

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini yaitu Tanaman Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) yang berasal didaerah Dolopo, Madiun, Jawa Timur.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) yang sudah siap dipanen yaitu saat tanaman memiliki kuncup bunga .

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah ekstrak etanol herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*). Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah efek tonikum pada mencit putih jantan (*Mus musculus*).

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu 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 dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*)

dalam berbagai variasi dosis yang diberikan pada mencit putih jantan (*Mus musculus*).

Variabel tergantung merupakan akibat dari variabel utama. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah efek tonikum pada hewan uji setelah diberi perlakuan. Perlakuan pada hewan uji dilakukan dengan pemberian ekstrak etanol herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) pada dosis berbeda-beda sebagai kelompok uji, kontrol normal, dan kontrol positif.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kuantitasnya supaya diperoleh hasil yang tepat. Pada penelitian ini yang termasuk variabel terkendali yaitu kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, usia, jenis kelamin, dan lingkungan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) adalah herba yang diambil dengan kondisi yang masih segar berwarna hijau, lengkap dari bagian kuncup bunga, daun batang dan akar yang diambil secara acak, dari daerah Dolopo, Madiun, Jawa timur.

Kedua, serbuk herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) adalah herba yang dikumpulkan lalu dilakukan sortasi kering, lalu dicuci dan dilakukan sortasi basah, kemudian dilakukan perajangan dan dikeringkan, kemudian diserbuk dengan menggunakan alat dan diayak pada ayakan no. 40. Sehingga didapatkan serbuk halus.

Ketiga, ekstrak etanol herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) adalah hasil dari penyarian serbuk herba bandotan menggunakan cairan penyari berupa etanol 70% dilakukan dengan cara maserasi. Setelah itu hasil dari penyarian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental.

Keempat, hewan uji yang digunakan adalah mencit putih jantan galur Swiss, berumur 2-3 bulan dengan berat badan 20-40 gram.

Kelima, metode uji yang digunakan adalah *Natatory exhaustion*, digunakan untuk mengetahui efek tonikum dengan cara direnangkan, lalu dilihat selisih waktu sebelum dan sesudah diberi perlakuan.

Keenam, kontrol positif yang digunakan adalah kafein, karena memiliki aktivitas stimulan yang meningkatkan kewaspadaan dan mengurangi kelelahan.

Ketujuh, waktu lelah adalah interval dari waktu memasukkan hewan uji ke dalam tangki air hingga timbul lelah, waktu dimana mencit sudah tenggelam dibawah air selama 7 detik.

Kedelapan, efek tonikum adalah efek yang menambah waktu lelah.

Kesembilan, dosis efektif adalah dosis terkecil yang mempunyai efek tonikum sebanding dengan kontrol positif.

C. Alat, Bahan, dan Hewan uji

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, alat untuk membuat ekstrak etanol herba bandotan adalah timbangan digital, botol maserasi, gelas ukur, corong, batang pengaduk, beker glass, kain flanel. Alat untuk menguji efek tonikum adalah *natatory exhaustion*, sonde oral, beaker glass, batang pengaduk, gelas ukur.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) yang diperoleh dari daerah Dolopo, Madiun, Jawa Timur. Bahan kimia yang digunakan yaitu etanol 70%, CMC Na, kafein, dan aquadest.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan galur Swiss, berumur 2-3 bulan dengan berat badan 20-40 gram.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Tahap awal yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi terhadap kebenaran sampel yang akan digunakan yaitu herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*). Determinasi dilakukan di Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengambilan sampel

Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) yang diambil didaerah Dolopo, Madiun, Jawa Timur. Pengambilan secara acak dengan keadaan tumbuhan segar dan bebas dari hama atau penyakit. Pengambilan dilakukan bulan desember 2018.

3. Pengeringan dan pembuatan serbuk

Setelah dilakukan pengambilan dan pengumpulan herba Bandotan, lalu dilakukan sortasi kering dan dilakukan pencucian. Kemudian dilakukan sortasi basah dan perajangan, setelah itu dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 40°C selama 3 hari hingga didapatkan herba yang kering. Herba yang telah kering

kemudian dibuat serbuk dengan cara diserbukkan menggunakan alat dan diayak pada ayakan no.40.

4. Penetapan kadar kelembaban serbuk

Serbuk herba bandotan yang diperoleh dihitung kadar kelembaban dalam (%) dengan cara sebagai berikut : sebanyak 2 gram serbuk yang telah ditimbang kemudian diukur susut pengeringannya dengan menggunakan alat *Moisture Balance* pada suhu 105 derajat celcius dan ditunggu sampai berbunyi yang tandanya sudah selesai. Angka yang tertera adalah persen kadar lembab yang dihasilkan oleh serbuk herba Bandotan. Batas maksimum kadar lembab simplisia adalah 10% (Depkes RI, 2008).

5. Identifikasi kandungan senyawa pada herba bandotan

Pada proses identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kebenaran kandungan senyawa pada herba bandotan meliputi senyawa flavonoid, tanin dan saponin.

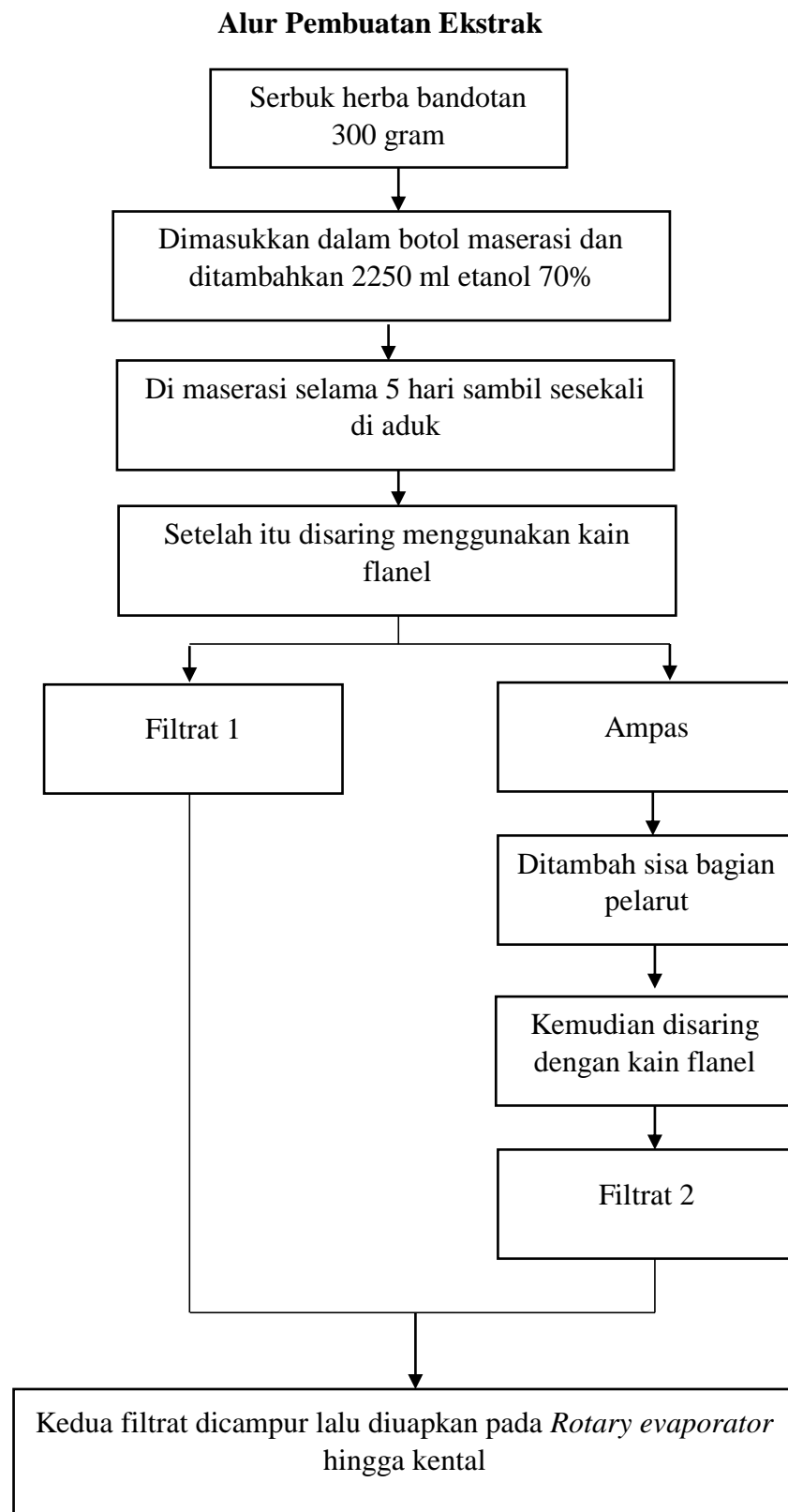
- a. **Identifikasi flavonoid.** Identifikasi flavonoid dilakukan dengan cara 1ml ekstrak ditambah 0,1 gram serbuk Mg ditambah 2 ml larutan alkohol:asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol. Campuran ini kocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1980).
- b. **Identifikasi saponin.** Dilakukan dengan cara 1ml larutan ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambah 10ml air panas dan biarkan menjadi dingin, sesudah itu dikocok dengan kuat selama 10 detik maka akan terbentuk busa/buih yang stabil (Depkes RI, 1980).

c. **Identifikasi tanin.** Dilakukan dengan cara 1,0 gram ekstrak ditambahkan air kemudian didihkan selama beberapa menit, setelah larutan ditambahkan FeCl_3 . Terbentuknya warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin (Harbone, 2007).

6. Pembuatan ekstrak herba Bandotan

Pembuatan ekstrak herba Bandotan dilakukan dengan metode maserasi yaitu sebanyak 300 gram serbuk herba bandotan kering dengan pelarut etanol 70 %. Maserasi dilakukan dengan cara 10 bagian simplisia dengan derajat kehalusan yang cocok dimasukkan kedalam bejana, kemudian dituangi 75 bagian penyari, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari sambil diaduk-aduk, kemudian diserkai lalu ampas diperas. Ampas ditambahkan cairan penyari hingga 100 bagian (Depkes RI, 1986).

Pertama serbuk dimasukkan botol maserasi, lalu ditambah dengan etanol 70% sebanyak 75 bagian yaitu 2250 ml dan disimpan ditempat gelap sambil sesekali diaduk. Setelah 5 hari dilakukan penyaringan dengan menggunakan kain flanel. Ampas setelah disaring ditambah sisa bagian pelarut, lalu saring kembali dengan kain flanel, hasil filtrat ditambahkan ke dalam filtrat pertama. Filtrat pertama dan kedua dijadikan satu Campuran filtrat akan di uapkan menggunakan *Rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga menjadi ekstrak kental.



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanol herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*)

7. Pembuatan larutan CMC Na.

Pembuatan larutan CMC Na 0,5% dilakukan dengan cara menimbang CMC Na 0,5 gram lalu dilarutkan dalam air sampai 100 ml sehingga didapatkan konsentrasi 0,5 %. Larutan ini digunakan sebagai kontrol normal yang akan di oralkan pada hewan.

8. Penentuan dosis kafein

Pada penelitian Mafitri H.M & Parmadi A (2018) digunakan kafein dengan dosis 13mg/kg BB untuk menghasilkan efek tonikum pada mencit, dengan konsentrasi 0,1 %. Pembuatan larutan dilakukan dengan cara menimbang 100 mg kafein lalu dilarutkan dalam larutan CMC Na 0,5% sampai 100 ml.

9. Pengujian efek tonikum

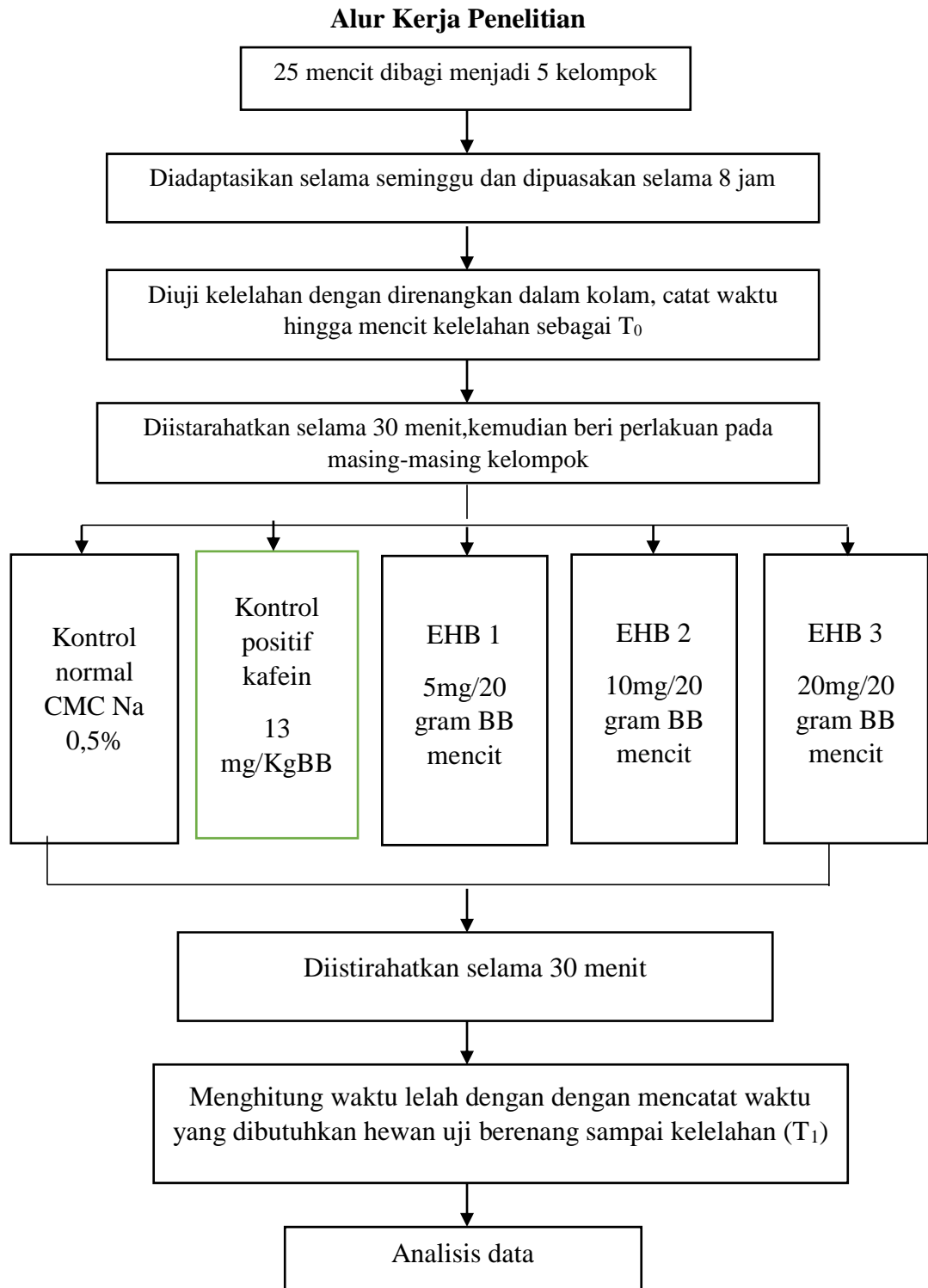
Prosedur pengujian efek tonikum pada mencit jantan galur Swiss, dengan mengelompokkan sesuai dengan kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 5 mencit yang diadaptasikan dengan lingkungan selama 1 minggu dan dipuasakan terlebih dahulu 8 jam sebelum pemberian perlakuan.

1. Kelompok kontrol normal, digunakan 5 ekor mencit yang diberikan CMC Na 0,5% secara oral.
2. Kelompok kontrol positif, digunakan 5 ekor mencit yang diberikan kafein sebanyak 13 mg/KgBB secara oral.
3. Kelompok EHB 1, digunakan 5 ekor mencit yang diberikan larutan ekstrak herba bandotan 5 mg/20 gram secara oral.
4. Kelompok EHB 2, digunakan 5 ekor mencit yang diberikan larutan ekstrak herba bandotan 10 mg/20gram secara oral.

5. Kelompok EHB 3, digunakan 5 ekor mencit yang diberikan larutan ekstrak herba bandotan 20 mg/20 gram secara oral.

Semua kelompok mencit terlebih dahulu direnangkan dalam kolam, waktu yang dibutuhkan mencit sampai merasa kelelahan di hitung sebagai (T_0). Setelah itu masing-masing kelompok diistirahatkan selama 30 menit. Kemudian masing-masing kelompok akan diberi perlakuan yang berbeda-beda.

Setelah diberi perlakuan masing-masing mencit diistirahatkan selama 30 menit hingga obat diabsorpsi tubuh mencit, kemudian direnangkan di kolam *Natatory excaustion*, lalu dicatat waktu yang digunakan mencit bertahan didalam kolam (T_1), disini dihitung waktu lelah yaitu waktu yang dibutuhkan mencit hingga lelah ditandai dengan tenggelam selama lebih dari 7 detik. Kemudian dilakukan analisa data.



Gambar 4. Skema kerja penelitian.

E. Analisis Hasil

Data yang diperoleh pada penelitian ini adalah berupa waktu lelah yang diperoleh dari selisih waktu lelah hewan uji setelah dan sebelum perlakuan dari masing-masing kelompok. Metode analisis yang digunakan untuk uji statistik dengan menggunakan program SPSS 17.0. Dianalisis dengan *Kolmogorov-Smirnov Test*. Jika data terdistribusi normal (signifikan $> 0,05$) analisis data dilanjutkan dengan *One Way Anova* dengan taraf kepercayaan 95% menggunakan output program SPSS, untuk mengetahui perbedaan yang nyata antar perlakuan.

Jika hasil uji *One Way Anova* dan uji *Lavene Statistik* menunjukkan hasil normal (signifikan $> 0,05$), selanjutnya dilakukan uji *Tukey* untuk melihat waktu lelah atau efek tonikum yang paling baik diantara kelompok perlakuan dan perbedaan antara masing-masing kelompok perlakuan dan perbedaan antara masing-masing kelompok. Namun jika hasilnya tidak normal, maka digunakan uji non perametik menggunakan *Kruskal Wallis Test* dan uji lanjutan *Mann-Whitney Test*.