemudian striptest dimasukkan ke alat pengukur kadar glukosa darah (*Gluko Test*), kadar glukosa berupa angka digital pada alat.

4.9. Analisa Data

Untuk melihat keberhasilan dari induksi yang dilakukan digunakan uji statistik Paired Sample T-Test dibandingkan dengan kontrol negatif pada $\alpha : 0,05$. Dan untuk melihat perbedaan bermakna secara statistik dari efek antidiabetes antar kelompok yaitu kelompok uji (ekstrak tunggal dan kombinasi) dibandingkan terhadap kelompok kontrol positif, dan kelompok uji (ekstrak tunggal dan kombinasi) dibandingkan terhadap kelompok pembanding, maka digunakan uji statistika yaitu ANOVA dan uji lanjut Tukey-HSD pada $\alpha : 0,05$.

