

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Sampel dan Lokasi Penelitian

Sampel dari penelitian ini adalah daun murbei (*Morus australis* Poir) yang diperoleh dari perkebunan murbei di Kampung Cibeureum, Cisurupan – Garut. Untuk memastikan identitas dari tanaman murbei yang digunakan maka dilakukan uji determinasi. Determinasi dilakukan di LIPI Pusat Penelitian Biologi Cibinong, Bogor (lampiran 1). Selain itu hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan galur Swiss Webster dengan bobot badan rata-rata 20 – 40 gram yang diperoleh dari Pusat Antar Universitas Institut Teknologi Bandung (PAU ITB).

Lokasi penelitian dilaksanakan di Laboratorium Riset, Laboratorium Kimia Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia UPI Bandung, Laboratorium Kimia LIPI Serpong, dan Laboratorium Farmakologi Farmasi Universitas Garut (UNIGA).

3.2. Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1. Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat gelas, penguap berputar vakum (*vacuum rotary evaporator*), pompa vakum, satu set alat Kromatografi Lapis Tipis (KLT), satu set alat Kromatografi Vakum Cair (KVC), satu set alat Kromatografi Kolom Tekan (KKT), satu set alat kromatografi

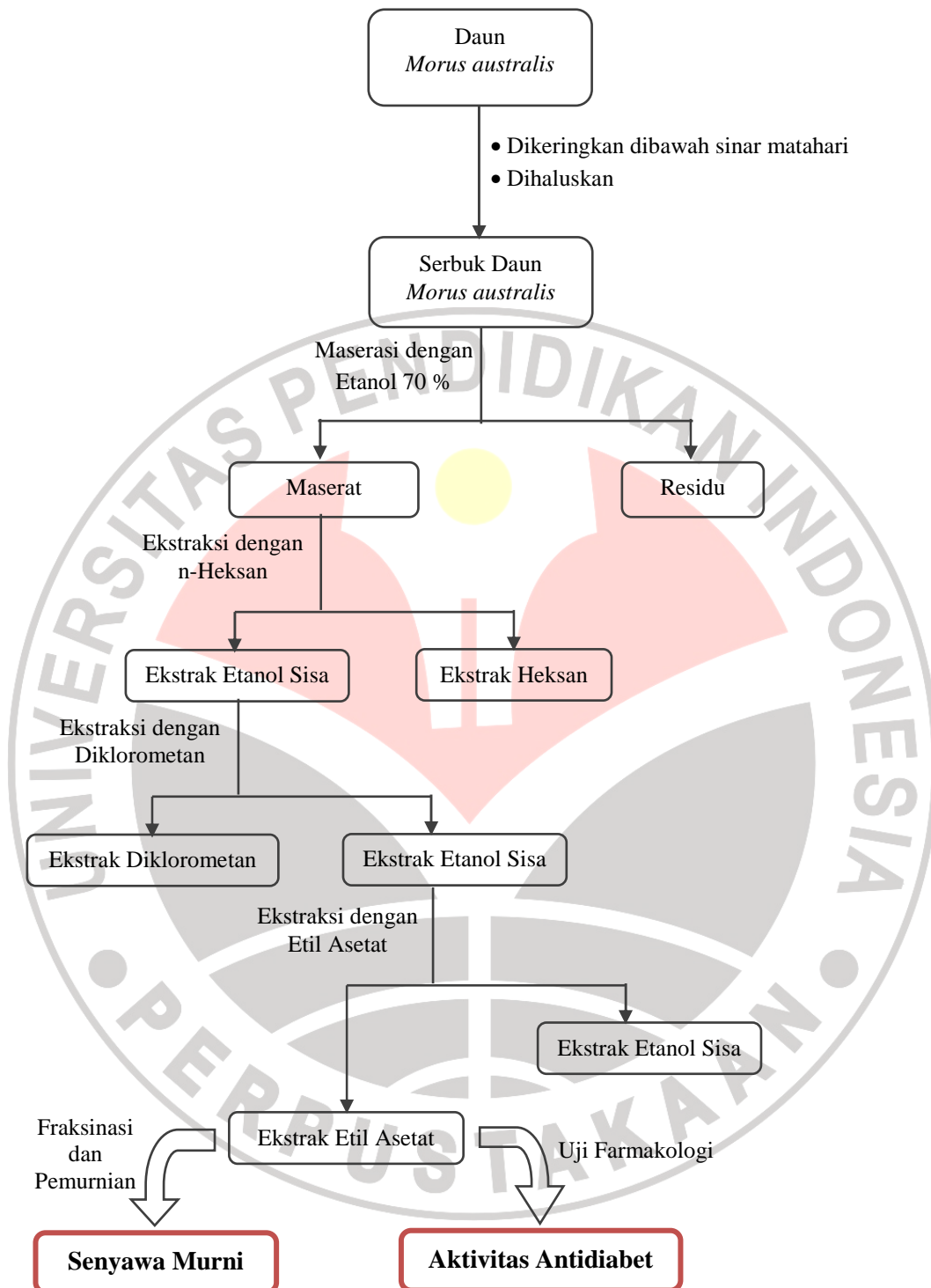
preparatif, spektrofotometer ^1H NMR JEOL JNM ECA-500 MHz, dan spektrofotometer FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) Shimadzu 8400.

3.2.2. Bahan

Pada penelitian ini, bahan utama yang digunakan adalah daun murbei (*M. australis* Poir). Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan teknis dan bahan pra analisis (p.a). Bahan dengan kualitas teknis didestilasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Bahan-bahan yang digunakan adalah metanol, etanol, n-heksan, etil asetat, aseton, diklorometan, KI, HgCl_2 p.a, HCl pekat, serbuk Mg p.a, CH_3COOH glasial, H_2SO_4 pekat, FeCl_3 p.a, aquades, kertas saring, silika gel Merck 60G, silika gel Merck 60 (35 – 70 mesh), silika gel Merck 60 (70 – 230 mesh), dan silika gel 60 PF₂₅₄.

3.3. Metodologi Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan. Tahapan tersebut yaitu penyiapan sampel, isolasi senyawa, *screening* fitokimia, karakterisasi senyawa, dan uji aktivitas antidiabet. Bagan alir penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian

3.3.1 Penyiapan Sampel

Tahap awal penelitian dimulai dari penyiapan sampel berupa daun *M. australis* yang diperoleh dari perkebunan murbei di Kampung Cibeureum, Cisurupan – Garut. Daun *M. australis* yang akan digunakan dibersihkan terlebih dahulu dari kotoran yang menempel. Setelah itu, dikeringkan dengan bantuan sinar matahari sampai kering. Sampel yang telah kering kemudian dihaluskan dengan mesin penggiling hingga menjadi serbuk. Kemudian serbuk daun *M. australis* yang diperoleh ditimbang untuk mengetahui massa daun dalam kondisi yang telah dikeringkan.

3.3.2 Isolasi Senyawa dari Daun *Morus australis*

Isolasi senyawa dari daun tumbuhan *M. australis* dilakukan dengan cara ekstraksi (maserasi) menggunakan pelarut etanol 70% (3 x 9 L) berturut-turut selama 24 jam pada suhu kamar. Setelah perendaman dilakukan, dilanjutkan dengan penyaringan menggunakan corong buchner dan filtratnya dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak etanol pekat.

Ekstrak etanol pekat dilarutkan dengan air hangat (1:1) kemudian difraksinasi cair-cair dengan corong pisah menggunakan pelarut dengan kepolaran bertingkat berturut-turut dengan pelarut n-heksan, diklorometan, dan etil asetat masing-masing sebanyak 3 x 250 mL sehingga diperoleh ekstrak heksan, diklorometan, dan etil asetat. Ekstrak etil asetat yang diperoleh kemudian

dipekatkan dengan cara penguapan menggunakan alat *rotary evaporator vacuum* sampai diperoleh massa yang tetap.

Dilanjutkan dengan pemisahan dan pemurnian senyawa menggunakan berbagai teknik kromatografi seperti Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kromatografi Vakum Cair (KVC), Kromatografi Kolom Tekan (KKT), dan kromatografi preparatif.

3.3.3 *Screening* Fitokimia

Untuk mengetahui karakterisasi dari senyawa yang terdapat dalam ekstrak etil asetat maka dilakukan uji fitokimia. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak tersebut. Ekstrak etil asetat yang diperoleh diidentifikasi komponen fitokimianya dengan metode pereaksi warna. Senyawa yang diperiksa adalah senyawa golongan alkaloid, tanin, saponin, terpenoid, steroid, dan flavanoid. Prosedur kerja yang dilakukan ialah sebagai berikut :

1. Pemeriksaan Alkaloid

Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan cara ekstrak etil asetat sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 5 tetes kloroform dan beberapa tetes Pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya alkaloid. Pembuatan Pereaksi Mayer yaitu 1 gram KI dilarutkan dalam 20 mL aquades sampai semuanya melarut. Lalu ke dalam larutan KI tersebut dimasukkan 0,271 gram HgCl_2 sampai larut.

2. Pemeriksaan Tanin

Pemeriksaan tanin dilakukan dengan cara ekstrak etil asetat sebanyak 1 mL ditambahkan dengan beberapa tetes FeCl_3 1%. Timbulnya warna biru tua menunjukkan adanya senyawa tanin (fenolik).

3. Pemeriksaan Saponin

Pemeriksaan saponin dilakukan dengan cara ekstrak etil asetat sebanyak 2 mL ditambahkan dengan 2 mL air, kemudian dikocok dengan kuat selama 10 menit. Timbulnya buih atau busa menunjukkan adanya saponin.

4. Pemeriksaan Terpenoid dan Steroid

Pemeriksaan terpenoid dan steroid dilakukan dengan cara ekstrak etil asetat sebanyak 1 mL ditambahkan 1 mL CH_3COOH glasial dan 1 mL H_2SO_4 pekat. Timbulnya warna merah menunjukkan adanya terpenoid sedangkan warna biru atau ungu menunjukkan adanya steroid.

5. Pemeriksaan Flavonoid

Pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan cara ekstrak etil asetat sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 1 gram serbuk Mg dan 190 mL HCl pekat. Timbulnya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

3.3.4 Karakterisasi senyawa

Karakterisasi senyawa dilakukan dengan spektroskopi FTIR untuk mengetahui gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa ekstrak etil asetat daun *M. australis*. Penentuan gugus-gugus fungsi dilakukan dengan menggunakan spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) Shimadzu 8400. Selain itu digunakan juga spektroskopi ^1H NMR untuk mendapatkan informasi mengenai senyawa yang mengandung hidrogen, yaitu mengenai jumlah, jenis, dan kedudukan relatif dari hidrogen. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer ^1H NMR JEOL JNM ECA-500 MHz.

3.3.5 Uji Aktivitas Antidiabet

Pengujian efek antidiabetes ekstrak etil asetat daun *M. australis* dilakukan dengan metode induksi diabetes aloksan. Parameter yang diamati adalah kadar glukosa darah yang diukur dengan menggunakan alat Optium Omega®. Prinsip metode induksi diabetes aloksan adalah induksi diabetes pada mencit yang diberikan suntikan aloksan monohidrat dengan dosis 70 mg/kg bobot badan. Aloksan sebagai diabetogen mampu menginduksi diabetes pada mencit. Aktivitas antidiabetes dari bahan uji dapat dilihat dari parameter penurunan kadar glukosa darah pada mencit diabetes yang dibandingkan terhadap kelompok kontrol. Pemberian oral bahan uji dan pembanding dilakukan setiap hari. Pengukuran glukosa dilakukan sebelum perlakuan, dan satu jam setelah pemberian bahan uji hari ke 1, 7, dan 14. Selama perlakuan, bobot badan mencit diabetes aloksan ditimbang setiap hari. Prosedur pengujian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

3.3.5.1 Penyiapan Hewan

Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan galur Swiss Webster dengan bobot rata-rata 20 – 40 gram. Mencit jantan yang diperoleh dari Pusat Antar Universitas Institut Teknologi Bandung (PAU ITB) diadaptasikan di Laboratorium Farmasi UNIGA selama kurang lebih tujuh hari. Sebelum dilakukan percobaan bobot badan ditimbang setiap hari dan diamati perilakunya. Hewan dinyatakan sehat dan dapat digunakan dalam percobaan jika selama masa pemeliharaan bobot badan tetap atau bertambah dan secara visual tidak menunjukkan gejala-gejala tidak sehat.

3.3.5.2 Induksi Aloksan pada Mencit

Aloksan monohidrat dosis 70 mg/kg bb diberikan secara intra vena melalui ekor mencit. Perkembangan diabetes diuji setiap hari dengan menentukan kadar gula darah dalam urin dengan menggunakan stik glukotest. Mencit yang positif diabetes pada stik glukotest akan memberikan warna hijau. Mencit-mencit diabetes kemudian dikelompokkan menjadi lima kelompok, tiap kelompok terdiri dari lima ekor mencit.

3.3.5.3 Pengujian Efek Antidiabetes Ekstrak Etil Asetat Daun *M. australis*

Mencit diabetes aloksan dipuaskan selama 16 jam, kemudian diambil darah mencit sebagai kadar glukosa awal. Mencit dibagi menjadi enam kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor mencit, kepada masing-masing kelompok mencit diberi perlakuan sebagai berikut:

- Kelompok I : diberi air suling sebagai kelompok kontrol negatif
- Kelompok II : diberi suspensi tragakan 2% sebagai kelompok kontrol positif
- Kelompok III : diberi pembanding glibenkamid dosis 5 mg/kg bb
- Kelompok IV : diberi ekstrak etil asetat daun *M. australis* dosis 50 mg/kg bb
- Kelompok V : diberi ekstrak etil asetat daun *M. australis* dosis 100 mg/kg bb
- Kelompok VI : diberi ekstrak etil asetat daun *M. australis* dosis 200 mg/kg bb

Sediaan uji diberikan secara peroral sebanyak 0,5 mL/20 g bb satu kali sehari terhadap semua kelompok perlakuan selama 14 hari. Pengambilan cuplikan darah dilakukan dengan cara memotong sedikit bagian ekor mencit. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan sebelum pemberian zat uji dan pada jam ke-1 setelah pemberian bahan uji pada hari ke 1, 7, dan 14.