

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dan batang adas adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) yang diperoleh dari petani tanaman adas di lereng pegunungan Merapi dan Merbabu, Selo, Boyolali.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) yang diambil dari populasi secara acak dengan kondisi masih segar dan tidak busuk pada bulan Januari 2019.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak etanol daun dan batang adas adas (*Foeniculum vulgare* Mill.)

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah produksi air susu dari tikus yang menyusui dengan menggunakan parameter peningkatan berat badan anakan tikus.

Variabel utama yang ketiga dalam penelitian ini adalah tikus putih betina galur wistar (*Ratus norvegicus*) yang sedang menyusui.

Variabel utama yang keempat dalam penelitian ini adalah peneliti, kondisi laboratorium, dan kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, usia, jenis kelamin, dan galur.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama memuat identifikasi dari semua yang diteliti langsung. Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk mempelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak dengan variasi dosis. Variabel tergantung adalah pusat permasalahan yang merupakan kriteria penelitian.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah peningkatan berat badan pada anakan tikus setelah perlakuan dengan pemberian ekstrak daun dan batang adas.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah peneliti, kondisi laboratorium, dan kondisi fisik hewan uji meliputi berat badan, usia, jenis kelamin, dan galur.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun dan batang adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) adalah adas segar yang diperoleh dari petani tanaman adas di lereng pegunungan Merapi dan Merbabu di wilayah Selo, Boyolali pada bulan Januari 2019.

Kedua, serbuk daun dan batang adas adalah serbuk yang berasal dari daun dan batang adas yang telah melewati proses pengeringan, digiling, dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun dan batang adas adalah ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi serbuk daun dan batang adas dengan pelarut etanol 96%, kemudian dilakukan pemekatan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50⁰C sampai diperoleh ekstrak kental daun dan batang adas.

Keempat, tikus uji merupakan tikus betina yang berumur 5-6 bulan dengan berat antara 200-300 gram yang telah siap bereproduksi.

Kelima, peningkatan produksi air susu dilihat dari peningkatan berat badan anakan tikus.

C. Bahan, Alat dan Hewan Uji

1. Bahan

1.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dan batang adas.

1.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan sebagai pelarut untuk membuat ekstrak etanol daun dan batang adas adalah etanol 96%. Bahan yang digunakan untuk kontrol normalnya adalah makanan dan minuman, kontrol positif yang digunakan adalah Asifit, kontrol negatif yang digunakan adalah CMC 0,5%.

2. Alat

Alat untuk membuat simplisia adalah oven dengan suhu rendah dan konstan, mesin penggiling, blander, ayakan nomor 40. Alat untuk penyari antara lain, gelas ukur, corong kaca, gelas Beaker, kain flanel, labu takar, *rotary evaporation*, botol berwarna gelap, neraca analitik, dan alat-alat gelas.

Alat yang digunakan untuk penetapan susut pengeringan adalah *moisture balance*. Alat yang digunakan untuk membuat larutan stok ekstrak etanol daun dan batang adas adalah Beaker glass, batang pengaduk, gelas ukur, botol putih 100 mL, labu takar, timbangan elektrik, mortir, dan stamfer.

Alat yang digunakan untuk perlakuan antara lain spuit oral, timbangan digital dan kandang tikus.

3. Hewan uji

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih galur wistar dengan jenis kelamin betina yang siap bereproduksi, umur 5-6 bulan dengan berat badan rata-rata 200-300 gram sebanyak 30 ekor. Semua tikus mendapatkan diet dan ukuran kandang yang sesuai temperatur $30\pm 10^{\circ}\text{C}$. Tikus yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman daun dan batang adas

Determinasi dilakukan dengan menetapkan kebenaran sampel yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi tanaman dari daun dan batang adas agar menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan. Dalam penelitian ini menggunakan sampel adas yang akan dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu.

2. Pengumpulan dan pembuatan serbuk daun dan batang adas

Sampel penelitian yang digunakan adalah daun dan batang adas yang diperoleh dari petani adas di wilayah Boyolali, Jawa Tengah pada bulan Januari

2019. Daun dan batang adas yang diperoleh dalam keadaan segar, kemudian dilakukan sortasi basah untuk membersihkan dari kotoran dan debu yang menempel lalu dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 50⁰C. Setelah kering simplisia dihaluskan menggunakan mesin penggiling, kemudian diayak menggunakan ayakan mesh 40.

3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun dan batang adas

Penetapan susut pengeringan simplisia daun dan batang adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) dalam penelitian menggunakan alat yaitu *moisture balance*. Caranya dengan memasukkan ± 2 gram serbuk daun dan batang adas ke dalam cakram yang sudah ditara. Wadah tersebut kemudian dimasukkan ke dalam alat *moisture balance*. Jika alat *moisture balance* telah berbunyi tandanya pengoperasian alat tersebut telah selesai. Kemudian hasil susut pengeringan dicatat (dalam satuan %) dan serbuk simplisia ditimbang sebanyak tiga kali.

4. Pembuatan ekstrak etanol daun dan batang adas

Pembuatan ekstrak etanol daun dan batang adas dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dengan perbandingan 1:10. Serbuk daun dan batang adas ditimbang sebanyak 1 bagian lalu dimasukkan kedalam botol berwarna coklat kemudian direndam dengan etanol 96%, direndam, ditutup, dan dibiarkan selama 6 jam terlindung dari cahaya dan dilakukan pengadukkan sesekali lalu didiamkan selama 18 jam. Sari atau maserat hasil ekstraksi kemudian disaring dengan menggunakan kain flanel dan kertas saring. Proses penyarian diulang sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarutnya 1:5 dari volume pelarut pada penyarian pertama. Ampas kemudian dicuci kembali dengan etanol 96% secukupnya hingga diperoleh 100 bagian. Sari atau maserat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50⁰C hingga diperoleh ekstrak kental. Hasil ekstrak tersebut disebut sebagai ekstrak kental etanol daun dan batang adas.



Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanol daun dan batang adas.

5. Analisis skrining fitokimia

Analisis kandungan senyawa kimia yang terkandung di dalam daun dan batang adas menggunakan sampel berupa serbuk simplisia daun dan batang adas dan ekstrak etanol daun dan batang adas.

5.1. Identifikasi flavonoid. Sebanyak 2 mL sampel dilarutkan dalam 2 mL metanol, kemudian ditambahkan serbuk Mg dan HCl pekat 5 tetes. Adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau jingga (Ningsih *et al.* 2016).

5.2. Identifikasi saponin. Sebanyak 2 mL sampel dilarutkan dalam aquades pada tabung raksi lalu ditambah dengan KOH 10 tetes lalu dipanaskan dengan penangas air dengan suhu 50°C selama 5 menit, kocok selama 15 menit. Adanya senyawa saponin ditunjukkan dengan terbentuk busa dengan tinggi 1 cm dan tetap stabil selama 15 menit (Ningsih *et al.* 2016).

5.3. Identifikasi alkaloid. Sebanyak 2 mL sampeldilarutkan dengan 2 mL asam klorida, dipanaskan selama 5 menit lalu disaring. Filtrat yang didapat

ditambah 2-3 tetes pereaksi Dragendorff. Jika terdapat senyawa alkaloid ditunjukkan dengan adanya endapan berwarna jingga (Ningsih *et al.* 2016).

5.4. Identifikasi tanin. Sejumlah sampel ditambah etanol hingga terendam. Lalu sebanyak 1 mL larutan dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambah dengan larutan FeCl_3 1% sebanyak 2-3 tetes. Hasil positif terdapat senyawa tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau (Sangi *et al.* 2008).

6.5. Identifikasi steroid & terpenoid. Sebanyak 2 mL sampel dilarutkan dengan 10 mL aquades lalu dipanaskan selama 5 menit dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditambah dengan pereaksi Lieberman-Burchard sebanyak 1 mL. Positif senyawa steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman. Adanya senyawa terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau ungu (Ningsih *et al.* 2016).

6. Pembuatan larutan Asifit

Suspensi Asifit dibuat dengan cara menggerus 1 tablet Asifit (kandungan zat aktif 754 mg) lalu disuspensikan dengan CMC Na 0,5% hingga volume 100 mL.

7. Pembuatan larutan CMC Na 0,5%

CMC Na 0,5% merupakan larutan yang digunakan pada kelompok normal dan kelompok kontrol laktagogum. Pembuatan larutan stok sebanyak 100 mL dilakukan dengan cara menimbang 500 mg serbuk CMC Na, selanjutnya dimasukkan ke dalam cawan penguap dan ditambah sedikit aqua destilata. Kemudian dipanaskan sampai mengembang lalu dimasukkan ke dalam mortir dan digerus dengan penambahan sedikit demi sedikit aqua destilata hingga volume 100 mL, lalu diaduk hingga campuran homogen.

8. Penentuan dosis

Volume maksimal larutan uji dapat diberikan pada tikus dengan berat badan 200 gram secara oral sebesar 5 mL.

9.1. Penentuan dosis Asifit. Dosis penggunaan Asifit sekali pemakaian adalah 754 mg untuk manusia dengan berat badan 70 Kg. Faktor konversi manusia 70 Kg ke tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018, sehingga

dosis Asifit untuk tikus 200 gram adalah $754 \text{ mg} \times 0,018 = 13,572 \text{ mg}/200 \text{ gram}$ berat badan tikus ($67,86 \text{ mg}/\text{Kg BB}$ tikus).

9.2. Penentuan dosis ekstrak daun dan batang adas. Dosis yang diberikan pada tikus mengacu pada dosis pemakaian tumbuhan daun dan batang adas secara tradisional. Pada penelitian Rifqiyati (2016) dosis efektif pada pemberian ekstrak etanol daun adas pada tikus putih yaitu dosis $631,6 \text{ mg}/\text{kgBB}$ dengan pemberian yang dilakukan 2 kali sehari. Dosis tersebut diperoleh variasi dosis pada kelompok pemberian ekstrak etanol daun dan batang adas sebesar $135 \text{ mg}/\text{kgBB}$, $630 \text{ mg}/\text{kgBB}$, dan $945 \text{ mg}/\text{kgBB}$ induk tikus. Banyaknya volume pemberian ekstrak kental etanol daun dan batang adas yang digunakan dihitung berdasarkan berat badan dari masing-masing tikus, kemudian dilarutkan dengan larutan suspensi CMC Na 0,5% dan diberikan secara oral pada masing-masing tikus.

9. Penyiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah 30 ekor tikus betina umur 5-6 bulan dengan berat badan 200-300 gram. Hewan uji yang akan dipelihara dalam kandang dengan temperatur 21°C yang terjaga kelembaban 55% dan diberikan makan serta minum *ad libitum*. Aklimatisasi dilakukan dengan cara memelihara hewan uji pada kondisi percobaan selama 7 hari dengan tujuan untuk membiasakan hewan uji pada kondisi percobaan dan mengontrol kesehatannya. Secara acak tikus dikelompokkan menjadi 6 kelompok. Setiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus dan akan mendapatkan perlakuan yang berbeda sebagai berikut :

Kelompok I : Kelompok kontrol normal tanpa perlakuan diberikan pakan dan minum.

Kelompok II : Kelompok kontrol negatif diberikan suspensi CMC Na 0,5%.

Kelompok III : Kelompok kontrol positif diberikan Asifit dengan dosis $67,86 \text{ mg}/\text{kgBB}$ tikus.

Kelompok IV : Kelompok perlakuan 1 diberikan ekstrak etanol daun dan batang adas dengan dosis $315 \text{ mg}/\text{kgBB}$ tikus.

Kelompok V : Kelompok perlakuan 2 diberikan ekstrak etanol daun dan batang adas dengan dosis $630 \text{ mg}/\text{kgBB}$ tikus.

Kelompok VI : Kelompok perlakuan 3 diberikan ekstrak etanol daun dan batang adas dengan dosis 945 mg/kgBB tikus.

10. Pengukuran peningkatan berat badan anakan tikus

Pemberian sediaan dilakukan satu hari dua kali pada pagi dan sore hari secara oral kepada masing – masing induk tikus mulai dari induk tikus melahirkan hingga masa laktasi selama 14 hari. Pengambilan data dilakukan dengan penimbangan berat badan anakan tikus pada hari ke pertama hingga hari ke 14. Penimbangan berat badan anakan rutin sebelum dan sesudah anakan menyusu, penimbangan awal pada pukul 08.30 (W1), setelah dipisahkan dari induk selama 4 jam pada pukul 12.30 (W2), dan setelah digabungkan lagi bersama induknya pada pukul 13.30 (W3) yang mana selanjutnya dilakukan perhitungan rata-rata kenaikan berat badan anakan harian dengan rumus $[(W3-W2) + (W2-W1)/4]$.

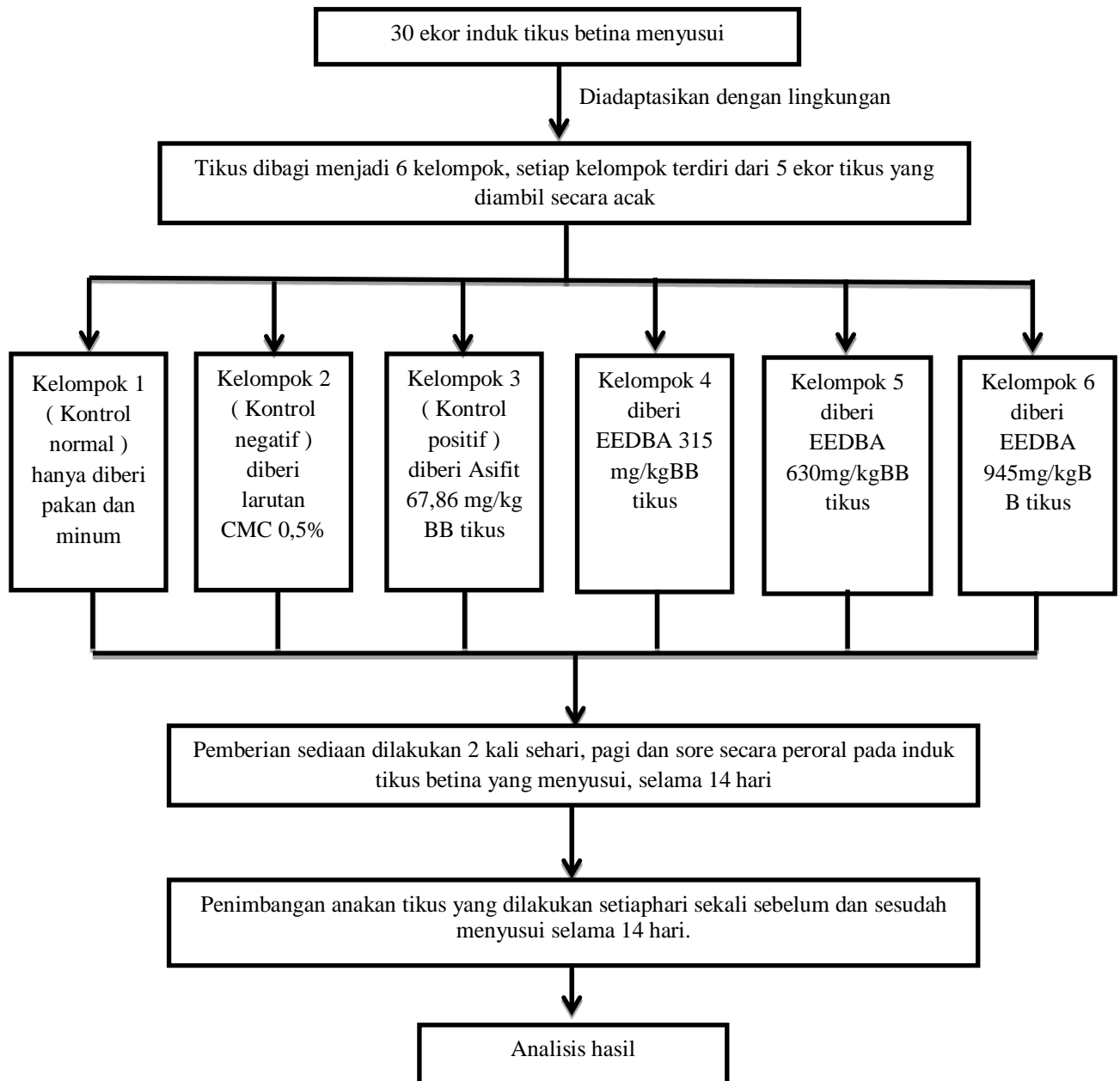
E. Analisis Hasil

Data peningkatan berat badan anakan tikus yang diperoleh pada penelitian ini dianalisa dengan menggunakan *software SPSS for WindowsRelease 21.0* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan.

Pengolahan data tersebut dilakukan dengan melihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji distribusi normal *Shapiro wilk*. Hasil data yang terdistribusi normal ($p > 0.05$) dilanjutkan dengan metode uji parametik *one-way ANOVA* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan atau tidak diantara perlakuan, jika pada hasil uji terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji *Tukey Post Hoc Test*.

E. Skema Penelitian

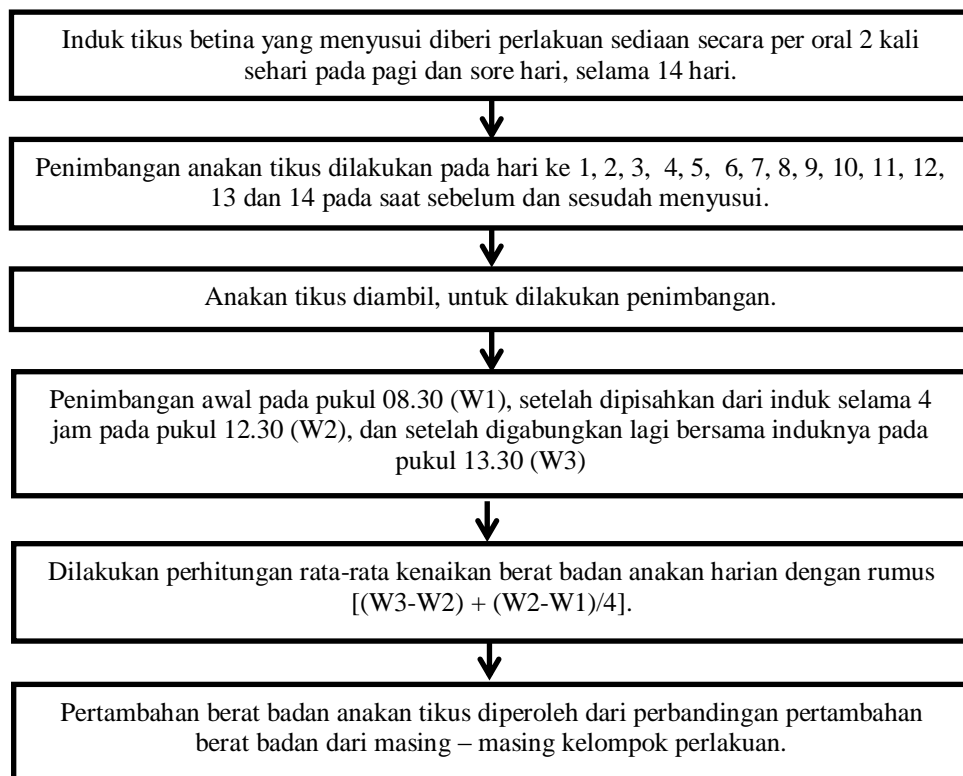
Alur penelitian dalam penelitian ini melalui beberapa tahap, tahapan tersebut dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Skema alur penelitian.

Keterangan :

EEDBA : Ekstrak Etanol Daun dan Batang Adas



Gambar 4. Skema prosedur pengukuran berat badan anakan tikus.