

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan sampel**

Populasi dan sampel dalam penelitian ini adalah lobak (*Raphanus sativus* L.) yang diperoleh dari Pasar Legi, Surakarta, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah lobak (*Raphanus sativus* L.) dan diambil lobak yang masih segar diperoleh dari Pasar Legi, Surakarta, Jawa Tengah.

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

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

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol lobak dalam berbagai dosis. Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah besaran kisaran dosis lethal tengah ( $LD_{50}$ ), dan gejala toksik pada mencit. Variabel utama yang ketiga dalam penelitian ini adalah hewan uji dan kondisi percobaan.

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

Variabel utama dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol lobak (*Raphanus sativus* L.) yang diberikan pada hewan uji dalam berbagai dosis.

Variabel tergantung adalah variabel akibat dari variabel utama. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek toksisitas akut dari ekstrak etanol lobak (*Raphanus sativus* L.) terhadap hewan uji dengan melihat gejala atau efek toksik, serta nilai  $LD_{50}$ .

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah berat badan, usia, lingkungan tempat hidup, dan perlakuan oleh peneliti.

### 3. Definisioperasional variabel utama

**3.1. Identifikasi variabel utama.** Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol dari daun bayam duri dalam berbagai variasi dosis. Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah besaran kisaran dosis lethal tengah ( $LD_{50}$ ), dan gejala toksik pada mencit. Variabel ketiga dalam penelitian ini adalah hewan uji dan kondisi percobaan.

**3.2. Klasifikasi variabel utama.** Variabel utama dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol. Variabel bebas dalam adalah variabel yang sengaja direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun bayam duri yang diberikan pada mencit dalam berbagai variasi dosis toksik.

Variabel tergantung adalah variabel akibat dari variabel utama, variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek toksisitas akut ekstrak etanol lobak terhadap mencit putih betina dengan melihat gejala atau efek toksik, serta nilai  $LD_{50}$ .

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah berat badan, usia, lingkungan tempat hidup, dan perlakuan oleh peneliti.

#### 3.3. Definisi operasional variabel utama.

**Pertama**, lobak merupakan tanaman segar yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT), kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

**Kedua**, serbuk lobak merupakan lobak yang telah dicuci kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu  $50^{\circ}C$  lalu digiling menggunakan mesin penggiling dan diayak menggunakan ayakan nomor 40 mesh.

**Ketiga**, ekstrak etanol lobak merupakan hasil maserasi ekstrak etanol lobak yang menggunakan pelarut etanol, kemudian diuapkan hingga di dapat ekstrak kental.

**Keempat**, gejala-gejala klinis yang muncul pada hewan uji toksisitas akut adalah perubahan perilaku grooming, tremor dan ptosis.

**Kelima**, nilai LD<sub>50</sub> adalah ketoksikan suatu bahan terhadap 50% hewan percobaan serta peringkat letalitas dapat diperoleh dengan mengklasifikasikan bila LD<sub>50</sub> pada tabel klasifikasi letalitas menurut (Lu, 1995).

**Keenam**, dosis uji toksisitas akut yang digunakan dengan metode fixed dose adalah ekstrak etanol lobak dosis 5, 50, 300, 2000, 5000 mg/kgBB yang diberikan pada hewan uji dengan mengkonversi dosis yang sesuai hewan uji yang digunakan yaitu mencit.

**Ketujuh**, hewan uji yang digunakan adalah mencit putih betina yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

**Kedelapan**, pengamatan berat badan, dengan cara menimbang berat badan mencit sesaat sebelum diberikan perlakuan dan selama 14 hari setelah diberi perlakuan.

**Kesembilan**, pengamatan makropatologi yang merupakan pengamatan makroskopik terhadap organ sasaran yaitu lambung, usus, hati, ginjal, dan jantung hewan uji yang dibandingkan dengan kontrol normal. Pemeriksaan makropatologi dilakukan dengan kasat mata untuk melihat pengaruh makroskopik dari pemberian ekstrak etanol lobak terhadap organ hewan uji.

**Kesepuluh**, pengamatan indeks organ dilakukan dengan cara menimbang berat organ mencit. Organ sasaran yang diamati meliputi lambung, usus, hati, ginjal, dan jantung sehingga indeks organ mencit dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ indeks organ} : \frac{\text{Berat organ mencit}}{\text{berat badan mencit}} \times 100\%$$

### C. Alat, Bahan dan Hewan uji

#### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat yang digunakan untuk membuat simplisia yaitu oven, blender, dan ayakan no 40. Alat yang digunakan untuk ekstraksi maserasi yaitu gelas piala, batang pengaduk, penangas air, kain flanel, kertas saring, corong gelas, beaker gelas, corong buncher, vakum *rotary evaporator*.

Alat yang digunakan untuk perlakuan pada hewan uji antara lain adalah kandang mencit, neraca elektrik, spuit, injeksi 1,0 ml, jarum oral (kanul) dan seperangkat alat bedah (scalpel, pinset, gubting, jarum, dan meja lilin).

## **2. Bahan**

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah lobak yang diperoleh dari Pasar Legi, Surakarta, Jawa Tengah. yang masih segar. Hewan uji yang digunakan adalah mencit betina umur 6-8 minggu. Pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah etanol 70%. Kontrol negatif yang digunakan adalah Na CMC 0,5%.

## **3. Hewan uji**

Hewan uji dalam penelitian ini adalah mencit putih (*Mus musculus*) yang berumur 6-8 minggu. Pengelompokan dilakukan secara acak, setiap kelompok terdiri dari 5 ekor mencit. Pemilihan mencit sebagai hewan uji di dasarkan atas karakteristik mencit yang mudah dipahami.

## **D. Jalannya penelitian**

### **1. Pengambilan bahan atau sampel**

Lobak yang diperoleh dari Pasar Legi, Surakarta, Jawa Tengah. Pengambilan lobak dilakukan ketika buah masih segar. Lobak yang telah dipanen kemudian di cuci bersih dan ditiriskan. Lalu dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 40-50<sup>0</sup>C. Pembuatan serbuk dengan cara diblender. Setelah mendapatkan serbuk maka diayak menggunakan ayakan no.40. Hasil penyerbukan yang berupa serbuk kering disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat yang selanjutnya digunakan untuk penelitian.

### **2. Determinasi tanaman**

Tahap pertama dalam penelitian adalah melakukan determinasi tanaman lobak yang bertujuan untuk menetapkan kebenaran yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi baik secara makroskopis maupun mikroskopis yang dilakukan determinasi di Universitas Setia Budi Surakarta, Jawa Tengah.

### 3. Pengeringan bahan

Lobak dicuci bersih dengan air mengalir, kemudian ditiriskan. Lobak yang sudah bersih, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 50<sup>0</sup>C.

### 4. Pembuatan serbuk

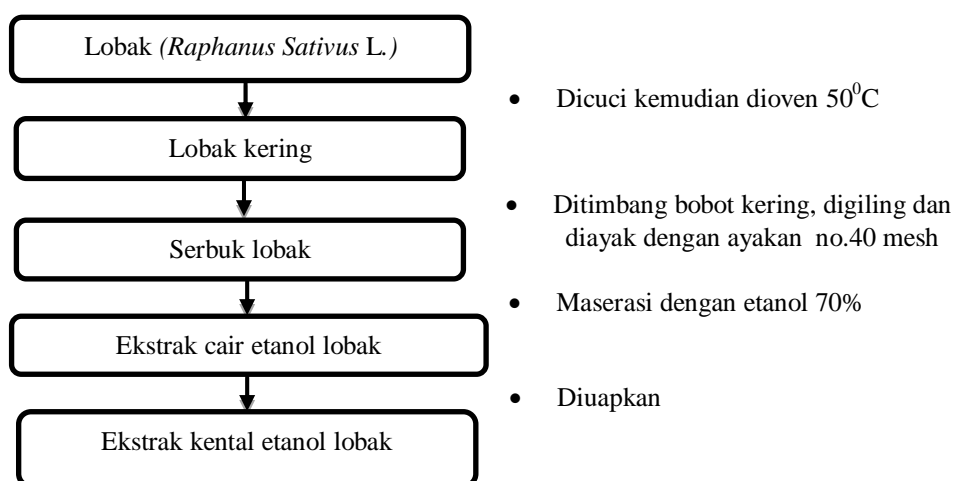
Lobak yang kering dihaluskan dengan mesin penggiling kemudian diayak dengan ayakan 40, kemudian hasil ayakan ditimbang.

### 5. Penetapan susut kering lobak

Penetapan susut pengeringan lobak dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Pengeringan serbuk dari masing-masing bahan ditimbang 2 gram serbuk untuk diuji nilai kadar air. Dimasukkan serbuk 2 gram ke dalam tempat serbu berbahan alumunium foil. Kemudian ditunggu hingga bobot akhir konstan atau biasanya selama 10 menit alat otomatis berhenti bekerja sampai muncul angka (dalam satuan %). Persyaratan susut pengeringan tidak lebih dari 10% (Voigt 1995).

### 6. Pembuatan ekstrak etanol lobak

Ekstraksi pada penelitian ini adalah menggunakan metode maserasi, serbuk lobak ditimbang sebanyak 1000 gram dimasukkan ke dalam bejana maserasi kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 10.000 ml hingga seluruh bahan terendam, perbandingan serbuk dengan pelarut 1:7,5. Maserasi dilakukan selama 5 hari dengan penggojokkan 3 kali sehari. Filtrat yang diperoleh dari penyaringan dengan menggunakan kain flanel. Hasil filtrat diuapkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat.



Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanol lobak

## **7. Identifikasi senyawa ekstrak etanol lobak**

Uji ini dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan dalam ekstrak lobak. Identifikasi kandungan senyawa kimia bertujuan untuk menetapkan keberadaan senyawa kimia dalam ekstrak lobak. Identifikasi kandungan senyawa kimia dalam ekstrak lobak meliputi meliputi senyawa flavonoid, saponin, dan tanin, alkaloid, minyak atsiri.

**7.1 Identifikasi flavonoid.** Ekstrak lobak 2mg ditambah 5 ml aquades dipanaskan selama 1 menit, disaring dan diambil filtratnya. Filtrat ditambah 0,1 gram serbuk Mg (magnesium), 2 ml larutan alkohol : asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol. Dicampur dan dikocok kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif ditandai adanya warna merah atau jingga pada lapisan amil alkohol (Robinson, 1995).

**7.2 Identifikasi saponin.** Ekstrak lobak dimasukkan dalam tabung reaksi, tambahkan air panas, dinginkan dan kemudian kocok kuat-kuat selama 10 detik terbentuk buih yang mantab selama tidak kurang dari 10 detik, setinggi 1 cm sampai 10 cm, buih yang timbul tidak akan hilang jika ditambahkan asam klorida (Depkes 1978).

**7.3 Identifikasi minyak atsiri.** Larutan ekstrak kurang lebih 2 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan dua tetes asam sulfat pekat. Positif jika menunjukkan warna ungu (Gunawan & Mulyani 2004).

**7.4 Identifikasi senyawa polifenol.** Identifikasi ekstrak umbilobak menggunakan metode warna, dengan cara ekstrak diuapka, ditambah 5 mL aquades, lakukan pemanasan untuk melarutkan ekstrak, dibiarkan dingin. Filtrat yang diperoleh ditambah dengan FeCl<sub>3</sub>, positif mengandung polifenol bila menunjukkan warna hijau atau merah ungu atau biru atau hitam (Harbone 1987).

## **8. Prosedur kerja**

**8.1 Persiapan hewan uji.** Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih betina dengan berat badan  $\pm$  20 gram, berumur 6-8 minggu sebanyak 30 ekor. Masing-masing mencit ditimbang dan diberi tanda pengenal, kemudian dibagi menjadi 6 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit. Hewan uji mencit didapat dari Laboratorium Farmakologi

Universitas Setia Budi. Hewan yang diperoleh dalam keadaan sehat dan sudah di adaptasikan dalam lingkungan Universitas Setia Budi selama  $\pm$  1 minggu. Sebelum diberi perlakuan hewan uji dipuasakan terlebih dahulu selama 14-18 jam dan hanya diberikan air minum. Setelah semua dipersiapkan, mencit dapat segera dilakukan penelitian dengan pemberian sediaan zat uji.

**8.2 Penetapan dosis.** Penetapan dosis dalam penelitian ini, mengacupada metode *fixed dose* dengan menggunakan dosis bertingkat, yaitu 5, 50, 300, 2000, 5000 hewan uji dan kelompok kontrol normal diberikan Na CMC 0,5% (BPOM 2014).

**8.3 Perlakuan hewan uji.** Mencit betina yang telah dipuasakan, dikelompokkan secara acak menjadi 6 kelompok. Masing-masing kelompok terdapat 5 ekor hewan uji, pembagiannya sebagai berikut :

- Kontrol normal : diberi Na CMC 0,5%
- Kelompok I : diberi dosis tunggal ekstrak etanol lobak sebanyak 5 mg/kgBB hewan uji.
- Kelompok II : diberi dosis tunggal ekstrak etanol lobaksebanyak 50 mg/kgBB hewan uji.
- Kelompok III : diberi dosis tunggal ekstrak etanol lobaksebanyak 300 mg/kgBB hewan uji.
- Kelompok IV : diberi dosis tunggal ekstrak etanol lobaksebanyak 2000 mg/kgBB hewan uji.
- Kelompok V : diberi dosis tunggal ekstrak etanol lobaksebanyak 5000 mg/kgBB hewan uji.

Hewan uji yang telah ditimbang dan dikelompokkan kemudian diberikan sediaan uji sesuai dengan dosis yang telah ditentukan, diamati selama 24 jam gejala klinis yang timbul jika tidak ada kematian dilanjutkan sampai 7-14 hari untuk memperoleh data berat badan mencit.

## **9. Pengamatan dan pemeriksaan**

Pengamatan hewan uji dilakukan pada 30 menit pertama setelah pemberian sediaan uji dan dilanjutkan selama 24 jam pertama, apabila hewan uji tidak ada yang mati pengamatan dilanjutkan sehari sekali setelah itu selama 14

hari. Hal-hal yang perlu diamati adalah gejala klinis diamati dari perilaku hewan uji yang abnormal dari biasanya, seperti :

**9.1 Perubahan perilaku (*behavioral profile*).** Uji *grooming* yaitu melihat kebiasaan mencit menjilati tubuhnya bila frekuensi meningkat menunjukkan adanya stimulasi SSP atau saraf simpatik dan bila terjadi penurunan adanya depresi, gerakan spontan terjadi bila mencit bergerak dengan cepat dan berlari adanya stimulasi SSP, dan bila mencit tidak merespon menunjukkan adanya anestesi, serta reaksi sakit yaitu saat ekor mencit dijepit sampai mencit bila tidak ada respon maka menunjukkan adanya analgesik sedasi (BPOM, 2014; Harmita).

**9.2 Perubahan pada *neurological profile*.** Perubahan gejala klinis yang dilihat dengan adanya stimulasi sistem saraf pusat khususnya pada gemetar (tremor). Perubahan pada tremor adalah pada saat mencit dalam keadaan diam maupun beraktifitas ada bagian tubuhnya yang bergetar. (BPOM, 2014; Harmita).

**9.3 Perubahan pada *autonomic*.** Perubahan gejala umum seperti, posisi palpebral, dimana mencit menutup matanya seperti mengantuk (ptosis). Hal ini dapat disebabkan karena adanya efek sedasi dari sediaan uji yang diberikan (BPOM, 2014; Harmita).

**9.4 Pengamatan berat badan.** Berat badan masing-masing hewan harus dimonitor pada saat sebelum diberikan sediaan uji dan sekurang-kurangnya seminggu setelahnya. Pada akhir penelitian, hewan yang masih bertahan hidup ditimbang dan kemudian dikorbankan.

**9.6. Pengamatan makropatologi organ.** Pada penelitian ini organ yang diamati yaitu hati, ginjal, usus, lambung dan jantung. Kemudian diperiksa secara makroskopis dan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pengamatan perubahan pada makropatologi terlihat adanya perbedaan warna pada organ mencit.

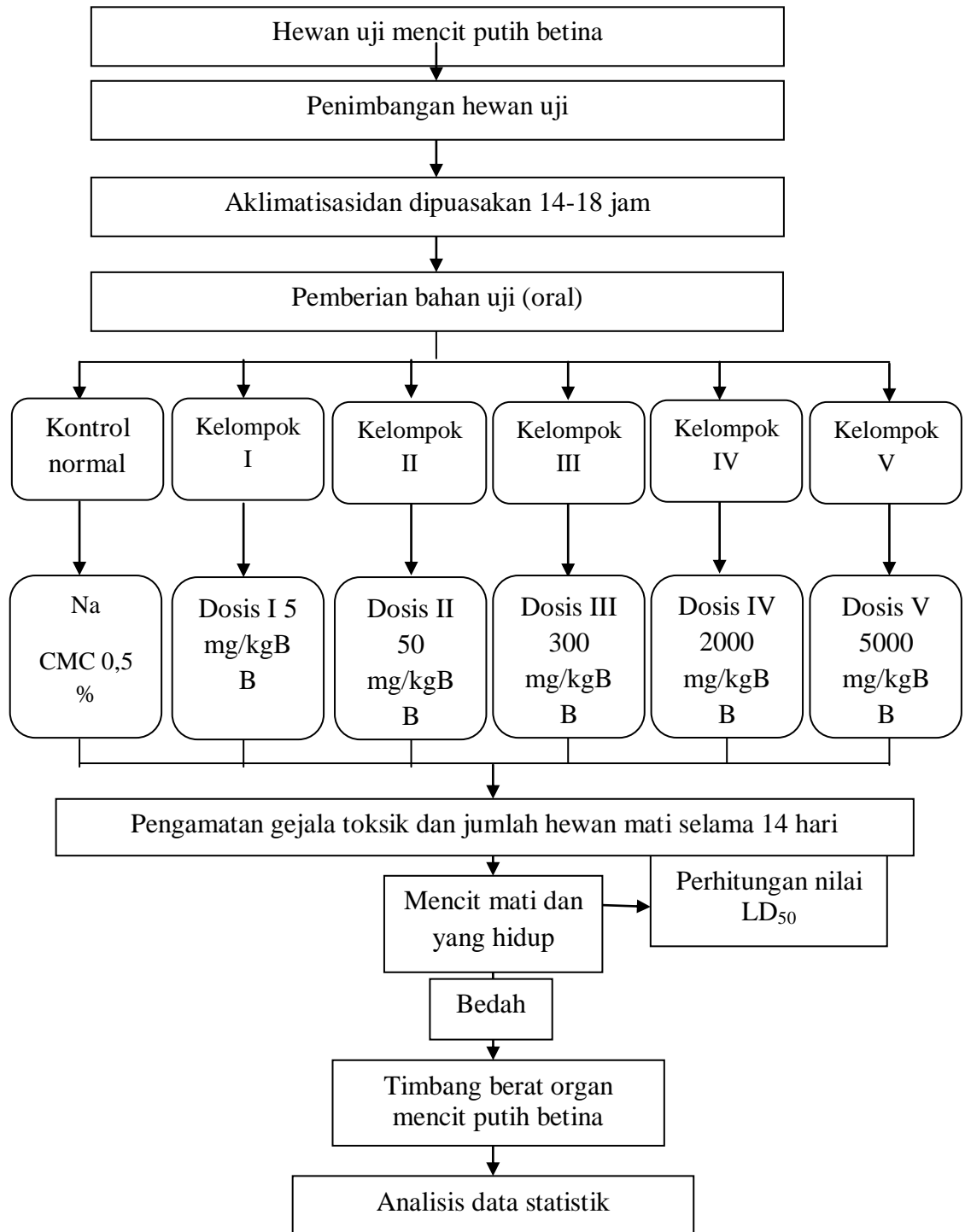
**9.7. Pengamatan indeks organ.** Pengamatan indeks organ ini didapatkan dari hasil perbandingan antara bobot organ dengan berat badan yang dihitung dengan menggunakan rumus indeks organ.

## **E. Analisis Data**

Data yang diperoleh diolah secara statistik dengan menggunakan SPSS. Analisis pertama dilakukan dengan uji distribusi normal Uji Kolmogorov



Smirnov, kemudian diuji homogenitasnya dengan uji *Levene*, jika data terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan analisa varian satu arah ANOVA untuk melihat hubungan antara kelompok perlakuan, dan apabila ditemukan perbedaan yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji *Post-hoc*. Jika data tidak terdistribusi normal maka dilanjutkan uji *Kruskal-Wallis* untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan dan apabila tidak ditemukan perbedaan maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.



Gambar 3. Skema pengujian ekstrak etanol 70% lobak