

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi Dan Sampel

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sumber pengambilan sampel populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh bagian dari pegagan (*Centella asiatica L.*) yang didapatkan didaerah solo.

Sampel adalah bentuk dari populasi yang dijadikan sebagai sumber informasi bagi semua data yang diperlukan untuk menjawab permasalahan didalam penelitian. Sampel merupakan bagian dari populasi. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah seluruh bagian pegagan (*Centella asiatica L.*) kecuali akarnya

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstraksi dengan pelarut etanol 70%, fraksinasi dengan pelarut *n*-heksan sebagai pelarut non polar, etil asetat sebagai pelarut semi polar, dan air sebagai pelarut polar dari herba pegagan (*Centella asiatica L.*).

Variabel utama kedua adalah aktivitas peningkatan daya ingat ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol herba pegagan (*Centella asiatica L.*).

2. Klasifikasi variabel utama

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

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas adalah suatu variabel yang variasinya mempengaruhi variasi lain. Variabel bebas dapat dimanipulasi agak efeknya terhadap variabel lain dapat diamati dan diukur. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol

herba pegagan (*Centella asiatica L.*) yang diberikan secara oral terhadap hewan uji.

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung adalah suatu variabel yang variasinya dipengaruhi oleh variasi lain. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah efek peningkatan daya ingat dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air herba pegagan (*Centella asiatica L.*) dengan metode maze radial 8 lengan.

2.3 variabel kendali. Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga variabel tersebut perlu ditetapkan kualifikasi lain. Variabel terkendali pada penelitian ini adalah jenis kelamin hewan uji, kondisi fisik maupun lingkungan, kondisi laboratorium dan kondisi peneliti, metode uji, ekstraksi, fraksinasi.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, pembuatan serbuk adalah batang dan daun herba pegagan (*Centella asiatica L.*) yang segar kemudian dicuci bersih dengan air mengalir, dirajang, lalu dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C, kemudian diblender dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Kedua, ekstrak etanol 70% herba pegagan (*Centella asiatica L.*) adalah hasil ekstrak dari serbuk herba pegagan dengan pelarut etanol 70% secara maserasi

Ketiga, fraksi *n*-heksana adalah ekstrak kental herba pegagan (*Centella asiatica L.*) yang kemudian dipartisi dengan *n*-heksana dan air hangat.

Keempat, fraksi etil asetat adalah residu fraksi *n*-heksan yang dipartisi etil asetat.

Kelima, fraksi air adalah residu sisa partisi dengan etil asetat.

Keenam, aktivitas peningkatan daya ingat adalah aktivitas yang dapat diukur dari kemampuan hewan uji dalam mencari makanan didalam maze berdasarkan jumlah kesalahan dalam memasuki setengah lengan pada maze dan tidak memakan umpan.

C. Bahan, Alat, dan Hewan Uji

1. Bahan

Bahan yang digunakan adalah herba pegagan, etanol 70%, etil asetat, *n*-heksana, kain flannel, kertas saring, plat KLT silica GF₂₅₄, ginkgo biloba, CMC-Na, Pb asetat. Air suling,.

2. Alat

Alat untuk membuat simplisia seperti blender, ayakan mesh 40. alat penyari yang digunakan adalah alat – alat gelas, peralatan maserasi, kain flannel, corong pisah, *rotary vacuum evaporator*. alat untuk mengukur kadar air adalah *sterling bidwell*. alat untuk mengukur bobot jenis adalah *piknometer*, timbangan elektrik. mortar dan stamper. Alat untuk perlakuan hewan uji yaitu timbangan mencit, spuit oral, dan kandang mencit. Alat pengujian untuk daya ingat *maze radial 8 lengan*.

3. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan atau betina galur Balb/c dengan berat badan ± 20 gram dan berumur 2–3 bulan sebanyak 30 ekor untuk uji peningkatan daya ingat. Pengelompokan dilakukan secara acak sebanyak 5 ekor per kelompok uji. Pengelompokan dibagi menjadi 6 kelompok uji, kelompok kontrol pembanding, kelompok kontrol negative, 1 kelompok sediaan uji ekstrak, 3 kelompok sediaan uji fraksi. Hewan uji tersebut diperoleh dari Labotarium Farmakologi dan Toksikologi, Fakultas Farmasi, Universitas Setiabudi Surakarta.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Pada tahap awal dilakukannya penelitian ini terlebih dahulu dilakukan uji determinasi terhadap sampel pegagan untuk membuktikan kebenarannya.

2. Pembuatan serbuk herba pegagan dan serbuk susut pengeringan

Batang dan daun pegagan diambil dalam keadaan bersih, kering, dan tidak dalam keadaan busuk, kemudian dicuci dengan air mengalir untuk membersihkan kotoran yang masih menempel pada batang dan daun pegagan. batang dan daun

dipotong menjadi beberapa bagian setelah itu dikeringkan didalam oven pada suhu 40-50°C sampai kering. Setelah kering batang dan daun pegagan dihaluskan dengan alat *toothed disc mills* yang kemudian hasilnya diblender untuk mendapatkan serbuk yang cukup halus dan diayak dengan pengayak nomor 40 untuk mendapatkan derajat serbuk yang lebih halus dan homogen. Hasil serbuk dimasukkan didalam wadah kering dan tidak lembab yang selanjutnya digunakan untuk penelitian.

3. Pembuatan ekstrak etanol herba pegagan

Pembuatan ekstrak etanol herba pegagan dilakukan dengan metode maserasi menggunakan cairan penyari alkohol 70% dengan cara mengambil herba pegagan yang sudah diserbuk, kemudian ditimbang sebanyak 1000 gram. Serbuk dimasukkan didalam botol berwarna gelap dan ditambahkan etanol 70% sebanyak 7,5 L. kemudian dikocok dan segera ditutup. botol didiamkan selama 5 hari sambil sering diaduk dan pengocokan berulang. Setelah 5 hari filtrat disaring menggunakan kain flannel, sedangkan sisa ampasnya dibilas dengane etanol 70% secukupnya sampai diperoleh filtrat 100 bagian. ekstrak cair yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C sampai mendapatkan ekstrak kental (Depkes 1986). Rendemen ekstrak ditetapkan dengan menimbang hasil dari ekstrak kemudian dibagi serbuk herba pegagan kering dan dikalikan 100%

4. Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak

Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak herba pegagan dilakukan dengan alat *moisture balance*, dengan cara menimbang serbuk herba pegagan ± 2 gram dan dimasukkan dalam wadah, suhu diatur 105°C sampai pemanasan berhenti. Dicatat hasil susut pengeringan pada alat dalam satuan persen (%) terhadap bobot awal. Penetapan susut pengeringan dilakukan sebanyak 3 kali. Kadar air serbuk dan ekstrak pegagan yang memenuhi syarat jika kadar air tidak lebih dari 10% (Depkes 2008)

5. Penetapan bobot jenis ekstrak

Penetapan bobot jenis ekstrak herba pegagan didalam etanol (70%) dilakukan menggunakan alat piknometer. Prosedur penetapan bobot jenis

menggunakan *piknometer* bersih, kering dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot *piknometer* dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25°C. Diatur hingga suhu zat uji lebih kurang 20°C, dimasukkan kedalam *piknometer*. Diatur suhu *piknometer* yang telah diisi hingga suhu 25°C, dibuang kelebihan zat uji dan ditimbang, bobot *piknometer* yang telah diisi dikurangi dengan bobot *piknometer* kosong (Depkes 2000).

Bobot jenis satu zat adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot zat dengan bobot air, dalam *piknometer*. Kecuali dinyatakan lain dalam monografi keduanya ditetapkan pada suhu 25°C (Depkes 1995).

6. Pembuatan fraksi ekstrak etanol herba pegagan

Ekstrak etanol kental herba pegagan diperoleh dari hasil maserasi dengan etanol, kemudian ekstrak etanol herba pegagan ditambahkan air suling dengan perbandingan 1:10 (7,5 g:75 ml) untuk melarutkan ekstrak, kemudian dimasukkan dalam corong pisah dan ditambahkan 75 ml *n*-heksana dan digojoj hingga ekstrak berpartisi ke kedua lapisan penyari selama 15 menit, setelah itu corong pisah didiamkan hingga membentuk lapisan air dan lapisan *n*-heksana. Kemudian kedua lapisan dipisahkan lapisan bagian atas sebagai filtrat *n*-heksana dan lapisan bawah sebagai filtrat air. Dilakukan penyarian ulang terhadap lapisan air menggunakan *n*-heksana sebanyak dua kali 75 ml. kemudian dipisahkan kembali antara filtrate air dan *n*-heksana. Filtrate fraksi *n*-heksana kemudian dicampur menjadi satu dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ hingga diperoleh fraksi kering. Lapisan ini kemudian disebut fraksi kering *n*-heksana.

Lapisan air yang dimasukkan kembali kedalam corong pisah kemudian ditambahkan 75 ml etil asetat dan kemudian digojoj selama 15 menit atau hingga ekstrak berpartisi kedalam kedua lapisan cairan penyari, setelah itu corong pisah didiamkan hingga lapisan etil asetat dan lapisan air suling terpisah menjadi dua bagian. Dipisahkan kedua lapisan, lapisan atas diambil sebagai fraksi etil asetat dan bagian bawah diambil sebagai fraksi air. Fraksi etil asetat kemudian dikumpulkan kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ hingga diperoleh fraksi etil asetat kering. Lapisan air juga dipekatkan

menggunakan *rotary evaporator* pada suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ hingga diperoleh fraksi air kering. Setelah diperoleh fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air ekstrak etanol herba pegagan, fraksi-fraksi tersebut ditimbang kembali menggunakan neraca analitik, setelah didapatkan berat pada masing – masing pada tiap fraksi kemudian dihitung nilai rendemen pada setiap fraksi. Rendemen fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air diperoleh dari hasil bobot penimbangan masing – masing fraksi kemudian dibagi bobot ekstrak etanol herba pegagan yang digunakan dalam fraksinasi dan dikalikan 100%, total dari ketiga rendemen tersebut tidak boleh lebih dari 100%. Skema pembuatan ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada gambar 2.

7. uji kualitatif kandungan senyawa ekstrak herba pegagan.

8.1 Terpenoid. Sebanyak 0.5 gram ekstrak herba pegagan ditambah 1 tetes Lieberman burchard. Hasil positif terpenoid menunjukkan reaksi adanya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutannya, pada steroid akan menunjukkan cincin biru kehijauan (Sarker 2006).

8.2 Tanin. Sebanyak 0.5 gram ekstrak herba pegagan ditambah 10 ml air panas, kemudian dipanaskan selama 15 menit dan disaring. Filtrat yang diperoleh sebanyak ± 5 ml ditambah FeCl 1%. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna biru tua atau hitam (Robinson 1995).

8.3 Fenolik. Sebanyak 0.5 gram ekstrak dilarutkan dengan pelarut secukupnya. Ditambahkan beberapa tetes pereaksi FeCl 1%. Hasil positif menunjukkan dengan terbentuknya warna hijau, merah, ungu, biru dan hitam pekat.

8.4 Flavonoid. Sebanyak 0.5 gram ekstrak dilarutkan dengan pelarut secukupnya, diambil 5 ml lalu ditambahkan 0,1 g serbuk Mg, 2 ml larutan alkohol, 2 ml HCl. pelarut amil alkohol, lalu dikocok kuat dan dibiarkan memisah, jika terjadi warna merah sampai merah ungu menunjukkan flavonoid, jika terjadi warna kuning menunjukkan adanya flavon, kalkon, auron (Robinson 1995)

8. Identifikasi golongan senyawa dengan KLT

Identifikasi kandungan senyawa kimia dimaksudkan untuk menetapkan keberadaan senyawa kimia herba pegagan. Identifikasi kandungan senyawa kimia meliputi flavonoid, tannin, terpenoid, dan fenolik

9.1 Flavonoid. Ekstrak dan fraksi dilarutkan dengan sedikit pelarutnya, lalu ditotolkan pada fase diam silica gel GF₂₅₄. Baku pembanding yang digunakan adalah quersetin. Elusi plat KLT menggunakan fase gerak *n*-heksana : Etil asetat asam formiat (6:4:0,2). Fase diam dikeringkan, dilihat pada UV 254 nm dan 366 nm, kemudian disemprot menggunakan pereaksi sitroborat. Hasil positif ditunjukkan bercak berwarna kuning cepat pudar (Depkes RI 1986).

9.2 Tannin. Ekstrak dan fraksi dilarutkan dengan sedikit pelarutnya, lalu ditotolkan pada fase diam silika gel GF₂₅₄. Baku pembanding yang digunakan adalah asam galat. Elusi plat KLT menggunakan *n*-heksana : etil asetat (3:7). Fase diam dikeringkan dilihat pada UV 254 nm dan 366 nm, kemudian disemprot dengan pereaksi FeCl₃. Hasil positif ditandai bercak hijau kehitaman (Harbone 1987).

9.3 Terpenoid/steroid. Ekstrak dan fraksi dilarutkan dengan sedikit pelarutnya. Lalu ditotolkan pada fase diam silica gel GF₂₅₄. Baku pembanding yang digunakan adalah stigmasterol. Elusi plat KLT menggunakan *n*-heksana : etil asetat (4 : 1). Fase diam dikeringkan , dilihat pada UV 254 dan 366 nm, kemudian disemprot dengan pereaksi Lieberman – burchard, hasil positif akan membentuk bercak merah keunguan untuk senyawa terpenoid dan warna biru kehitaman untuk senyawa steroid (Harbone 1987).

9. Persiapan pengujian daya ingat

9.1 CMC-Na 0.5%. CMC-Na dibuat dengan konsentrasi 0.5% yang digunakan sebagai pelarut ekstrak, fraksi, kontrol positif, dan kontrol negatif, larutan stok ini dibuat dengan menimbang serbuk CMC-Na sebanyak 500 mg dimasukkan kedalam mortar dan ditambah aquadest panas, digerus sampai mengembang dan ditambahkan sedikit demi sedikit aquadest panas hingga 100 ml aduk hingga homogen.

9.2 Suspensi ginkgo biloba. Pembuatan suspensi ginkgo biloba dibuat dengan cara menimbang 500 mg CMC – Na 0.5% dan ditambahkan aquadest panas sedikit demi sedikit ditunggu 10 menit hingga mengembang. Tambahkan serbuk ginkgo biloba diaduk sampai homogen kemudian ditambah air suling 100 ml aduk sampai homogen.

9.3 Pembuatan suspensi ekstrak dan fraksi. Pembuatan suspensi ekstrak dan fraksi dibuat dengan cara menimbang 500 mg CMC-Na 0.5% dan ditambah aquadest panas sedikit demi sedikit ditunggu 10 menit hingga mengembang. Kemudian ditambah ekstrak atau fraksi (sesuai perhitungan) diaduk hingga homogeny kemudian ditambah air suling sampai 100 ml aduk sampai homogen.

10. Penentuan dosis

10.1 Dosis ginkgo biloba. Dosis dalam 1 kapsul ginkgo biloba berisi 500mg / 70kg BB manusia. Dosis untuk manusia 500 mg/ 70kg bb dikonversikan ke mencit $500\text{mg} \times 0.0026$ maka diperoleh dosis ginkgo biloba 1,3 mg/20g BB mencit.

10.2 Dosis ekstrak dan fraksi. Berdasarkan dosis penelitian Mirza *et al* (2013) mendapatkan dosis efektif ekstrak pegagan dalam meningkatkan daya ingat sebesar 300 mg / kg BB tikus. Dosis untuk tikus (200 g) didapatkan 60 mg/ 200g BB tikus. Factor konversi tikus dengan berat badan 200 g terhadap mencit dengan berat 20 g adalah 0.14. dosis untuk mencit adalah 60 mg dikali 0.14 sehingga didapatkan 8.4 mg / 20g BB mencit atau 420 mg/ kg BB, maka diperoleh dosis awal sebagai dosis orientasi yang selanjutnya akan digunakan untuk penetapan variasi dosis ekstrak etanol pegagan dalam tiga peringkat variasi konsentrasi yang berbeda, yaitu $\frac{1}{2}$ dosis (210 mg/kg BB) ; 1x dosis (420 mg/ kg BB); dan 2 x dosis (840 mg/ kg BB).

Dosis fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air ekstrak pegagan dapat dihitung dengan cara:

$$DF = \frac{\text{Rendemen fraksi (\%)}}{\text{total rendemen fraksi (\%)}} \times \text{dosis ekstrak efektif}$$

Keterangan : DF = Dosis fraksi (*n*-heksana, etil asetat, air).

10.3 Dosis PB asetat. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Wicaksono (2017) didapatkan dosis Pb asetat untuk tikus sebesar 100 mg/bb BB. Dosis tersebut diubah kedalam dosis mencit $20/1000 \times 100\text{mg}$ dan didapatkan hasil 2 mg/20gr BB mencit.

11. Uji aktivitas peningkatan daya ingat

11.1 Tahap adaptasi. Adaptasi hewan uji dilakukan agar hewan uji dapat beradaptasi dengan metode uji dan tidak merasa bingung, aneh, gelisah ketika masuk kedalam *maze* radial delapan lengan. Pengujian dilakukan terhadap semua kelompok uji dengan masing – masing hewan uji diberi waktu adaptasi didalam *maze* selama kurang lebih 10 menit selama 5 – 7 hari berturut. Pada masing - masing ujung lengan *maze* diberi umpan berupa pelet makanan mencit dalam kondisi ruangan pada ujung *maze* tetap dibiarkan terbuka agar mencit mudah untuk melihat makanan tersebut.

11.2 Tahap induksi/pre test. Tahap pre test bertujuan untuk mengetahui efek penurunan daya ingat terhadap plumbum asetat. Pemberian sediaan induksi dilakukan selama 7 hari hari terhadap 6 kelompok hewan uji didalam maze radial 8 lengan selama 10 menit. Perlakuan dihentikan ketika sudah mencapai batas waktu 10 menit.

11.3 Tahap perlakuan/post test. Tahap post test bertujuan untuk mengetahui apakah ada peningkatan daya ingat hewan uji sesudah diberikan zat radikal bebas dan diberikan pengobatan. Pada tahap ini pemberian penginduksi dihentikan dan diganti dengan kontrol positif ginko biloba, dosis ekstrak pegagan, dosis fraksi air, dosis fraksi etil asetat, dosis fraksi *n*-Heksana sesuai dengan dosis yang ada, Pengujian daya ingat dilakukan menggunakan metode *maze* radial delapan lengan dan parameter yang dilihat kesalahan hewan uji ketika memasuki lebih dari setengah lengan *maze* tetapi tidak memakan umpan dan jumlah lengan yang dimasuki oleh hewan uji. Pengujian dilakukan selama kurang lebih 10 menit dan kurang lebih 10 – 12 hari. Skema pengujian daya ingat dapat dilihat pada gambar 3.

12. Perhitungan daya ingat

Parameter persen peningkatan daya ingat berdasar kan jumlah lengan yang dimasuki yang dimasuki dan pilihan yang salah dari delapan lengan metode *maze* radial 8 lengan (kesalahan tipe B) selama 10 menit. Kesalahan diperhitungkan apabila tikus memasuki lengan *maze* radial delapan lengan lebih dari separuh panjang lengan tetapi tidak memakan umpan yang sudah disediakan (Hamidi 2009). Perhitungan % daya ingat dapat dihitung dengan cara :

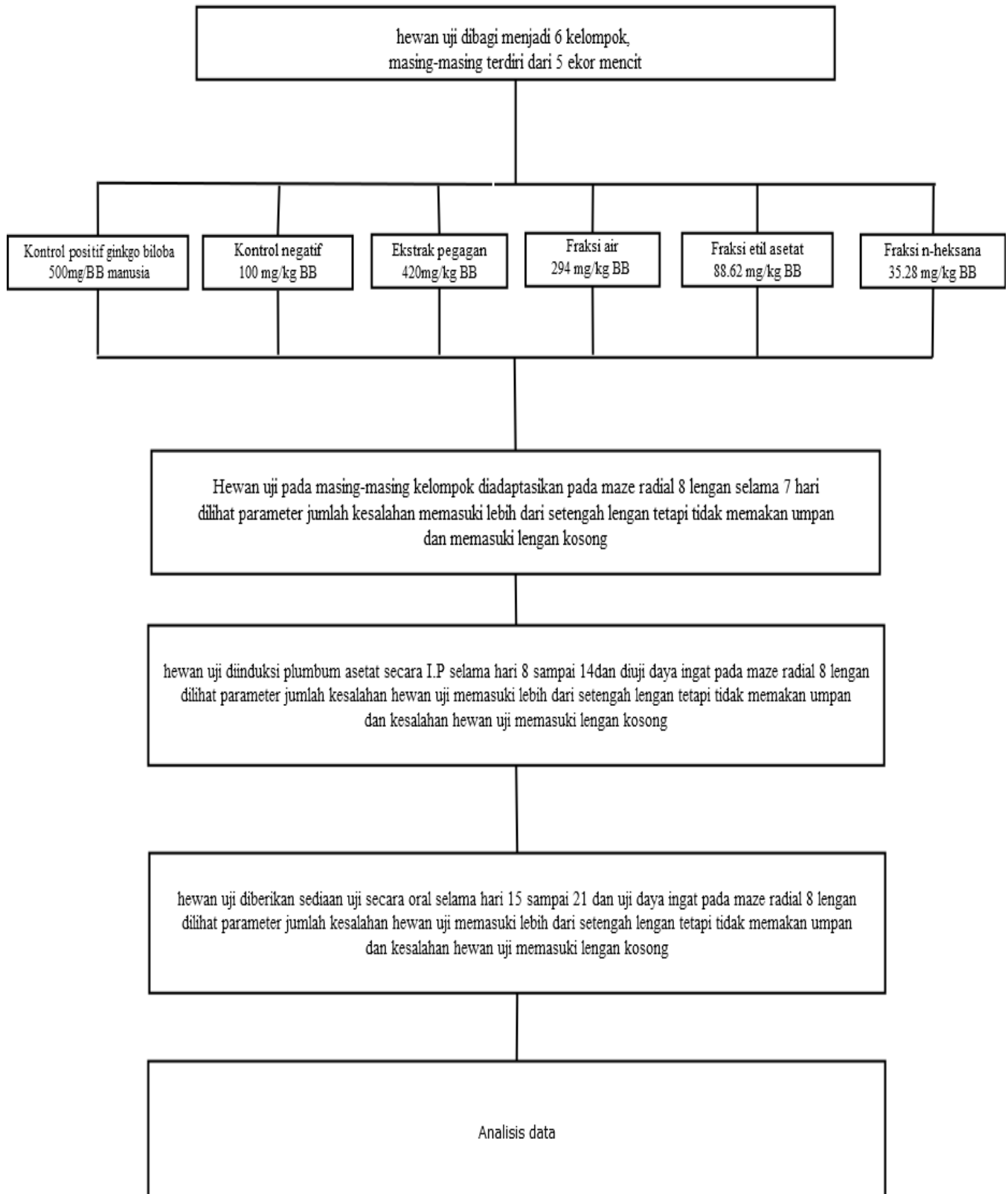
$$\% \text{ daya ingat} = \frac{\text{Memasuki lebih dari setengah lengan pada Maze radial delapan lengan tetapi tidak memakan umpan}}{\text{jumlah lengan yang dimasuki}} \times 100\%$$

E. Analisis data

Data persentase daya ingat pada masing – masing kelompok dianalisis secara statistic dengan uji *Kolmogorov – smirnov test* untuk normalitas distribusi normal. Jika data terdistribusi normal ($p > 0.05$) maka dilanjutkan uji *levene* untuk melihat homogenitas data jika tidak normal menggunakan uji *man whitney* atau disebut uji non parametrik untuk melihat perbedaan yang bermakna atau tidak . Jika data terdistribusi normal dan homogen terus dilanjutkan dengan uji ANOVA *twi way* dengan taraf kepercayaan 95% untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antar kelompok perlakuan. Jika data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen menggunakan metode *kruskal – willis*. Kemudian dilanjutkan dengan uji LSD untuk melihat perbedaan antar kelompok bermakna (signifikan) ($p < 0.05$) atau tidak bermakna (tidak signifikan) ($p > 0.05$).



Gambar2. skema ekstraksi dan fraksinasi pegagan



Gambar 3. Skema uji daya ingat ekstrak dan fraksi