BAB III
METODE PENELITIAN

A. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah daun yacon (*Smallanthus sonchifolius)* dan daun pahitan (*Tithonia divesifolia)*. Bahan lain berupa senyawa penginduksi diabetes melitus (aloksan), obat antidiabetes melitus oral (glibenklamid), Reagen GOD-PAP (*Glicose Oksidatif Diasys-Phenyl Aminoantipirin*), Aquabides, NaCl 0,9 %, Etanol 70 %, Alkohol, tikus jantan putih galur Wistar berumur 7-9 minggu.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik (*Mettler toledo*), gelas beker *(Pyrex)*, labu ukur *(Pyrex)*, spuit injeksi oral (*Terumo)*, timbangan tikus (*Ohauss*), spatula, *spektrofotometer visible*, *sentrifuge (Hettich)*, mikropipet, *eppendorf*, *rotary evaporator (Heidolph)*.toples maserasi, kandang pengamatan tikus, cawan porselen.

B. Cara Penelitian

1. Pengajuan *Ethical Clearance*

Ethical clearance diajukan kepada Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.

2. Pengumpulan bahan

Daun yacon (*Smallanthus sonchifolius)* diperoleh dari pembudidaya tanaman yacon dilereng gunung Sindoro, Kabupaten Wonosobo, Propinsi Jawa Tengah. Daun yacon yang digunakan adalah daun yang sudah tua dengan warna daun hijau tua dari varietas tanaman yacon dengan daging umbi berwarna krem. Daun pahitan (*Tithonia diversifolia*) diperoleh dari

pengumpul daun pahitan di Kabupaten Sleman, Jl. Kaliurang Km. 16 Yogyakarta dalam bentuk daun kering.

3. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada dengan cara mencocokkan ciri-ciri morfologi tanaman berdasarkan buku *Flora of Java*[45].

4. Pembuatan ekstrak etanol 70% daun yacon (*Smallanthus sonchifoli*us) dan daun Pahitan (*Tithonia diversifolia)*.

Ekstrak etanol 70% daun yacon (*Smallanthus sonchifolius)* dan ekstrak etanol 70% daun paitan (*Tithonia diversifolia)* diperoleh dengan melakukan ekstraksi menggunakan metode maserasi. Proses ektraksi diawali dengan pengeringan daun pada oven dengan suhu 30°-50°C sampai daun menjadi cukup kering. Selanjutnya daun kering tersebut diserbuk dan dilanjutkan dengan proses maserasi. Ekstraksi dengan metode maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk kering dengan etanol 70% selama 24 jam dan dilakukan maserasi secara berulang sampai didapat filtrat dengan warna yang tidak pekat. Maserat yang didapatkan selanjutnya diuapkan kemudian akan diperoleh massa kental dan ditentukan rendemennya.

5. Analisis kandungan senyawa aktif dengan uji reagen

a. Uji Flavonoid

Ekstrak tanaman dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 5-6 tetes HCl pekat dan dicampurkan. Setelah itu ditambah logam Mg 0,2 gram. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah tua selama 3 menit[42].

b. Uji Triterpenoid

Eksrak tanaman dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam etanol. Kemudian ditambahkan 0,5 mL kloroform lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Campuran ini selanjutnya ditambah dengan

1-2 mL H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid[43].

6. Dosis ekstrak etanol 70% daun yacon (*Smallanthus sonchifolius)* pada penelitian.

Pada penelitian ini dosis ekstrak etanol 70% daun yacon (*Smallanthus sonchifolius)* yang digunakan adalah 600 mg/kgBB tikus[6], 150 mg/kgBB tikus, dan 450 mg/kgBB tikus.

7. Dosis ekstrak etanol 70% daun pahitan *(Tihonia diversifolia)* pada penelitian.

Pada penelitian ini dosis ekstrak etanol 70% daun paitan (*Tithonia divesifolia*) yang digunakan adalah 1050 mg/kgBB tikus[9], 262,5 mg/kgBB tikus, dan 787,5 mg/kgBB tikus.

8. Pembuatan larutan stok dari ekstrak etanol 70% daun yacon (*Smallanthus sonchifolius).*

Volume pemejanan p.o pada tikus = 10 mL/ kgBB

Rumus perhitungan larutan stok = $\frac{\text{Dosis (X mg/kgBB)}}{\text{Volume pemejanan (10 mL/kgBB)}}$

Perhitungan larutan stok dibuat untuk 7 tikus (dilebihkan dari jumlah tikus dalam setiap kelompok yaitu 5 tikus)

a. Larutan stok untuk dosis 600 mg/ kgBB tikus.

Dosis 600 mg/ kgBB = $\frac{600 \text{ mg/kgBB}}{10 \text{ mL/kgBB}}$

= 60 mg/mL

Volume total stok selama 3 hari perlakuan = 2 mL × 3 (hari) × 7 (tikus) = 42 mL

Jadi larutan stok ekstrak etanol daun yacon (*Smallanthus sonchifolius)* yang dibutuhkan untuk kelompok ini selama 3 hari perlakuan adalah 3000 mg /50 mL (digunakan labu takar 50 mL).

b. Larutan stok untuk dosis 150 mg/ kgBB tikus.

$$\text{Dosis 150 mg/kgBB} = \frac{150\ \text{mg/kgBB}}{10\ \text{mL/kgBB}}$$

$$= 15\ \text{mg/mL}$$

Volume total stok selama 3 hari perlakuan = 2 mL × 3 (hari) × 7 (tikus) = 42 mL

Jadi larutan stok ekstrak etanol daun yacon (*Smallanthus sonchifolius)* yang dibutuhkan untuk kelompok ini selama 3 hari perlakuan adalah 750 mg /50 mL (digunakan labu takar 50 mL).

c. Larutan stok untuk dosis 450 mg/ kgBB tikus.

$$\text{Dosis 450 mg/kgBB} = \frac{450\ \text{mg/kgBB}}{10\ \text{mL/kgBB}}$$

$$= 45\ \text{mg/mL}$$

Volume total stok selama 7 hari perlakuan = 2 mL × 7 (hari) × 7 (tikus) = 42 mL

Jadi larutan stok ekstrak etanol daun yacon (*Smallanthus sonchifolius)* yang dibutuhkan untuk kelompok ini selama 3 hari perlakuan adalah 2250 mg /50 mL (digunakan labu takar 50 mL).

d. Total kebutuhan ekstrak.

Jumlah ekstrak etanol 70% daun yacon *(Smallanthus sonchifolius*) yang dibutuhkan pada semua kelompok perlakuan selama 3 hari adalah 6 gram.

9. Pembuatan larutan stok dari ekstrak etanol 70% daun pahitan *(Tihonia diversifolia).*

Volume pemejanan p.o pada tikus = 10 ml/kgBB

$$\text{Rumus perhitungan larutan stok} = \frac{\text{Dosis (X mg/kgBB)}}{\text{Volume pemejanan (10 mL/kgBB)}}$$

Perhitungan larutan stok dibuat untuk 7 tikus (dilebihkan dari jumlah tikus dalam setiap kelompok yaitu 5 tikus)

a. Larutan stok untuk dosis 1050 mg/kgBB tikus.

$$\text{Dosis 1050 mg/kgBB} = \frac{1050\ \text{mg/kgBB}}{10\ \text{mL/kgBB}}$$

$$= 105\ \text{mg/mL}$$

Volume total stok selama 3 hari perlakuan = 2 mL × 3 (hari) × 7 (tikus) = 42 mL

Jadi larutan stok ekstrak etanol daun paitan (*Tithonia divesifolia*) yang dibutuhkan untuk kelompok ini selama 3 hari perlakuan adalah 5250 mg /50 mL (digunakan labu takar 50 mL).

b. Larutan stok untuk dosis 262,5 mg/kgBB tikus.

$$\text{Dosis 262,5 mg/kgBB} = \frac{262{,}5\ \text{mg/kgBB}}{10\ \text{mL/kgBB}}$$

$$= 26{,}25\ \text{mg/mL}$$

Volume total stok selama 3 hari perlakuan = 2 mL × 3 (hari) × 7 (tikus) = 42 mL

Jadi larutan stok ekstrak etanol daun paitan (*Tithonia divesifolia*) yang dibutuhkan untuk kelompok ini selama 7 hari perlakuan adalah 1312,5 mg /50 mL (digunakan labu takar 50 mL).

c. Larutan stok untuk dosis 787,5 mg/kgBB tikus.

$$\text{Dosis 787,5 mg/kgBB} = \frac{787{,}5\ \text{mg/kgBB}}{10\ \text{mL/kgBB}}$$

$$= 78{,}75\ \text{mg/mL}$$

Volume total stok selama 3 hari perlakuan = 2 mL × 3 (hari) × 7 (tikus) = 42 mL

Jadi larutan stok ekstrak etanol daun paitan (*Tithonia divesifolia*) yang dibutuhkan untuk kelompok ini selama 3 hari perlakuan adalah 3937,5 mg /50 mL (digunakan labu takar 50 mL).

e. Total kebutuhan ekstrak.

Jumlah ekstrak etanol 70% daun paitan *(Tithonia diversifolia*) yang dibutuhkan pada semua kelompok perlakuan selama 3 hari adalah 10.5 gram.

10. Penetapan dosis glibenklamid

Pada penelitian ini, kontrol positif yang digunakan adalah glibenklamid. Adapun Dosis glibenklamid yang digunakan sebesar 0,09 mg/ 200 gBB didapatkan dari perhitungan sebagai berikut :

Dosis pemakaian glibenklamid pada manusia (*initial dose*) 5 mg/70 kg BB[(1)].

Dosis untuk tikus = 5 mg/70KgBB × 0,018 = 0,45 mg /kgBB.

11. Pembuatan larutan stok glibenklamid

Volume pemejanan p.o pada tikus = 10 ml/kgBB

Rumus perhitungan larutan stok = $\frac{\text{Dosis (X mg/kgBB)}}{\text{Volume pemejanan (10 mL/kgBB)}}$

Perhitungan larutan stok dibuat untuk 7 tikus (dilebihkan dari jumlah tikus dalam setiap kelompok yaitu 5 tikus)

Volume pemejanan p.o pada tikus = 10 ml/kgBB

Dosis 0,45 mg/ 200 gBB = $\frac{0{,}45 \text{ mg/kgBB}}{10 \text{ mL/kgBB}}$

= 0,045 mg/mL

Volume total stok selama 3 hari perlakuan = 2 mL × 2 (2 kali sehari) × 3 (hari) × 7 (tikus) = 84 mL

Jadi larutan stok glibenklamid yang dibutuhkan untuk kelompok ini selama 3 hari perlakuan adalah 4,5 mg /100 mL (digunakan labu takar 100 mL).

12. Pembuatan suspensi CMC 0,5 %

Ditimbang serbuk CMC sebanyak 0,5 gram, kemudian serbuk tersebut dimasukkan kedalam 100 mL air mendidih, selanjutnya campuran tersebut diaduk hingga membentuk larutan yang jernih.

13. Pembuatan dapar (NaCl 0,9 %)

Ditimbang 0,9 gram NaCl kemudian dimasukan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan *aquadest* hingga tanda batas.

14. Penetapan dosis aloksan

Dosis aloksan yang digunakan adalah 150 mg/kgBB tikus dan 75 mg/kgBB tikus.

15. Kriteria inklusi penelitian.

Tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar. Penelitian ini menetapkan dua kali penginklusian subjek uji. Kriteria inklusi awal pada hari ke-0 adalah tikus berusia 7-9 minggu, berat badan 180-220 gram, kadar glukosa darah puasa selama 15 jam $\leq$132 mg/dL[(44)]. Setelah dipilih sejumlah tikus yang memenuhi kriteria inklusi awal, kemudian tikus diinduksi dengan aloksan untuk diukur kadar glukosa darah puasa tikus. Pada tahap ini tikus dinyatakan masuk dalam kriteria inklusi jika kadar glukosa darah puasa selama 15 jam $\geq$ 132 mg/dL[(44)].

16. Induksi hiperglikemia pada tikus

Pada penelitian ini tikus dikatakan hiperglikemia (memenuhi kriteria inklusi) jika kadar glukosa darahnya $\geq$132 mg/dL[(44)]. Tahap ini diawali dengan memuasakan tikus jantan putih selama 15 jam, kemudian tikus diinduksi aloksan 150 mg/kgBB secara intraperitoneal (i.p) yang dilarutkan dalam dapar NaCL. Setelah 72 jam (3 hari), tikus diberikan kembali aloksan 75 mg/kgBB supaya kadar hiperglikemia pada tikus stabil. 24 jam (1 hari) kemudian dilakukan pengambilan darah tikus melalui sinus obtalis mata. Darah disentrifuge untuk diambil serumnya dan dilakukan pengukuran kadar glukosa darah.

17. Perlakuan dengan ekstrak ekstrak etanol 70% daun yacon *(Smallanthus sonchifolius*) dan daun paitan *(Tithonia diversifolia).*

Tikus jantan galur Wistar pada kelompok perlakuan I diberi ekstrak etanol 70% daun yacon *(Smallanthus sonchifolius*) dengan dosis tunggal sebesar 600 mg/kgBB[6]. Tikus jantan galur Wistar pada kelompok perlakuan II diberi ekstrak etanol 70% daun paitan (*Tithonia diversifolia)* dengan dosis tunggal sebesar 1050 mg/kgBB[9]. Tikus jantan galur Wistar pada kelompok perlakuan III diberi ekstrak etanol 70% daun yacon *(Smallanthus sonchifolius*) dan daun pahitan (*Tithonia diversifolia)* dengan perbandingan dosis 25%:75% yang dihitung dari dosis tunggal masing-masing ekstrak tanaman, sehingga didapat dosis masing-masing ekstrak sebesar 150 mg/kgBB dan 787,5 mg/kgBB. Tikus jantan galur Wistar pada kelompok perlakuan IV diberi ekstrak etanol 70% daun yacon *(Smallanthus sonchifolius*) dan daun pahitan (*Tithonia diversifolia)* dengan perbandingan dosis 75%:25% yang dihitung dari dosis tunggal masing-masing ekstrak tanaman, sehingga didapat dosis masing-masing ekstrak sebesar 450 mg/kgBB dan 262,5 mg/kgBB. Pemberian ekstrak dilakukan secara peroral (p.o) selama 7 hari berturut-turut setiap pukul 09.00 WIB.

18. Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah acak lengkap pola searah, dengan menggunakan 35 tikus jantan galur Wistar yang dibagi menjadi 7 kelompok. Adapun pembagian kelompoknya adalah sebagai berikut :

a. Kelompok I (Kontrol normal) : Tikus diberi pakan BR-2 dan minum *ad libitum* dari hari ke-0 sampai hari ke-10.
b. Kelompok II (Kontrol positif) : Tikus diberi aloksan dosis 150 mg/kgBB pada hari ke-0, 3 hari setelahnya diberikan aloksan dosis 75 mg/kgBB. Kemudian diberi Glibenklamid pada hari ke-4 sampai hari ke-10.
c. Kelompok III (Kontrol negatif) : Tikus diberi aloksan dosis 150 mg/kgBB pada hari ke-0, 3 hari setelahnya diberikan aloksan dosis

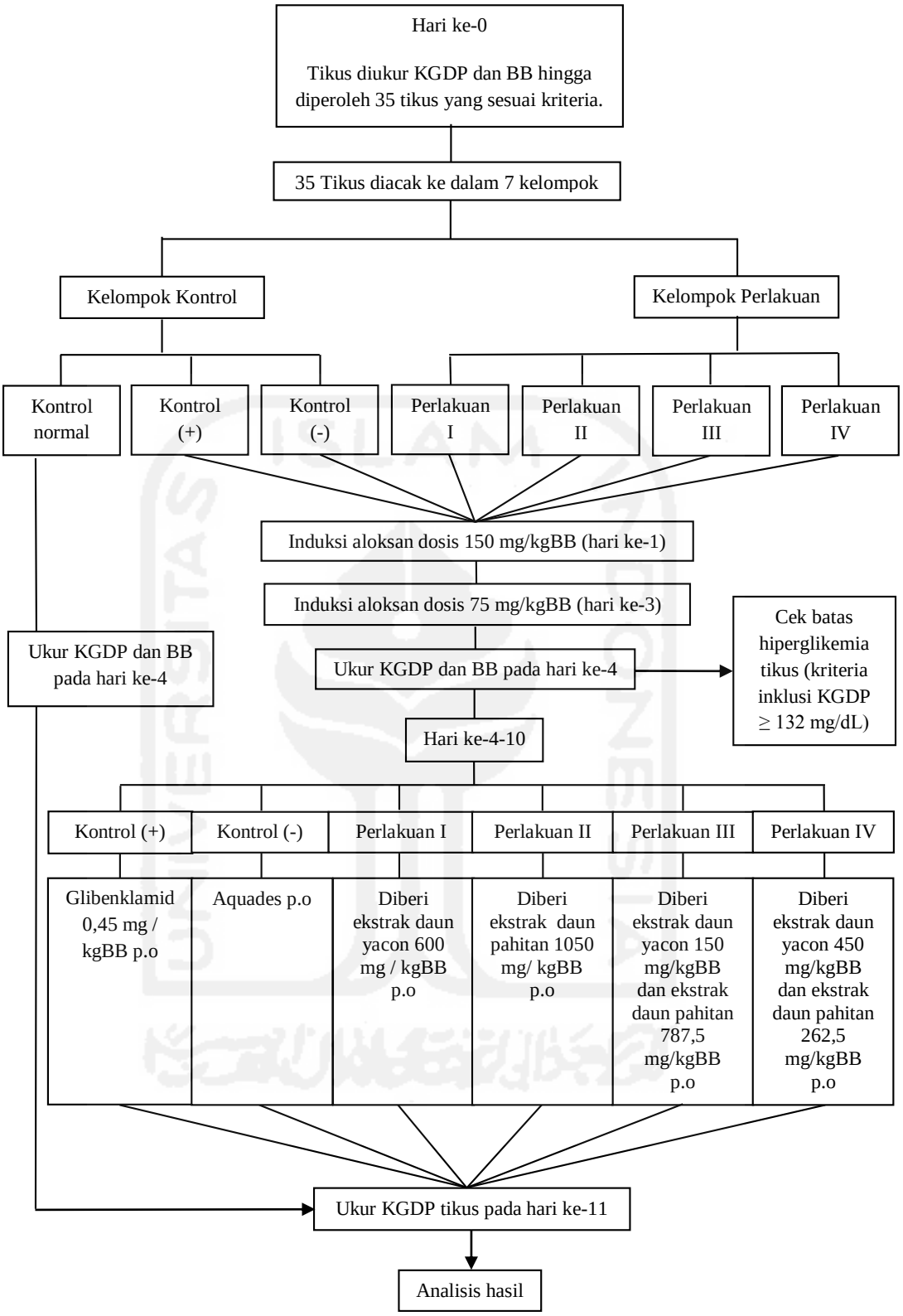
75 mg/kgBB, pada hari ke-4 sampai hari ke-10 diberi pakan BR-2 dan minum *ad libitum*.

d. Kelompok IV (Perlakuan I) : Tikus diberi aloksan dosis 150 mg/kgBB pada hari ke-0, 3 hari setelahnya diberikan aloksan dosis 75 mg/kgBB. Kemudian diberi ekstrak etanol 70% daun yacon (*Smallantus sonchifolius)* dosis 600 mg/kgBB (p.o) dari hari ke-4 sampai hari ke-10.
e. Kelompok V (Perlakuan II) : Tikus diberi aloksan dosis 150 mg/kgBB pada hari ke-0, 3 hari setelahnya diberikan aloksan dosis 75 mg/kgBB. Kemudian diberi ekstrak etanol 70% daun pahitan (*Tithonia divesifolia)* dosis 1050 mg/kgBB (p.o) dari hari ke-4 sampai hari ke-10.
f. Kelompok VI (Perlakuan III) : Tikus diberi aloksan dosis 150 mg/kgBB pada hari ke-0, 3 hari setelahnya diberikan aloksan dosis 75 mg/kgBB. Kemudian diberi ekstrak etanol 70% daun yacon (*Smallantus sonchifolius)* dosis 150 mg/kgBB dan ekstrak etanol 70% daun pahitan (*Tithonia divesifolia)* dosis 787,5 mg/kgBB (p.o) dari hari ke-4 sampai hari ke-10.
g. Kelompok VII (Perlakuan IV) : Tikus diberi aloksan dosis 150 mg/kgBB pada hari ke-0, 3 hari setelahnya diberikan aloksan dosis 75 mg/kgBB. Kemudian diberi kombinasi ekstrak etanol 70% daun yacon (*Smallantus sonchifolius)* dosis 450 mg/kgBB dan ekstrak etanol 70% daun pahitan (*Tithonia divesifolia)* dosis 262,5 mg/kgBB (p.o) dari hari ke-4 sampai hari ke-10.

19. Pengumpulan data

Sebelum melakukan pengambilan data, tikus dipuasakan selama 15 jam. Selanjutnya darah tikus sebanyak 1 mL diambil melalui sinus obtalis mata untuk dilakukan pengukuran kadar glukosa darah. Pengambilan darah dilakukan di laboratorium pra klinik Universitas Islam indonesia, kemudian darah yang didapat diambil bagian serumnya untuk selanjutnya dibawa LPPT-UGM untuk dilakukan pengukuran kadar glukosa darah. Pengukuran kadar glukosa darah puasa pada penelitian ini menggunakan metode *Glucose*

Oxidatif Diasys–Phenyl Aminoantipirin (GOD-PAP). Serum sebanyak 1 µl kemudian direaksikan dengan reagen GOD-PAP sebanyak 1 ml sehingga menghasilkan warna merah yang kemudian akan diukur absorbansinya pada λ 546 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh akan setara dengan kadar glukosa dalam darah. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan pada hari ke-0, hari ke-4, dan hari ke-11.



Gambar 5. Skematika Penelitian

C. Analisis Hasil

1. Kenaikan kadar glukosa darah oleh induksi aloksan

Data yang dianalisis adalah data hasil pengukuran kadar glukosa darah puasa (KGDP) sebelum diinduksi aloksan pada hari ke-0 dan setelah diinduksi aloksan pada hari ke-4 dengan menggunakan :

a. Perhitungan persentase peningkatan KGDP rata-rata masing-masing kelompok setelah diinduksi aloksan yang dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$= \frac{\text{KGDP hari ke 4} - \text{KGDP hari ke 0}}{\text{KGDP hari ke 0}} \times 100\ \%$$

b. Uji statistika *paired T-test* yang digunakan untuk mengetahui signifikansi perbedaan KGDP pada hari ke-0 (sebelum induksi aloksan) dengan hari ke-4 (setelah induksi aloksan).

2. Penurunan kadar glukosa darah setelah perlakuan

Data yang dianalisis adalah data hasil pengukuran KGDP sebelum perlakuan pada hari ke-4 dan sebelum perlakuan pada hari ke-11 dengan menggunakan :

a. Perhitungan persentase penurunan KGDP tikus rata-rata masing-masing kelompok setelah diinduksi aloksan yang dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$= -\frac{\text{KGDP hari ke 4} - \text{KGDP hari ke 11}}{\text{KGDP hari ke 4}} \times 100\ \%$$

b. Uji statistika *paired T-test* yang digunakan untuk mengetahui signifikansi perbedaan KGDP pada hari ke-4 (sebelum perlakuan) dengan hari ke-11 (setelah perlakuan).

c. Uji *One Way Anova* kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoct* (Tukey HSD tes) yang digunakan untuk untuk mengetahui efektifitas antar masing-masing dosis ekstrak serta efektifitas masing-masing

dosis ekstrak dibandingkan dengan kontrol positif (glibenklamid) pada hari ke-11(setelah perlakuan).

d. Membandingkan KGDP pada hari ke-11(setelah perlakuan) dengan KGDP normal (85-132 mg/dL)[44].