

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun beluntas (*Pluchea indica* Less.) yang diperoleh dari Desa Gemblengmulyo, Pancur, Kabupaten Rembang, Jawa Tengah.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan adalah daun muda ruas satu sampai dengan enam yang diambil dari tanaman beluntas (*Puchea indica* Less.) dengan spesifikasi daun yang masih segar, dan terbebas dari hama dan penyakit. Pengambilan sampel diambil daerah Desa Gemblengmulyo, Pancur, Kabupaten Rembang, Jawa Tengah pada bulan Januari 2019.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dari penelitian ini adalah pengaruh ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* Less.) terhadap daya ingat tikus putih jantan galur wistar yang diinduksi oleh timbal (II) asetat.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang biasa diubah-ubah yang dimaksudkan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi dosis ekstrak metanol daun beluntas ruas satu sampai dengan enam 50; 100; 200 mg/kgBB yang diberikan secara *oral*.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek peningkatan

daya ingat yang diukur berdasarkan angka kesalahan tipe B dan waktu pengambilan makanan.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah waktu panen, waktu pangan, waktu aklitipasi, kondisi hewan dan kandang, ketepatan dosis, kebenaran pembuatan simplisia dan ekstrak.

3. Definisi operasional variable utama

Pertama, daun beluntas adalah ruas satu sampai dengan enam pada daun beluntas yang segar dan tidak rusak yang diperoleh dari daerah Desa Gemblengmulyo, Pancur, Kabupaten Rembang, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk simplisia adalah serbuk simplisia kering daun beluntas yang dihaluskan dengan penggiling dan blender kemudian diayak dengan mesh 40.

Ketiga, ekstrak metanol daun beluntas adalah ekstrak dari penarikan sari daun beluntas dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol dan kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C kecepatan 30-40 rpm.

Keempat, dosis uji ekstrak metanol daun beluntas adalah variasi dosis ekstrak metanol beluntas yang diujikan pada penelitian ini, yaitu 50; 100; 200 mg/kgBB yang diberikan secara *peroral* (p.o).

Kelima, suplemen *Ginkgo biloba* adalah suplemen yang berfungsi sebagai kontrol positif pada penelitian ini dengan dosis 75 mg/70kg BB manusia yang diberikan secara *peroral* (p.o).

Keenam, timbal (II) asetat adalah zat penginduksi yang berfungsi menurunkan daya ingat hewan uji melalui pembentukan radikal bebas dengan dosis 100 mg/KgBB yang diberikan secara *interperitoneal*(i.p.).

Ketujuh, hewan uji yang dipakai adalah tikus galur *wistar* dengan berat 180-200 gram usia lebih dari 90 hari.

Kedelapan, memori spasial adalah memori yang digunakan untuk mengingat dan mengenali bentuk, jarak, luas, arah dan kondisi lingkungan sekitar.

Kesembilan, radikal bebas adalah suatu senyawa yang dapat menurunkan daya ingat dengan merusak sistem syaraf pada otak.

Kesepuluh, antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat menangkap radikal bebas sehingga menyebabkan regenerasi sel saraf pada otak dan meningkatkan daya ingat.

Kesebelas, *radial arm maze* adalah suatu metode pengujian untuk mengetahui efek suatu sediaan uji memiliki aktivitas peningkatan daya ingat atau tidak.

Keduabelas, angka kesalahan tipe B adalah parameter pertama yang diamati berdasarkan jumlah tikus memasuki lengan lebih dari separuh panjang lengan tetapi tidak memakan umpan yang disediakan (a) dibagi dengan jumlah lengan yang dimasuki (b) dikalikan dengan 100 % .

Ketigabelas, waktu menemukan makanan adalah parameter kedua yang diamati berdasarkan waktu yang diperlukan tikus untuk menemukan makanan pada salah satu lengan.

Keempatbelas, dosis efektif adalah dosis terkecil dengan parameter rata-rata AUC_{kum} angka kesalahan tipe B dan waktu menemukan makanan yang sebanding dengan kontrol positif dan berbeda makna dengan kontrol negatif dengan % penurunan angka kesalahan tipe B paling besar.

C. Bahan dan Alat

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah *radial arm maze*, bejana maserasi, erlenmeyer, *waterbath*, *rotary evaporator*, *moisture balance*, gelas ukur, pipet volume, *beaker glass*, stopwatch, batang pengaduk, corong, oven, pinset, neraca analitik, kandang tikus, spidol dan penggaris.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah daun beluntas ruas 1-6, kapsul *Ginkgo biloba*, aquadest, metanol, timbal (II) asetat, CMC, larutan mayer, larutan dragendrof, larutan Bouchardad, asam asetat pekat, asam sulfat pekat, asam klorida pekat, asam klorida 0,1 N, larutan amonia 10%, amil alkohol, asam formiat, serbuk natrium anhidrat, serbuk Mg, toluene, pakan tikus.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahapan pertama pada penelitian yaitu determinasi tanaman yang dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman beluntas sesuai kepustakaan dan dibuktikan di bagian Biologi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret..

2. Pengambilan bahan

Daun beluntas diambil di daerah Rembang, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan adalah daun segar beluntas ruas satu sampai dengan enam yang kemudian dicuci dan dipotong kecil-kecil untuk proses pengeringan.

3. Pengeringan bahan

Daun beluntas yang sudah bersih dan telah dipotong kecil-kecil, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 45°C sampai didapatkan daun yang kering.

4. Pembuatan serbuk simplisia

Pembuatan serbuk bertujuan agar luas partikel bahan yang kontak dengan larutan penyari dapat diperluas sampai penyarian berlangsung secara efektif. Setelah daun beluntas yang telah kering, digiling dengan mesin giling dan kemudian dihaluskan dengan diblender. Setelah itu, daun beluntas diayak dengan ayakan nomor 40.

5. Penentuan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun beluntas

Susut pengeringan adalah pengurangan berat bahan setelah dikeringkan. Hal ini untuk menghilangkan kadar air yang masih berada pada serbuk simplisia daun beluntas. Sebelum melakukan susut pengeringan, menimbang secara seksama serbuk daun beluntas sebanyak 2 gram. Kemudian diletakkan ke dalam *moisture balance* dengan suhu 105°C hingga bobot konstan dilakukan sebanyak 3 kali percobaan. Serbuk memenuhi syarat apabila didapatkan susut pengeringan dengan kadar tidak lebih dari 10% (Kemenkes RI 2013).

6. Penentuan kadar air serbuk daun beluntas

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi toluen. Toluena yang digunakan dijenuhkan dengan air terlebih dahulu, setelah itu dikocok dan didiamkan, kedua lapisan air dan toluene akan memisah kemudian air dibuang.

Sebanyak 10 gram serbuk ditimbang dengan seksama, kemudian dimasukkan pada labu alas bulat dimasukkan 100 ml toluene pada labu. Labu dipanaskan secara hati-hati selama 15 menit, setelah toluen mendidih atur penyulingan dengan kecepatan penyulingan kurang lebih 2 tetes/detik, hingga sebagian besar air tersuling. Kecepatan penyulingan ditingkatkan hingga kurang lebih 4 tetes/detik. Bagian pendingin pada alat dibilas dengan toluen jenuh air setelah semua air tersaring. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit, kemudian didinginkan tabung pada suhu ruang. Volume air dibaca setelah air dan toluene memisah secara sempurna.

7. Pembuatan ekstrak metanol daun beluntas

Pada pembuatan ekstrak metanol daun beluntas, dilakukan proses maserasi dengan perbandingan pelarut 1:10. Serbuk daun beluntas ditimbang sebanyak 1 bagian kemudian dimasukkan kedalam botol gelap dan ditambahkan dengan 10 bagian pelarut. Setelah itu ditutup dan direndam selama 6 jam sambil sekali-kali diaduk, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Setelah 24 jam berlalu, filtrat dipisahkan dengan cara filtrasi. Filtrasi dilakukan dengan cara menuangkan filtrat ke dalam botol gelap yang disaring dengan kain flannel. Ampas yang tersisa pada kain flannel direndam dengan 5 bagian pelarut. Kemudian dibiarkan selama 24 jam. Setelah 24 jam disaring dan filtrat pertama dan kedua dicampurkan. Filtrat kemudian dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator* dengan suhu 54°C dengan kecepatan 40 rpm. Setelah itu ekstrak yang telah didapatkan, dituang dan diuapkan dengan *waterbath* sehingga diperoleh ekstrak kental daun beluntas dengan perolehan rendemen tidak kurang dari 9,0% (Kemenkes RI 2013).

8. Identifikasi senyawa kimia daun beluntas

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk memastikan kebenaran zat kimia yang terkandung di dalam daun beluntas. Identifikasi dilakukan terhadap senyawa golongan alkaloid, triterpenoid, steroid, saponin, fenolik dan flavonoid.

8.1 Identifikasi alkaloid. Ekstrak diencerkan dengan air kemudian ditambahkan 1 ml HCl 2N, setelah itu dipanaskan selama 2 menit diatas penangas air kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat dipipet dan dimasukkan kedalam

tabung reaksi masing-masing sebanyak 3 tetes. Tabung pertama ditambahkan pereaksi Mayer dan tabung kedua ditambahkan pereaksi Bouchardat. Reaksi positif ditunjukkan apabila tabung pertama terdapat endapan putih yang menggumpal, sedangkan tabung kedua terbentuk endapan coklat (Adeanne *et al.* 2012).

8.2 Identifikasi steroid/triterpenoid. Pada identifikasi steroid dilakukan dua uji yaitu uji tabung dan KLT. Pada uji tabung, ekstrak dilarutkan dalam 10 ml metanol kemudian diuapkan di dalam cawan penguap sampai pekat. Residu yang didapat ditambahkan dengan 0,5 ml asam asetat anhidrat dan 0,5 ml kloroform. Setelah itu, larutan dipindahkan ke tabung reaksi dan ditambah dengan 2 ml asam sulfat pekat melalui dinding tabung reaksi. Hasil positif steroid jika terbentuk lapisan atas warna biru hingga hijau atau positif triterpenoid jika berwarna merah hingga ungu (Marliana *et al.* 2005). Pada uji KLT, ekstrak metanol daun beluntas dan pembanding (stigmasterol) dilarutkan dengan metanol, ditotolkan bersama-sama pada lempeng KLT dengan fase diam silica gel dan fase gerak kloroform dan methanol (9:1). Bercak yang dihasilkan diamati dengan penampang noda sinar ultraviolet 254 nm dan 366 nm dan disemprot dengan *Liebermen Bouchardat* (Yuda *et al.* 2017)

8.3 Identifikasi saponin. Ekstrak dilarutkan dalam metanol kemudian dididihkan dalam penangas air selama 5 menit, setelah dingin kemudian disaring, filtrat dikocok kuat-kuat dengan arah vertikal selama 1-2 menit, senyawa saponin dapat ditunjukkan dengan adanya busa setinggi 1cm yang stabil setelah dibiarkan selama 1 jam atau pada penambahan 1 tetes HCl 0,1N (Djamil dan Anelia 2009).

8.4 Identifikasi flavonoid. Pada identifikasi flavonoid dilakukan dua uji yaitu uji tabung dan KLT. Pada uji tabung, ekstrak dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan ditambahkan air panas, kemudian disaring. Filtrat dituang ke dalam tabung reaksi yang berisi butiran logam Mg, 1 ml larutan HCl 2N dan 5 ml amil alkohol dikocok kuat-kuat, warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Djamil dan Anelia 2009). Pada uji dengan KLT, ekstrak metanol daun beluntas dan pembanding (rutin) dilarutkan dengan methanol, ditotolkan bersama-sama pada lempeng KLT dengan fase diam silica gel dan fase gerak n-Butanol:Asam Asetat:Air(4:1:5). Bercak yang

dihasilkan diamati dengan penampak noda sinar ultraviolet 254 nm dan 366 nm dan disemprot dengan sitroborat (Haeria 2013).

8.5 Identifikasi tanin. Ekstrak dilarutkan dalam metanol kemudian dimasukan dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan pereaksi FeCl_3 dalam larutan etanol, hasil positif ditunjukkan dengan adanya warna hijau, merah ungu, biru dan hitam (Djamil dan Anelia 2009).

9. Penentuan dosis

8.1. Dosis sediaan. Dosis uji akan dibagi menjadi tiga varian dosis. Dosis ekstrak methanol daun beluntas (EMB) yang akan diberikan pada tikus mengacu pada orientasi dosis yaitu 50; 100; 200 mg/kgBB secara peroral. (Perhitungan dosis pada **Lampiran 14.1**)

8.2. Dosis *Ginkgo biloba*. Dosis satu kapsul *Ginkgo biloba* mengandung ekstrak 75 mg/70kg BB manusia. Dosis dikonversikan ke tikus menjadi 1,35 mg/200 gram BB tikus. (Perhitungan dosis pada **Lampiran 14.2**)

8.3. Dosis Pb (II) asetat. Pb (II) asetat berperan sebagai induksi penurunan daya ingat dan sebagai kontrol sakit. Dosis yang digunakan sebagai induksi penurunan daya ingat menurut penelitian Haider *et al.* (2013) adalah 100 mg/Kg BB tikus secara *interperitoneal* (i.p.). (Perhitungan dosis pada **Lampiran 14.3**)

10. Pemilihan dan aklimatisasi hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dengan bobot 180 gram sampai 200 gram usia lebih dari 90 hari. Sebelum dilakukan percobaan, tikus terlebih dahulu diaklimatisasi selama 1 minggu disesuaikan dengan kondisi lingkungan. Dipuaskan dengan diberikan makan dan minum.

11. Pengelompokkan hewan uji

Dalam penelitian ini digunakan tikus sebanyak 25 ekor dengan 5 kelompok uji, dengan masing-masing kelompok uji terdiri dari 5 ekor tikus. Kelompok 1 yaitu sebagai kontrol positif *Ginkgo biloba* (75 mg/70kgBB manusia), Kelompok 2 yaitu sebagai kontrol negatif diberi 1 ml CMC Na 0,5%. Kelompok 3 diberi ekstrak daun beluntas dosis 50 mg/kgBB. Kelompok 4 diberi

ekstrak daun beluntas dosis 100 mg/kgBB. Kelompok 5 diberik ekstrak daun beluntas dosis 200 mg/kgBB.

12. Perlakuan hewan uji

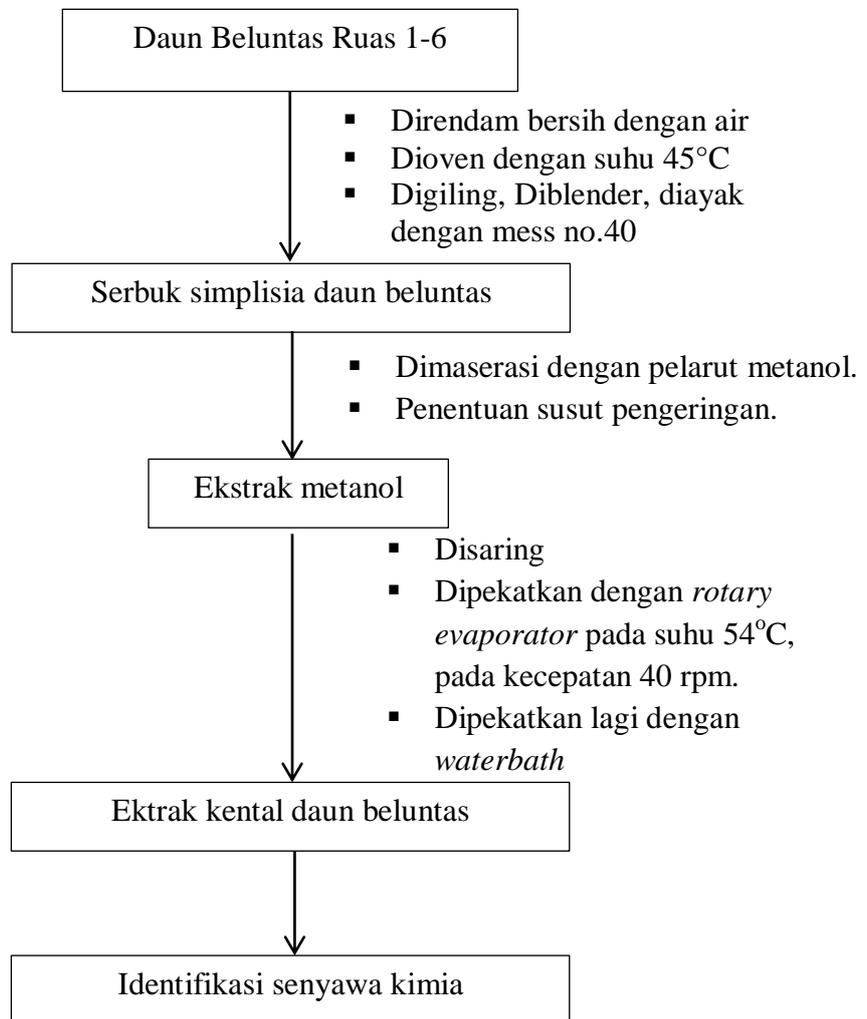
Pada metode penelitian menggunakan metode *radial arm maze* yang termodifikasi memiliki 3 tahap yaitu tahap pembelajaran selama 5 hari, tahap *pre-test* selama 12 hari, dan tahap *post-test* selama 12 hari dimana 12 jam sebelumnya dipuaskan terlebih dahulu.

Setelah dilakukan aklitimasi, hewan uji diberi latihan tanpa pemberian dosis apapun dengan *radial arm maze* selama 5 hari berturut turut. Pada hari pertama, tikus diletakkan pada bagian tengah *maze* untuk adaptasi selama 10 menit dengan masing-masing lengan tidak diberi umpan. Pada hari kedua, tikus diletakkan pada bagian tengah *maze* untuk adaptasi selama 10 menit dengan 4 lengan diberi umpan secara selang-seling antara satu lengan dengan lengan lainnya pada pintu masuk, bagian tengah dan ujung lengan. Pada hari ketiga dan keempat, tikus diletakkan pada bagian tengah *maze* untuk adaptasi selama 10 menit dengan 4 lengan diberi umpan secara selang-seling antara satu lengan dengan lengan lainnya pada bagian tengah dan ujung lengan. Pada hari kelima, tikus diletakkan pada bagian tengah *maze* untuk adaptasi selama 10 menit dengan 4 lengan diberi umpan secara selang-seling antara satu lengan dengan lengan lainnya pada bagian ujung lengan dan diamati parameter angka kesalahan tipe B dan waktu yang dibutuhkan tikus untuk menemukan makanan. Setelah perlakuan tikus diberikan makan dan minum (Narwanto *et al.* 2008; Zuniarto *et al.* 2017).

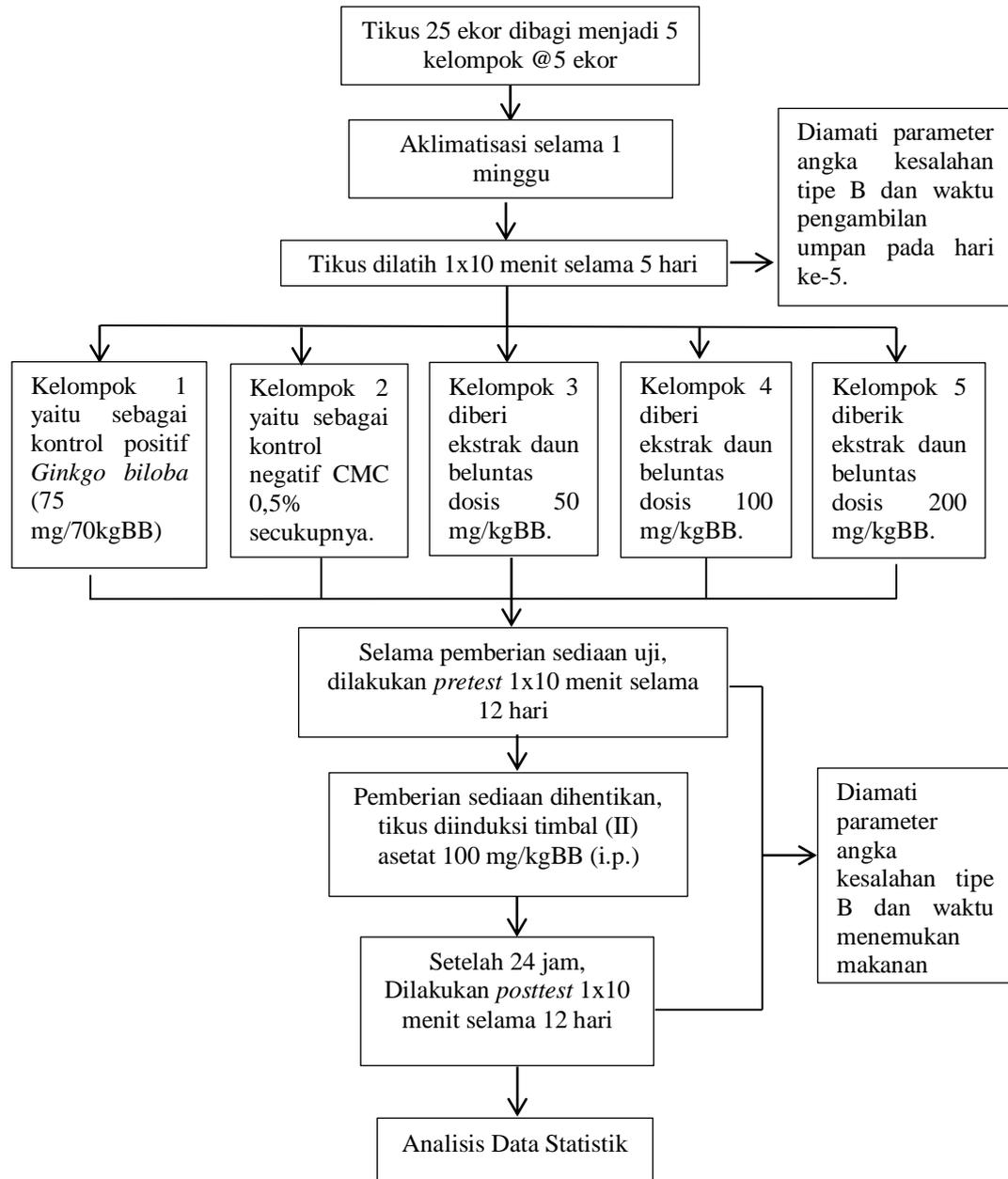
Setelah tahap pembelajaran selesai, masuk kedalam tahap *pre-test* selama 12 hari. Selama tahap ini, tikus diberikan dosis perlakuan sesuai kelompoknya masing-masing. Tikus diletakkan ditengah *maze* selama 10 menit dengan 4 lengan diberi umpan secara selang-seling antara satu lengan dengan lengan lainnya pada bagian ujung lengan. Parameter yang digunakan adalah parameter kesalahan tipe B dan waktu yang dibutuhkan tikus untuk menemukan makanan. Setelah perlakuan tikus diberikan makan dan minum (Narwanto *et al.* 2008; Zuniarto *et al.* 2017).

Setelah tahap *pre-test* selesai, pemberian dosis uji dihentikan. Semua kelompok uji di induksi dengan Pb asetat 100 mg/kg BB secara *interperitonal*. kemudian dimasukkan kedalam kandang dan setelah 24 jam dilakukan tahap *post-test*. Tahap *post-test* berlangsung selama 12 hari. Tikus diletakkan ditengah *maze* selama 10 dengan 4 lengan diberi umpan secara selang-seling antara satu lengan dengan lengan lainnya pada bagian ujung lengan. Parameter yang digunakan adalah parameter kesalahan tipe B dan waktu yang dibutuhkan tikus untuk menemukan makanan Setelah perlakuan tikus diberikan makan dan minum (Narwanto *et al.* 2008; Zuniarto *et al.* 2017).

E. Skema Penelitian



Gambar 4. Skema pembuatan ekstrak daun beluntas



Gambar 5. Skema pengujian *radial arm maze*

F. Analisis Data

Data yang diperoleh dari metode ini berupa angka kesalahan tipe B dimana kesalahan dihitung ketika tikus memasuki lengan lebih dari separuh panjang lengan tetapi tidak memakan umpan yang disediakan dan waktu pengambilan makanan yang berasal dari tahap *pre-test* dan *post-test*. Hasil yang diperoleh diuji dengan *One-Sample Kolmogorov-Smimov* dan *Levene's test*. *One-Sample Kolmogorov-Smimov* untuk menemukan apakah data yang telah didapat terdistribusi normal atau tidak, sedangkan *Levene's test* untuk mengetahui apakah varian populasi data tersebut sama atau berbeda. Jika kedua uji memenuhi persyaratan ($p > 0,05$) maka dilanjutkan analisis parametrik dengan *analysis of varian* (ANOVA) dua jalan tarif kepercayaan 95% dengan post-hoc *Tukey test* . Jika tidak memenuhi persyaratan ($p < 0,05$) maka dilanjutkan analisis non-parametrik dengan uji *Kruskall-Wallis* atau *Mann Whitney*.