

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman pare (*Momordica charantia* L.) yang diperoleh dari Kabupaten Bojonegoro Jawa Timur. Menurut Permadi & Ubaidillah (2016) waktu panen tanaman pare yaitu sekitar umur 45 hari, berwarna hijau, panjang 20-25 cm dan bintil-bintil pada buah pare masih agak rapat. Tanaman pare yang digunakan untuk penelitian ini dipanen pada bulan Desember 2018.

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

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

Variabel utama pertama adalah ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak buah pare.

Variabel utama kedua adalah efek tonikum fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etol 70% buah pare terhadap mencit jantan t putih.

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

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

Variabel bebas adalah suatu variabel yang variasinya mempengaruhi variabel lain. variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari buah pare.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek tonikum dari serbuk buah lada hitam pada mencit jantan putih, yang meliputi selisih dari waktu lelah mencit berenang sebelum perlakuan dengan waktu lelah setelah perlakuan.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi fisik dari mencit jantan putih yang meliputi berat badan, lingkungan hidup, jenis kelamin, dan kondisi kandang, kondisi peneliti dan pengamatan, kondisi laboratorium dan alat-alat yang digunakan, serta prosedur pembuatan fraksi.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, buah pare adalah buah dari tanaman pare (*Momordica charantia* L.) yang diperoleh dari daerah Purwosari Kabupaten Bojonegoro Jawa Timur.

Kedua, serbuk buah pare adalah buah pare yang diambil kemudian dicuci pada air mengalir untuk membersihkan kotoran yang masih menempel setelah itu dipotong-potong dan dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C, setelah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol buah pare adalah serbuk buah pare yang diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70% lalu dipisahkan dengan *rotary evaporator*.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah fraksi yang diperoleh dari ekstrak etanol 70% buah pare yang difraksinasi dengan air dan pelarut *n*-heksana sebagai pelarut nonpolar.

Kelima, fraksi etil asetat adalah hasil fraksinasi *n*-heksana dan air dengan menggunakan etil asetat sebagai pelarut semi polar.

Keenam, fraksi air adalah fraksinasi dari fase etil asetat dengan menggunakan air sebagai pelarut polar.

Ketujuh, hewan uji yang digunakan adalah mencit putih jantan, yang berumur 2-3 bulan, sehat dan berat badan  $\pm 20$  g.

Kedelapan, waktu lelah adalah waktu yang ditandai dengan membiarkan kepala mencit berada di bawah permukaan air selama 7 detik. Waktu lelah sebelum perlakuan adalah dimana mencit belum diberikan seduhan serbuk buah lada hitam. Waktu lelah sesudah perlakuan adalah dimana mencit sudah diberikan seduhan serbuk buah lada hitam, efek tonikum yang diamati adalah selisih waktu

lelah antara waktu lelah mencit berenang sebelum perlakuan dengan waktu lelah sesudah perlakuan.

Kesembilan, *Natatory Exhaustion* adalah metode skrining farmakologi yang dilakukan untuk mengetahui efek obat yang bekerja pada koordinasi gerak, terutama pada penurunan kontrol saraf pusat.

## C. Alat dan Bahan

### 1. Alat

**1.1 Alat untuk pembuatan dan analisis serbuk simplisia.** Alat yang digunakan pembuatan serbuk simplisia adalah timbangan, oven, blender, ayakan no. 40, dan *Sterling-Bidwell*.

**1.2 Alat maserasi.** Alat yang digunakan untuk maserasi adalah gelas ukur, kain flanel, kertas saring, *vaccum rotary evaporator*, corong buchner dan *waterbath*.

**1.3 Alat uji efek tonikum.** Swimming pool, stopwatch, spuit dengan jarum tumpul atau berbentuk bola, hair dryer, beker glass, gelas ukur.

**1.4 Alat identifikasi kandungan senyawa.** Alat yang digunakan untuk identifikasi senyawa adalah tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, penjepit tabung, lampu spiritus, corong kaca, *beaker glass* dan gelas ukur.

### 2. Bahan

**2.1 Sediaan uji.** Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah buah pare yang di yang diperoleh dari Kabupaten Bojonegoro Jawa Timur.

**2.2 Hewan uji.** Hewan uji yang digunakan adalah mencit galur jantan putih, sehat, dengan berat badan  $\pm 20$  g, umur 2-3 bulan yang didapat dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi.

**2.3 Sediaan kimia.** Kafein, aquadest, asam klorida 2N, HCL 2N, sudan, reagent Dragendrof dan reagen Mayer.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Determinasi tanaman

Tahapan pertama penelitian adalah determinasi tanaman yang dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi

yang ada pada tanaman pare. Determinasi dilakukan laboratorium Identifikasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

## **2. Pembuatan serbuk buah pare**

Pembuatan serbuk buah pare dilakukan dengan cara pencucian buah pare terlebih dahulu dengan air mengalir untuk menghilangkan mikroba, kotoran dan debu. Buah pare yang sudah bersih dipotong-potong lalu diangin-anginkan kemudian ditimbang, setelah itu dikeringkan pada oven suhu 40°C. Buah pare yang sudah kering diserbuk dengan alat penyerbuk kemudian diayak dengan ayakan nomor 40 mesh, sehingga diperoleh serbuk buah pare yang mempunyai derajat kehalusan relatif homogen. Pembuatan serbuk bertujuan agar luas partikel bahan yang kontak dengan larutan penyari dapat diperluas sampai penyarian berlangsung secara efektif.

## **3. Penetapan kadar air serbuk buah pare**

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara menimbang 20 gram serbuk buah pare dimasukkan dalam labu destilasi yang sudah terisi batu didih dan ditambahkan pelarut toluen sampai serbuk terendam kemudian memasang alat *sterling-bidwell*. Panaskan labu dengan hati-hati, dipanaskan dengan api kecil sampai mendidih. Pemanasan dihentikan ketika kadar air dari serbuk buah pare sudah tidak menetes kembali pada gelas ukur alat *sterling-bidwell*. Penetapan kadar air simplisia untuk mengetahui terpenuhinya ketentuan kadar air ekstrak dengan mutu yang baik. Kadar air ditentukan karena air yang tersisa dalam ekstrak pada kadar air tertentu merupakan media pertumbuhan kapang dan jasad renik. Pertumbuhan kapang dan mikroorganisme lain dapat menyebabkan perubahan kimia pada senyawa aktif dan dapat mengakibatkan kemunduran mutu ekstrak. Kadar air memenuhi syarat dimana suatu serbuk simplisia buah pare ( $\leq 9,2\%$ ) (Depkes 2010).

## **4. Pembuatan ekstak buah pare**

Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk buah pare 800 gram dalam pelarut etanol 70% sebanyak 75 bagian, selama 5 hari sambil sesekali diaduk. Pisahkan maserat dengan cara pengendapan. Ampas diperas kemudian sisa ampas dicuci dengan cairan penyari hingga diperoleh 100 bagian (Ramadhan

*et al.* 2017). Hasil maserat dikumpulkan, kemudian diuapkan dengan penguap vakum hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes RI 2008). Rendemen yang diperoleh dihitung persentase bobot (b/b) dengan membandingkan berat ekstrak yang diperoleh dengan berat awal simplisia dikalikan 100%. Rendemen harus mencapai angka sekurang-kurangnya sebagaimana ditetapkan pada masing-masing monografi ekstrak. Pembuatan ekstrak buah pare rendemen tidak kurang dari 17% (Depkes 2010).

## **5. Fraksinasi**

Fraksinasi dilakukan dengan cara ditimbang 10 gram ekstrak buah pare selanjutnya difraksinasi cair-cair dengan menggunakan 75 ml (aquades : etanol) dan 75 ml *n*-heksana sebanyak tiga kali menggunakan corong pisah, fase *n*-heksana dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40°C. Hasil fraksinasi ini disebut fraksi *n*-heksana. Fase air yang diperoleh difraksinasi kembali dengan 75 ml etil asetat sebanyak tiga kali menggunakan corong pisah. Fase etil asetat yang diperoleh dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40°C sehingga menjadi fraksi etil asetat. Fase air ditampung dalam wadah dan dipekatkan dengan *waterbath* sehingga menjadi fraksi air.

## **6. Pengujian kandungan kimia serbuk dan ekstrak buah pare**

Preparasi pembuatan larutan serbuk dengan cara serbuk dan akuadestilata dicampurkan kemudian dipanaskan dan disaring, hasil larutan kemudian dapat diujikan. Preparasi pembuatan larutan uji ekstrak dengan cara ekstrak dilarutkan dengan etanol 70%, hasil larutan kemudian dapat diujikan. Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat dalam buah pare. Identifikasi dilakukan terhadap senyawa flavonoid, saponin, alkaloid, steroid/triterpenoid dan tanin.

**6.1 Identifikasi flavonoid.** Dilakukan dengan 2 mg cara bahan uji dimasukkan ke tabung reaksi kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 5 ml HCl pekat dan amil alkohol. Senyawa flavonoid akan menunjukkan warna merah atau kuning atau jingga pada amil alkohol (Lestari *et al.* 2014).

**6.2 Identifikasi saponin.** Dilakukan dengan cara 2 mg bahan uji ditambahkan aquades 5 ml. Kemudian dikocok vertikal selama 10 detik. Hasil uji

positif jika timbul busa stabil selama 10 menit setinggi 1-10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Setyowati *et al.* 2014).

**6.3 Identifikasi alkaloid.** Dilakukan dengan cara 2 mg bahan uji ditambahkan dengan 1 ml HCl 2N dan 6 ml air suling, kemudian dipanaskan selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat diperiksa dengan ditambah 2-4 tetes pereaksi Mayer reaksi positif ditunjukkan adanya endapan putih kekuningan (Setyowati *et al.* 2014).

**6.4 Identifikasi tanin.** Sebanyak 2 mg bahan uji ditambah dengan 5 ml aquadest lalu dipanaskan di atas penangas air  $\pm$  5 menit dan direaksikan dengan larutan FeCl<sub>3</sub> 1%. Bila terbentuk warna hijau kehitaman berarti positif adanya tanin (Setyowati *et al.* 2014).

**6.5 Identifikasi steroid/triterpen.** Dilakukan dengan dilarutkan bahan uji dalam 0,5 ml kloroform, kemudian ditambahkan anhidrida asetat sebanyak 5 tetes dan asam sulfat pekat 5 tetes melalui dinding. Steroid memberikan warna biru atau hijau, sedangkan triterpenoid memberikan warna merah jingga atau coklat kemerahan (Setyowati *et al.* 2014).

## 7. Uji kromatografi lapis tipis (KLT)

### 7.1 Uji flavonoid

Fase diam	: Silika gel GF 254
Fase gerak	: etil asetat - etanol (4:1)
Penampak noda	: UV 254 nm, UV 366 nm, uap amonia, sitroborat (dipanaskan suhu 100°C selama 5 menit), dilihat disinari tampak dan UV 366 nm.
Baku pembanding	: kuersetin

Hasil positif flavonoid bila dengan UV 254 nm memberikan peredaman dan pada UV 366 nm berfluoresensi biru, kuning atau ungu gelap. Dengan uap amonia berwarna kuning yang cepat memudar dan setelah disemprot sitroborat akan berwarna kuning kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit dan dilihat hasilnya pada sinar UV 366 nm.

### 7.2 Uji saponin

Fase diam	: Silika gel GF 254
Fase gerak	: kloroform-metanol-air (6:3:1)

Penampak noda : UV 254 nm, UV 366 nm, anisaldehyd asam sulfat pekat (dipanaskan suhu 100°C selama 5 menit), dilihat disinari tampak dan UV 366 nm.

Baku pembanding : glisirisin

Saponin memberikan noda berwarna biru atau violet, kadang kekuningan dengan anisaldehyd asam sulfat. Senyawa saponin secara visual dengan reagen semprot Liebermann-Burchard akan memberikan warna hijau atau biru untuk saponin steroid dan warna merah muda, merah, ungu atau violet untuk saponin triterpenoid.

### 7.3 Uji tanin

Fase diam : Silika gel GF<sub>254</sub>

Fase gerak : n- butanol-asam asetat-air (4:1:5)

Penampak noda : UV 254 nm, UV 366 nm, FeCl<sub>3</sub>

Baku pembanding : asam galat

Tanin berfluoresensi lembayung pada UV 366 nm dan setelah di semprot pereaksi berwarna hijau atau biru.

### 7.4 Uji steroid dan triterpenoid

Fase diam : Silika gel GF<sub>254</sub>

Fase gerak : N heksan – Etil asetat (1:1)

Penampak noda : UV 254 nm, UV 366 nm, Lieberman Bouchard

Baku pembanding : stigmasterol

Bila dengan pereaksi memberikan noda berwarna ungu atau birudikatakan mengandung triterpenoid bebas atau steroid.

## 8. Pembuatan kontrol positif

Kontrol positif yang digunakan ada kafein. Kafein untuk hewan uji mencit sebagai tonikum sebesar 100 mg/kgBB, Jadi dosis yang diberikan adalah 2 mg/20g BB mencit (Turner 1965). Konsentrasi larutan kafein yang digunakan yaitu 0,4% dengan volume pemberian untuk mencit yang beratnya 20 gram dengan kafein 0,4% adalah 0,5 ml (Turner 1965).

## **9. Pembuatan kontrol negatif**

Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquades. Pengambilan aquades yaitu diukur sebanyak 100 ml (Setyowati 2018).

## **10. Penentuan dosis**

**9.1. Ekstrak buah pare.** Dosis ekstrak etanol buah pare 200 mg/kgBB mencit. (Permadi & Ubaidillah 2016).

**9.2. Fraksi buah pare.** Dosis fraksi yaitu setara dengan dosis ekstrak etanol buah pare.

**9.3. Kafein.** Kafein merupakan kontrol positif yang dipakai sebagai tonikum dosisnya sebesar 100 mg/kg BB (Turner 1965 ).

## **11. Perlakuan hewan uji**

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian adalah mencit putih jantan dengan berat badan 20-30 g, umur 2-3 bulan, berjumlah 30 ekor. Hewan uji dibagi menjadi 5 kelompok, masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit diberi perlakuan secara oral dengan pembagian kelompok sebagai berikut :

Kelompok I : kontrol negatif diberikan aquadest 0,5 ml/20 g BB mencit per oral.

Kelompok II : kontrol positif diberikan kafein 100 mg/kgBB per oral.

Kelompok III : perlakuan ekstrak etanol 70% 200 mg/kg BB mencit per oral

Kelompok IV : perlakuan fraksi air setara dengan dosis ekstrak

Kelompok V : perlakuan fraksi etil asetat setara dengan dosis ekstrak

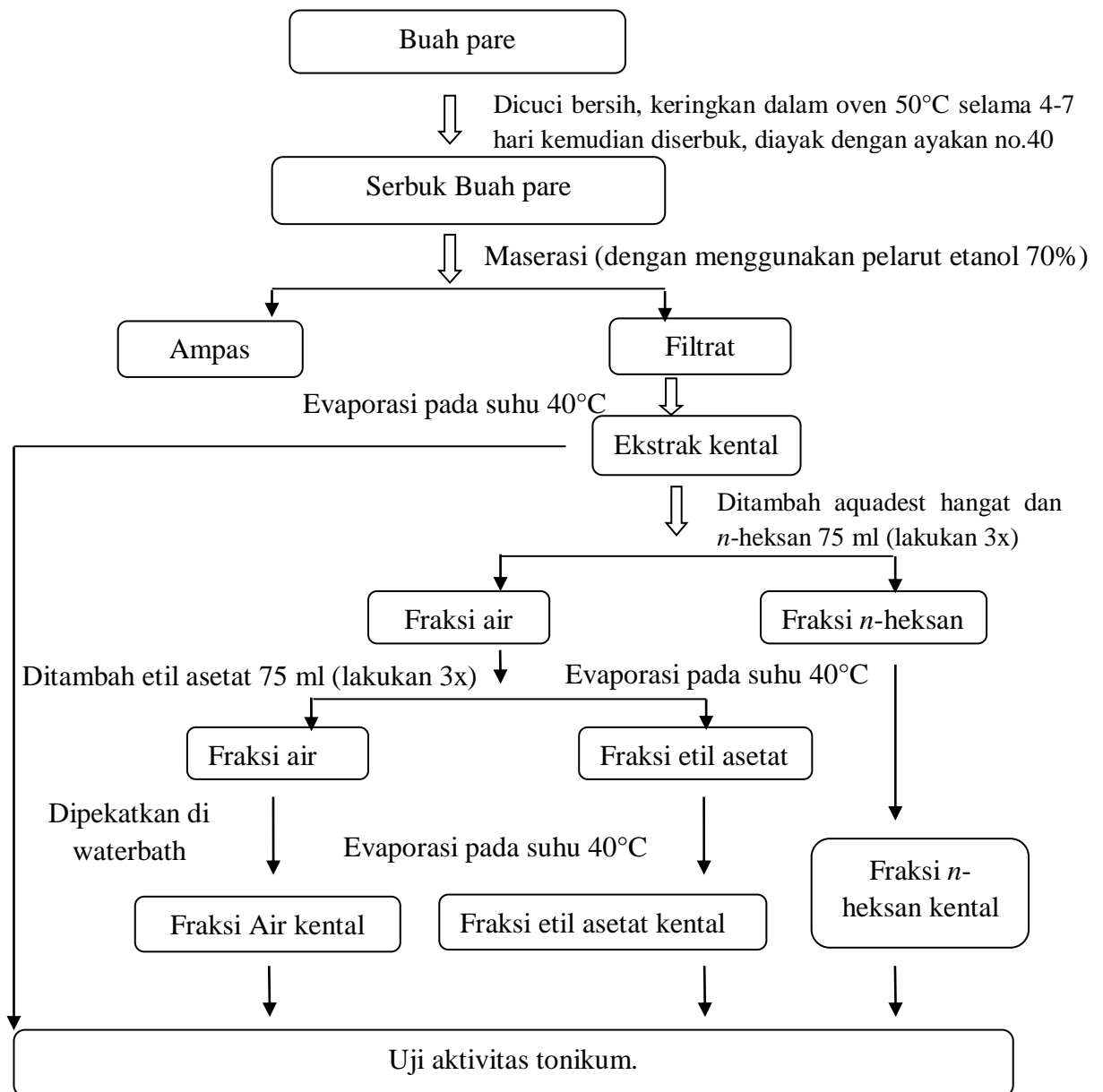
Kelompok VI : perlakuan fraksi n heksan setara dengan dosis ekstrak

## **12. Prosedur uji efek tonikum**

Masing-masing hewan uji sebelum diberi sediaan direnangkan terlebih dahulu ke dalam aquarium yang bergelombang. Kemudian setelah timbul lelah dengan tanda hewan uji membiarkan kepalanya di bawah permukaan air selama lebih dari 7 detik, hewan uji diangkat dari aquarium dan dicatat waktu lelahnya. Hewan uji diistirahatkan selama 30 menit, setelah itu hewan uji diberikan perlakuan sediaan peroral, 30 menit kemudian hewan uji direnangkan kembali dan dicatat waktu lelahnya. Data efek tonikum adalah penambahan daya tahan yang

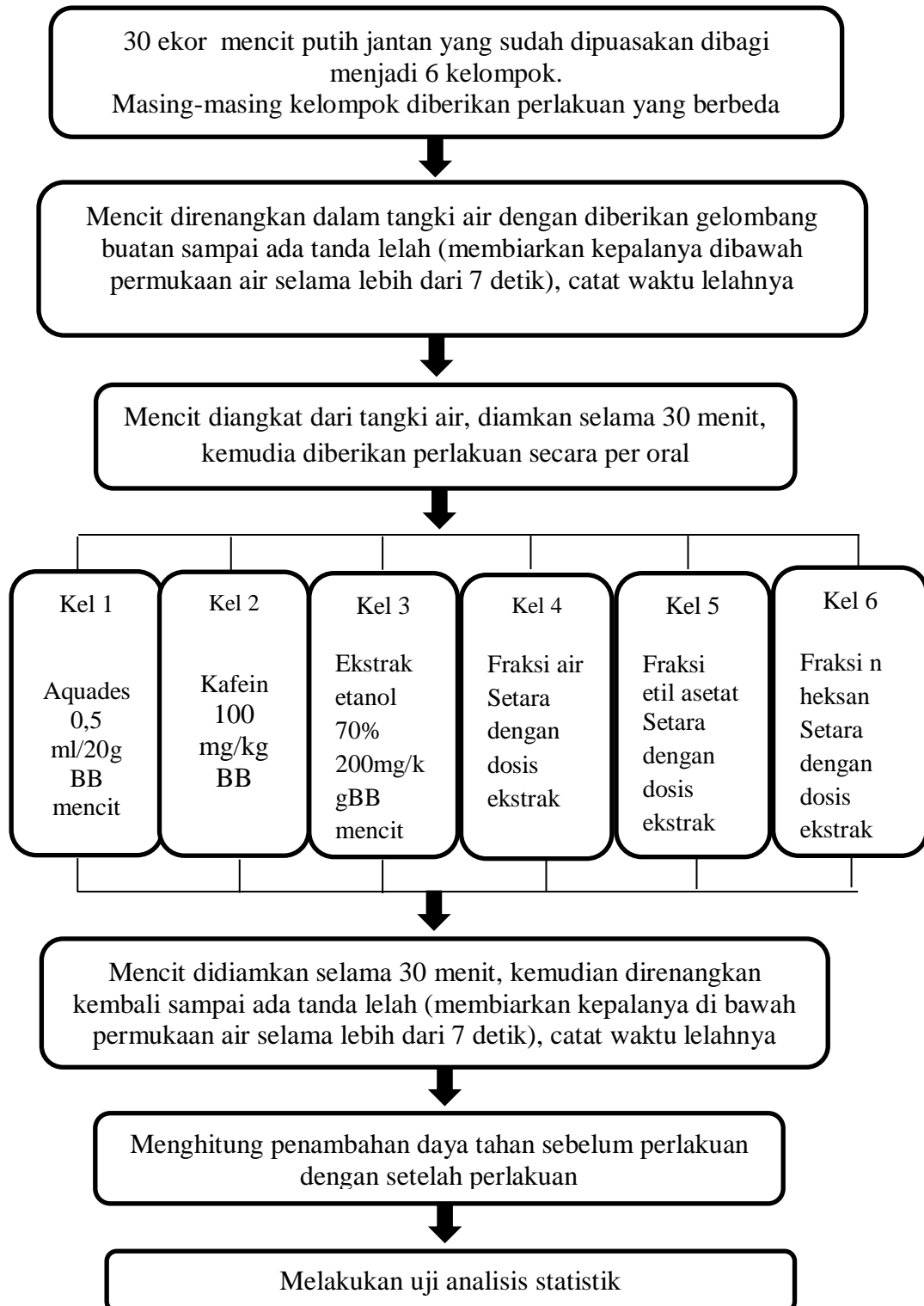


diperoleh dari selisih waktu lelah pada hewan uji sebelum perlakuan dan setelah perlakuan. Skema prosedur uji tonikum dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanolik dan fraksinasi buah pare

Prosedur pengujian aktivitas tonikum secara skematis :



Gambar 3. Skema jalanya penelitian

### **E. Analisa Data**

Analisis data yang didapatkan dalam penelitian ini berupa data untuk mendapatkan fraksi yang paling efektif buah pare sebagai penambah daya tahan tubuh mencit jantan (*Mus musculus*). Data dianalisa dengan software SPSS diuji normalitas dan homogenitas . Data hasil pengukuran daya tahan tubuh dianalisis dengan *Shapiro - Wilk Test* untuk mengetahui data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak. Data terdistribusi normal ( $p > 0,005$ ), data dianalisa dengan anova. Data tidak terdistribusi normal ( $p < 0,005$ ) dapat dilakukan analisis secara non parametrik menggunakan *Kruskal-Wallis Test*. Untuk uji homogenitas menggunakan *Lavene statistic* (Hariyati, 2018).