

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi Sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun alpukat (*Persea americana Mill*) yang diperoleh dari daerah Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan daun alpukat (*Persea americana Mill*) yang berwarna hijau dan tidak ditumbuhi hama.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel pertama dalam penelitian ini adalah daun alpukat (*Persea americana Mill*). Variabel kedua dalam penelitian ini adalah ekstrak daun alpukat. Variabel ketiga waktu latensi dan persen kesalahan. Variabel keempat adalah metode *Radial Arm Maze*.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama memuat identifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung. Variabel yang telah diteliti terlebih dahulu dapat diklasifikasikan kedalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas dan variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah ekstrak daun alpukat (*Persea americana Mill*) dengan berbagai variasi dosis.

Variabel tergantung adalah variabel yang faktornya diamati dan diukur untuk menentukan pengaruh yang disebabkan oleh variabel bebas, dimana variabel tergantung dari penelitian ini adalah peningkatan memori spasial pada mencit putih dengan parameter uji yaitu waktu latensi dan % kesalahan B pada alat *Radial Arm Maze*.

### 3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun alpukat adalah daun tunggal, bertangkai yang panjangnya 1,5-5 cm, letaknya berdesakan di ujung ranting, bentuknya jorong sampai bundar tekur memanjang, ujung dan pangkal runcing, tepi rata kadang-kadang agak menggulung ke atas, bertulang menyirip. Daun muda warnanya kemerahan sedangkan daun tua warnanya hijau.

Kedua, ekstrak daun alpukat (*Persea americana Mill*) adalah hasil ekstraksi dari daun alpukat (*Persea americana Mill*) dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70% yang kemudian dipekatkan pada *rotary evaporator*.

Ketiga, mencit adalah hewan uji yang digunakan pada penelitian ini yang berumur 6-8 minggu dengan berat badan  $\pm 20$  gram dalam keadaan sehat yang didapatkan dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Keempat, uji *Radial Arm Maze* adalah metode yang digunakan untuk mengetahui perkembangan memori spasial. *Radial Arm Maze* terdiri dari delapan lengan, dengan diberi hadiah pelet di ujung masing-masing lengan untuk proses belajar dan mengingat tata letak suatu area. Hewan memasuki lengan yang sama beberapa kali menunjukkan hewan tidak dapat mengingat tempat yang sebelumnya sudah dimasuki.

Kelima, parameter waktu latensi adalah waktu yang dibutuhkan hewan uji memasuki lengan untuk mendapatkan makanan yang disediakan pada lengan *Radial Arm Maze* sebanding dengan kontrol positif dan berbeda bermakna dengan kontrol negatif.

Keenam, parameter % kesalahan B adalah angka kesalahan hewan uji memasuki lengan *Radial Arm Maze* lebih dari separuh panjang lengan tetapi tidak memakan imbalan yang disediakan yang sebanding dengan kontrol positif dan berbeda bermakna dengan kontrol negatif.

Ketujuh, peningkatan memori spasial adalah waktu yang dibutuhkan mencit untuk menemukan makanan semakin cepat dan nilai % kesalahan B semakin kecil.

Ketujuh, dosis efektif adalah dosis terkecil yang sudah dapat memberikan efek terapi yang sebanding dengan kontrol positif dan berbeda bermakna dengan kontrol negatif

### **C. Alat dan Bahan**

#### **1. Alat**

Alat yang digunakan untuk maserasi yaitu botol gelas yang berwarna gelap ukuran 2L, kain flanel, mesin penggiling, ayakan nomor 40, Erlenmeyer, kertas saring, corong glass, tabung reaksi, batang pengaduk, corong gelas, gelas ukur, evaporator, oven, *Sterling-Bidwell*, kandang mencit, timbangan hewan, spuit, masker, Handscoon, stopwatch, dan *Radial Arm Maze*

#### **2. Bahan**

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak maserasi daun alpukat (*Persea americana Mill*) diperoleh dari daerah Gemolong, Sragen, Jawa Tengah dan menggunakan bahan penyari yaitu etanol 70%, pelet (makanan mencit), Timbal (II) asetat, Aquadest, ginkgo biloba, pereaksi Dragendroff, pereaksi Mayer, pereaksi wagner, dan asam sulfat pekat

#### **3. Hewan percobaan**

Hewan uji yang digunakan adalah mencit putih (*Mus musculus*). Pengelompokan dilakukan secara acak terdiri dari masing-masing kelompok 5 ekor mencit. Pengelompokan dibagi menjadi 5 kelompok uji dimana satu kelompok kontrol negatif, satu kelompok kontrol positif, dan 3 kelompok dengan pemberian ekstrak berbagai variasi dosis. Pemilihan mencit sebagai hewan uji didasarkan atas karakteristik mencit yang mudah ditangani.

### **D. Jalannya Penelitian**

#### **1. Determinasi tanaman**

Tahapan pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran tanaman alpukat (*Persea americana Mill*) dengan melakukan determinasi. Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman alpukat (*Persea americana Mill*).

Determinasi tanaman alpukat (*Persea americana Mill*) dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jawa Tengah.

## **2. Pembuatan serbuk**

Tanaman alpukat sebanyak 10.000 g basah yang telah kumpulkan kemudian dicuci, disortasi basah, kemudian dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan dengan alat oven pada suhu 50° C. Proses pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air agar tidak mudah ditumbuhi oleh kapang atau bakteri, menghilangkan aktivitas enzim yang dapat menguraikan zat aktif dan memudahkan proses penggilingan maupun penyimpanan. Daun alpukat yang telah kering di digiling dan diayak dengan ayakan nomor 40, kemudian disimpan dalam tempat kering dan tertutup rapat.

## **3. Pembuatan ekstrak daun alpukat**

Ekstraksi simplisia daun alpukat dilakukan dengan metode maserasi menggunakan perbandingan 1:10 dengan cara menimbang serbuk simplisia kering daun alpukat sebanyak 400 g yang dimasukkan ke dalam botol maserasi kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 2 L. Simplisia direndam selama 3 hari dan dilakukan pengadukan sesering mungkin dan hasil ekstrak cair yang disaring dengan menggunakan kertas saring serta ditampung dalam sebuah wadah kaca. Kemudian sisa ampasnya dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali dengan masing-masing pelarut sebanyak 1 L. Setelah semua ekstrak cair yang didapat kemudian dimasukkan kedalam *Rotary Evaporator* untuk mendapat ekstrak kental (Sentat & Rizki 2015).

## **4. Penetapan kadar air ekstrak daun alpukat**

Penetapan kadar air ekstrak daun alpukat dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Penetapan kadar air dilakukan dengan cara ekstrak daun alpukat ditimbang sebanyak 20 g, lalu dimasukkan ke dalam labu kering. Dimasukkan kurang lebih 200 ml toluen jenuh air ke dalam labu dan dipanaskan labu dengan hati-hati. Pemanasan dihentikan bila air pada penampung tidak menetes lagi (kurang lebih 1 jam), kemudian dibaca volume air setelah air dan toluen memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b. Kadar air yang memenuhi persyaratan adalah kurang dari 10% (Kemenkes RI 2013).

## 5. Identifikasi kualitatif ekstrak daun alpukat

**5.1 Identifikasi saponin.** Sepuluh tetes ekstrak daun alpukat dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan air panas secukupnya, dikocok selama 15 menit dan 2 tetes HCl 2 N bila terbentuk buih permanen selama kurang lebih 10 menit maka memberikan indikasi adanya saponin (Sentat & Rizki 2015).

**5.2 Identifikasi alkaloid.** Uji alkaloid dilakukan dengan cara melarutkan ekstrak uji sebanyak 2ml diuapkan di atas cawan porselin hingga dapat residu. Residu kemudian dilarutkan dengan 5ml HCl 2N. Larutan yang didapat kemudian dibagi kedalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan dengan pereaksi dragendorff sebanyak 3 tetes, tabung kedua ditambahkan pereaksi mayer sebanyak 3 tetes dan tabung ketiga ditambahkan pereaksi wagner 3 tetes. Terbentuknya endapan jingga pada tabung pertama, endapan putih hingga kekuningan pada tabung kedua, dan endapan coklat pada tabung ketiga menunjukkan adanya alkaloid (Jones & Kinghorn 2006).

**5.3 Identifikasi flavonoid.** Sepuluh tetes ekstrak daun alpukat dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 2 tetes HCl pekat, serbuk Mg, dan 2 tetes amil alkohol. Bila terbentuk warna kuning, jingga, atau merah pada lapisan amil alkohol memberikan indikasi adanya flavonoid (Sentat & Rizki 2015).

## 6. Uji bebas etanol ekstrak daun alpukat

Uji ini dilakukan dengan cara sedikit ekstrak kental dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  pekat dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dan dipanaskan. Hasil uji bebas etanol ekstrak ditandai dengan tidak adanya bau ester. Ester dihasilkan dari reaksi esterifikasi antara alkohol dengan asam karboksilat pada suasana asam (Susilo *et al.* 2017)

## 7. Penentuan dosis

**7.1 Dosis ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill).** Dosis ekstrak daun alpukat yang digunakan dalam penelitian ini adalah 56mg/kg BB mencit 112mg/kg BB mencit, 224mg/kg BB mencit (perhitungan larutan stok dan volume pemberian ada di lampiran 9).

**7.2 Dosis Timbal (II) asetat.** Dosis Timbal (II) asetat adalah 14 mg/kg BB mencit (perhitungan larutan stok dan volume pemberian ada di lampiran 9).

**7.3 Dosis ginkgo biloba.** Satu kapsul ginkgo biloba memiliki bobot 500mg yang mengandung ekstrak ginkgo biloba 75mg. Dosis pada manusia adalah satu kapsul per hari. Dosis untuk mencit adalah 9,75mg/kg BB mencit (perhitungan larutan stok dan volume pemberian ada di lampiran 9).

## **8. Pengelompokan hewan percobaan**

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit. Pemilihan hewan percobaan ini dikarenakan cara penanganannya yang mudah dan ekonomis. Penelitian ini digunakan mencit sebanyak 25 ekor dengan dengan 5 kelompok uji dengan masing-masing kelompok uji terdiri dari 5 ekor mencit, yaitu sebagai berikut :

Kelompok I yaitu kontrol negatif Aquadest

Kelompok II yaitu kontrol positif ginkgo biloba 9,75mg/kg BB mencit

Kelompok III yaitu ekstrak daun alpukat 56mg/kg BB mencit

Kelompok IV yaitu ekstrak daun alpukat 112 mg/kg BB mencit

Kelompok V yaitu ekstrak daun alpukat 224 mg/kg BB mencit

## **9. Prosedur uji daya ingat**

Mencit diadaptasi dengan makanan dan lingkungan selama 7 hari. Setelah itu, mencit diadaptasikan di alat *Radial Arm Maze* selama 5 hari berturut-turut. Setelah proses adaptasi, masing-masing kelompok uji diberikan induksi timbal (II) asetat 14 mg/kg BB mencit (ip) selama 1 hari, kemudian dilakukan pengamatan waktu latensi dan % kesalahan B memasuki lengan *Radial Arm Maze*. Hari selanjutnya mencit diberikan perlakuan selama 12 hari dengan pembagian kelompok yaitu :

Kelompok I yaitu kontrol negatif Aquadest

Kelompok II yaitu kontrol positif ginkgo biloba 9,75mg/kg BB mencit

Kelompok III yaitu ekstrak daun alpukat 56mg/kg BB mencit

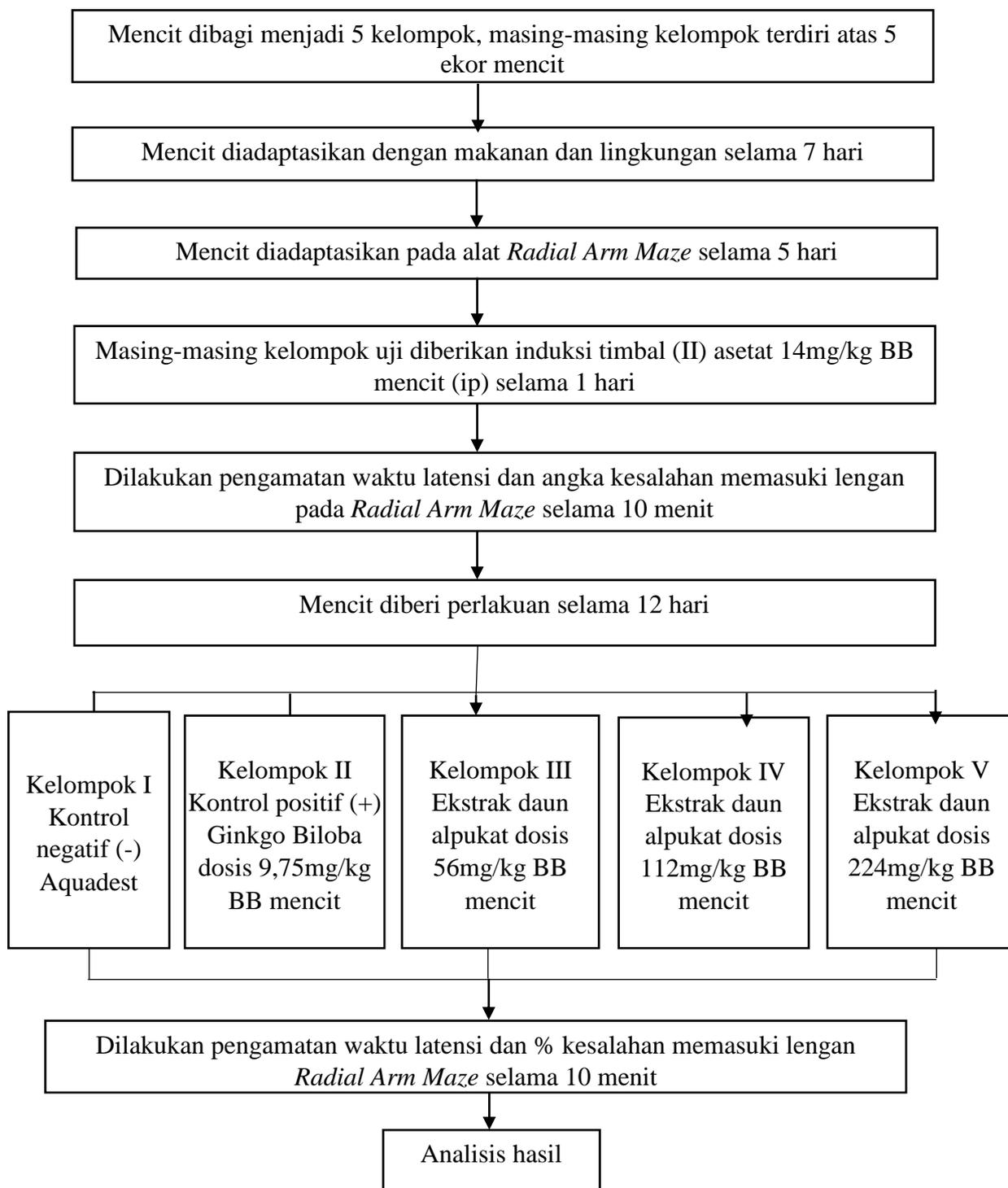
Kelompok IV yaitu ekstrak daun alpukat 112 mg/kg BB mencit

Kelompok V yaitu ekstrak daun alpukat 224 mg/kg BB mencit

Untuk mengukur fungsi memori dari semua mencit, dilakukan pengamatan waktu latensi mencit dan angka kesalahan mencit dalam memasuki lengan (kesalahan tipe B) selama 10 menit. Kesalahan diperhitungkan apabila hewan memasuki lengan *Radial Arm Maze* lebih dari separuh panjang lengan tetapi tidak memakan imbalan yang disediakan (Sari 2000, diacu dalam Hamidi *et al* 2010).

Rumus :

$$\% \text{ kesalahan B} = \frac{\text{Memasuki lengan pada Radial Arm Maze lebih dari separuh tetapi tidak memakan imbalan}}{\text{Jumlah lengan yang dimasuki}} \times 100\%$$



Gambar 6. Skema uji daya ingat

### **E. Analisis Data**

Data yang diperoleh yaitu waktu latensi dan % kesalahan B, dianalisis secara statistik menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov* untuk mengetahui normalitas data dan dilakukan uji *Levene* untuk mengetahui homogenitas data, apabila data tersebut memenuhi syarat maka dilanjutkan dengan uji Anova satu jalan. *One Way Anova* digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pada data, selanjutnya jika terdapat perbedaan dilanjutkan menggunakan uji *Tukey Post Hoc* untuk mengetahui perbedaan secara nyata. Apabila data yang diperoleh tidak terdistribusi normal maka dapat menggunakan Uji *Kruskal-Wallis*, Uji *Mann-Whitney*, atau Uji *Wilcoxon*.