

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Bahan

Mencit jantan galur *Swiss webster*, simplisia daun dandang gendis (*Clinacanthus nutans*), air suling, etanol, etilasetat, n-heksan, kloroform, uranil asetat, Natrium klorida, aloksan, glibenklamid yang diperoleh dari PT. Phapros Semarang, glukosa, dan kit glukosa merk Human.

3.2. Alat

Alat yang digunakan adalah alat-alat gelas dan ekstraksi, alat-alat kromatografi, kandang mencit, spektrofotometer Hitachi 4020, *stopwatch*, glukosameter *One Touch Ultra* buatan Lifescan Johnson-Johnson, ependorf, mikropipet, mikrosentrifuga, alat suntik, alat suntik oral, alat pengering beku Eyela FD-81, dan timbangan hewan.

3.3. Hewan Percobaan

Mencit jantan galur *Swiss webster* dengan bobot kira-kira 25-35 gram dan usia kurang 3 bulan yang diperoleh dari Laboratorium Hewan Unit Bidang Farmakologi Farmasi ITB dan berada dalam keadaan sehat dan normal. Mencit diabetes digunakan mencit yang disuntikan aloksan 50 mg/kg bb mencit secara *intravena*. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan setelah mencit menderita diabetes melitus. Fraksi ekstrak air diuji menggunakan mencit normal dengan metode toleransi glukosa.

3.4. Pengumpulan Bahan dan Determinasi Tanaman

Rajangan daun setelah dikeringkan di bawah sinar matahari selama beberapa hari, ditumbuk hingga halus dan siap digunakan. Determinasi terhadap kedua tanaman dilakukan di Herbarium Bandungense Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung.

3.5. Rancangan Percobaan

Ekstraksi bahan uji, simplisia daun dandang gendis, dilakukan dengan pelarut air dan difraksinasi lebih lanjut dengan pelarut polar, semi polar, dan non polar (Gambar 3.1). Ekstrak air diuji efeknya terhadap penurunan kadar glukosa darah pada mencit diabetes yang diinduksi aloksan dengan dosis 50 mg/kg bb secara *intravena*. Digunakan pembanding glibenklamid dosis lazim yaitu setara 5 mg untuk manusia dengan faktor konversi 0.0026/20 g bb mencit (Laurence & Bacharach, 1964). Ekstrak hasil fraksinasi diuji lebih lanjut dengan metode toleransi glukosa pada mencit normal.

3.6. Ekstraksi, Fraksinasi, dan Isolasi Senyawa Aktif Daun Dandang Gendis

Serbuk daun dandang gendis dengan bobot 250 gram diekstraksi dengan air pada suhu 90 – 100°C selama 15 menit. Waktu dihitung dari air mulai mendidih. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali dengan volume masing-masing 1 liter. Ekstrak dikeringkan dengan cara penguapan penangas dan dikeringbekukan. Sebagian besar ekstrak diekstraksi kembali dengan etanol sebanyak 3 kali dengan volume etanol masing-masing 500 ml. Didapat endapan dan larutan etanol. Larutan etanol dipekatkan hingga 500 ml dan diekstraksi cair-cair dengan n-heksan sebanyak 4 kali dengan volume masing-masing 250 ml. Kemudian lapisan etanol dikeringkan sehingga didapat endapan ekstrak etanol diekstraksi lebih lanjut dengan etilasetat secara soksletasi 4 kali dengan volume masing-masing 250 ml. Lapisan n-heksan dan filtrat etilasetat dipekatkan maka didapat ekstrak n-heksan dan ekstrak etilasetat. Ekstrak air, fraksi ekstrak air yang tidak larut etanol (fraksi endapan air), fraksi etanol, fraksi ekstrak etanol yang tidak larut dengan etilasetat (fraksi endapan etanol), fraksi etilasetat, dan fraksi n-heksan diuji pengaruhnya terhadap kadar glukosa darah pada mencit normal metode toleransi glukosa. Selain itu keenam ekstrak dan fraksi diuji kandungan fitokimianya.

3.7. Penapisan Fitokimia Ekstrak dan Fraksi Daun Dandang Gendis

Ekstrak air dan fraksi-fraksinya diperiksa kandungan senyawa metabolit sekunder yang meliputi pemeriksaan alkaloid, saponin, flavonoid, triterpenoid/steroid, tanin dan saponin.

3.7.1. Uji Alkaloid

Ekstrak ditambahkan 10 ml kloroform dan beberapa tetes amoniak. Fraksi kloroform dipisahkan dan diasamkan dengan asam sulfat 2M. Fraksi asam sulfat diambil, kemudian ditambahkan pereaksi Meyer, Dragendorf, dan Wagner. Jika terdapat endapan putih dengan pereaksi Meyer, endapan merah jingga dengan pereaksi Dragendorf, dan endapan coklat dengan pereaksi Wagner, maka positif terdapat alkaloid. Ekstrak dan fraksi daun dandang gendis positif mengandung alkaloid.

3.7.2. Uji Saponin

Sampel dengan bobot tertentu ditambahkan air secukupnya dan dipanaskan selama 5 menit. Lalu didinginkan dan dikocok kuat. Adanya saponin ditandai dengan timbulnya busa yang stabil selama ± 10 menit. Dari hasil pengamatan disimpulkan bahwa ekstrak dan fraksi daun dandang gendis tidak mengandung saponin.

3.7.3. Uji Flavonoid

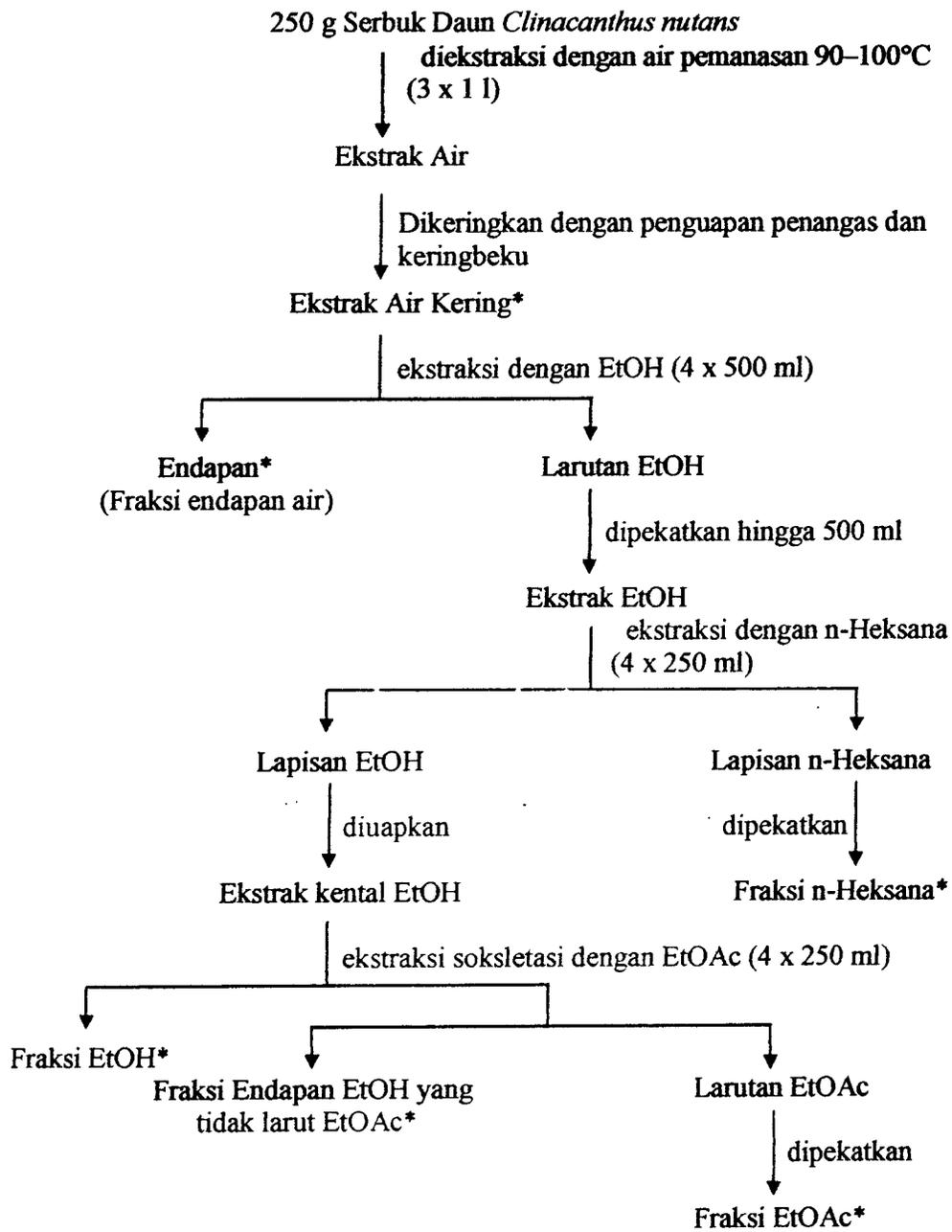
Sampel dengan bobot tertentu ditambahkan air secukupnya dan dipanaskan selama 5 menit, kemudian ditambahkan serbuk Magnesium, 0,2 ml asam klorida pekat, dan beberapa tetes amilalkohol. Larutan dikocok dan dibiarkan memisah. Flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah coklat pada lapisan amilalkohol. Kecuali fraksi n-heksan, ekstrak dan fraksi yang lain positif mengandung flavonoid.

3.7.4. Uji Triterpenoid/Steroid

Sampel ditambahkan etanol, lalu dipanaskan dan disaring. Filtratnya diuapkan kemudian ditambahkan eter. Lapisan eter dipipet dan diuji dengan pereaksi Lieberman Buchard (asam asetat anhidrat – Asam sulfat pekat 3:1). Terbentuk warna merah ungu positif mengandung triterpenoid dan warna hijau positif mengandung steroid. Ekstrak dan fraksi dapat membentuk warna merah ungu dan hijau terhadap pereaksi ini sehingga positif mengandung triterpenoid dan steroid.

3.7.5. Uji Tanin

Sampel dengan bobot tertentu ditambahkan air secukupnya dan dipanaskan selama 5 menit. Filtrat ditambahkan besi (III) klorida 1% membentuk warna biru tua atau hijau kehitaman positif mengandung tanin. Keseluruhan ekstrak dan fraksi positif mengandung tanin.



* Ekstrak dan fraksi yang diuji pengaruhnya terhadap kadar glukosa darah mencit dengan metode toleransi glukosa

Gambar 3.1. Skema ekstraksi dan fraksinasi daun dandang gendis (*Clinacanthus nutans*)

3.7.6. Uji Kuinon

Sampel ditambahkan air, kemudian dididihkan selama 5 menit. Setelah dingin disaring, lalu filtrat ditambahkan natrium hidroksida 15%. Jika berwarna merah maka positif mengandung kuinon. Tidak terbentuknya warna merah menyatakan bahwa ekstrak dan fraksi tidak mengandung kuinon.

3.8. Pengukuran Glukosa Darah

Pengukuran dilakukan dengan menggunakan metode tes kolorimetri enzimatis dengan deproteinisasi, yaitu dengan menggunakan kit glukosa GOD-PAP dan stik glukosa berdasarkan metode glukosa oksidase. Penentuan kadar gula darah menggunakan spektrofotometer Hitachi 4020 pada panjang gelombang 546 nm.

3.8.1. Pengukuran Glukosa Darah dengan Kit Glukosa GOD-PAP

Darah mencit diambil melalui ekor sebanyak 0,5 – 1 ml ke dalam tabung ependorf. Darah disentrifusa selama 10 menit untuk diambil serumnya sebanyak 50 µl dan kemudian ditambahkan uranil asetat 500 µl dan disentrifusa kembali. Supernatan sebanyak 50 µl diambil dan ditambahkan pereaksi enzim kit glukosa 500 µl, kemudian diinkubasi selama 10 menit dan diukur dengan spektrofotometer Hitachi 4020 pada panjang gelombang 546 nm untuk mendapatkan nilai kadar glukosa darah. Hal yang sama dilakukan untuk blanko dan standar glukosa.

3.9. Uji Efek Ekstrak Air Daun Dandang Gendis terhadap Kadar Glukosa Darah Mencit Diabetes Diinduksi Aloksan dengan Pembanding Glibenklamid

Hewan uji dibagi 3 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri 5 ekor mencit. Kelompok I, II, dan III berturut-turut adalah mencit diabetes sebagai kontrol, mencit diabetes yang diberikan ekstrak air, dan mencit diabetes yang diberikan pembanding glibenklamid. Penyiapan hewan diabetes dilakukan dengan menyuntikkan aloksan dosis 50 mg/kg bb secara *intravena*. Setelah tiga hari mencit menjadi diabetes dan dipilih yang memiliki kadar glukosa darah besar dari 200 mg/dl. Mencit diabetes dari masing-masing kelompok dipuasakan selama 18 jam. Diberikan bahan-bahan secara oral setiap hari selama 9 hari. Pengambilan darah dan pengukuran kadar glukosa darah mencit dilakukan dengan kit glukosa enzimatis dilakukan setiap 3 hari sekali.

3.10. Penapisan Ekstrak dan Fraksi Daun Dandang Gendis terhadap Kadar Glukosa Darah Mencit Normal dengan Metode Toleransi Glukosa

Mencit dibagi atas 7 kelompok masing-masing terdiri dari 3 ekor. Kelompok I, II, III, IV, V, VI, dan VII berturut-turut adalah mencit kontrol, mencit yang diberikan ekstrak air, mencit yang diberikan fraksi endapan ekstrak air yang tidak larut etanol, mencit yang diberikan fraksi etanol, mencit yang diberikan fraksi etilasetat, mencit yang diberikan endapan etanol yang tidak larut etilasetat, dan mencit yang diberikan fraksi n-heksan. Masing-masing kelompok mencit dipuaskan selama kurang lebih 18 jam dan diberikan bahan-bahan obat secara oral. Dosis bahan obat yang digunakan adalah 100 mg/kg bb. Sejam setelah itu diberikan secara oral glukosa dengan dosis 2 g/kg bb. Untuk penentuan kadar glukosa darah mencit diambil darah pada jam ke-0 sebelum pemberian bahan obat, dan jam ke-1, 2, dan 3 setelah pemberian glukosa. Pengukuran kadar glukosa darah mencit dilakukan dengan kit glukosa enzimatik.

3.11. Uji Statistika

Data glukosa darah yang didapat diolah secara statistika dengan metode uji *software* SPSS untuk mengetahui perbedaan bermakna dari setiap kelompok pada $P \leq 0,05$ terhadap kelompok kontrol. Perubahan kadar glukosa darah mencit diabetes aloksan dihitung menurut rumus 3.11.1.

$$X_t - X_0 \dots\dots\dots (3.11.1)$$

Persen perubahan kadar glukosa darah mencit diabetes aloksan dihitung menurut rumus 3.11.2.

$$\frac{X_t - X_0}{X_0} \times 100\% \dots\dots\dots (3.11.2)$$

Dengan X_t adalah kadar glukosa darah mencit diabetes pada waktu t tertentu, X_0 pada mencit diabetes aloksan adalah kadar glukosa darah mencit diabetes awal (sebelum perlakuan), sedangkan pada mencit normal dengan metode toleransi glukosa, X_0 adalah kadar glukosa darah mencit normal pada waktu ke-0 (normal).