

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ubi kates (*Ipomoea cairica*) yang berada di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan adalah daun ubi kates (*Ipomoea cairica*) yang diambil secara acak di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Pengambilan tanaman ubi kates meliputi bagian tanaman dari daun. Pengambilan daun ubi kates yang diambil adalah daun yang berwarna hijau, daun bebas dari hama dan tidak berlubang.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama adalah ekstrak etanol daun ubi kates (*Ipomoea cairica*) yang didapat dengan metode sokhletasi. Variabel utama kedua adalah dosis ekstrak etanol daun ubi kates (*Ipomoea cairica*) yang diberikan pada hewan uji. Variabel utama ketiga adalah metode Potensiasi Narkose, *Head Dip Test* dan *Y-Maze Test* pada hewan uji.

2. Klasifikasi variabel utama

Pengklasifikasian variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu digolongkan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkendali dan variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun ubi kates (*Ipomoea cairica*). Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi fisik dari hewan uji yang meliputi berat badan, lingkungan tempat tinggal (laboratorium), jenis kelamin, dan galur. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah parameter-parameter yang diamati uji efek sedatif ekstrak etanol daun ubi kates (*Ipomoea cairica*) pada tikus putih jantan.

C. Definisi Operasional

Pertama, daun ubi kates (*Ipomoea cairica*) adalah daun yang diambil di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Pada bulan Januari tahun 2019. Tumbuhan ubi kates (*Ipomoea cairica*) yang diambil adalah bagian daun. Daun yang diambil daun yang berwarna hijau daun bebas dari hama dan tidak berlubang.

Kedua, serbuk daun ubi kates adalah hasil dari daun ubi kates yang sudah dicuci bersih dengan air mengalir agar kotoran yang menempel dapat hilang, kemudian dipotong kecil-kecil lalu dikeringkan dengan oven suhu 50°C, selanjutnya dihaluskan dengan blender dan diayak dengan pengayak nomor 60 berupa serbuk halus.

Ketiga, ekstrak daun ubi kates adalah hasil ekstraksi serbuk daun ubi kates dengan cara sokhletasi menggunakan pelarut etanol 96% lalu dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator*.

Keempat, sedatif adalah aktivitas yang diperoleh dari suatu zat yang menyebabkan kantuk (mengantuk). Metode yang digunakan yaitu potensiasi narkose, *head dip test*, dan *y-maze test*.

Kelima, metode potensiasi narkose adalah metode pengamatan waktu mulai tidur (onset) dan lama tidur (durasi). Saat tikus mulai tidur hilangnya reflek posisi tubuh, dicatat sebagai waktu mulai tidur (onset) untuk setiap tikus. Semua tikus ditest dengan ditelentangkan diatas bejana sampai saat reflek pemulihan posisi tubuh tikus muncul kembali. Lama tidur tikus adalah sejak terjadinya mulai tidur sampai munculnya kembali reflek pemulihan posisi tubuh normal (durasi).

Keenam, metode *head dip test* adalah metode pengamatan tes masuknya kepala hewan pada papan dengan 16 lubang berjarak sama. Saat tikus masuk kedalam lubang board di area yang terdapat sinar inframerah dianggap menjadi satu dip kepala. Jumlah *head dips* diamati selama 5 menit.

Ketujuh, metode *y-maze test* adalah metode pengamatan uji Y-labirin untuk menilai memori pengenalan spasial. Mengamati tikus masuk kedalam lengan labirin dengan mencatat benar dan salah. Mencatat arah tikus di setiap lengan labirin setiap tikus dicatat secara visual selama pengujian.

Kedelapan, dosis efektif adalah dosis terkecil yang setara dengan kontrol positif.

D. Bahan, Alat, dan Hewan Percobaan

1. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ubi kates (*Ipomoea cairica*) yang diperoleh di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Bahan yang digunakan untuk uji farmakologi dalam penelitian ini adalah Diazepam, Chlorpromazine, tablet Lelap®, dan ekstrak etanol daun ubi kates (*Ipomoea cairica*) dalam tiga variasi dosis dan CMC Na 0,5%.

Bahan kimia untuk identifikasi secara kualitatif adalah pereaksi Dragendroff, pereaksi Mayer, HCl 2N, CH₃COOH, H₂SO₄ pekat, NH₄OH pekat, NH₄OH 1%, asam asetat 10% dalam etanol, methanol, FeCl₃, serbuk Mg.

2. Alat

Alat yang digunakan untuk pembuatan serbuk simplisia yaitu oven, blender, timbangan analitik, ayakan nomor 60. Alat yang digunakan untuk ekstraksi yaitu alat sokhlet, yang terdiri dari labu alas bulat, kondensor, pembakar spiritus, corong, selang, penangkas air dan batu didih.

Peralatan untuk uji farmakologi yaitu jarum dan alat suntik 1 mL, jarum suntik oral untuk tikus, lampu duduk, alat gelas, bejana pengamatan waktu tidur, *stopwatch*, alat landasan berbentuk Y simetris (*Y-maze test*), kotak kayu dengan 16 lubang berjarak sedikit (*Head dip test*). Alat untuk uji kualitatif yaitu tabung reaksi dan pipet tetes.

3. Hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar, berat badan rata-rata 200 gram, umur 2-3 bulan, sehat, yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

E. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahapan pertama penelitian ini adalah dengan melakukan determinasi tanaman daun ubi kates (*Ipomoea cairica*) yang bertujuan untuk menetapkan

kebenaran sampel yang digunakan dalam penelitian merupakan ubi kates yang akan diuji dengan ciri-ciri morfologi secara makroskopis tanaman terhadap pustaka. Identifikasi daun ubi kates dilakukan di Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengambilan simplisia

Daun ubi kates (*Ipomoea cairica*) yang masih segar kemudian dicuci bersih dengan air mengalir kemudian diangin-anginkan selama sehari. Daun diiris tipis-tipis dan dikeringkan dalam oven selama 2 hari dengan suhu 50° C. Daun yang telah kering kemudian diserbukkan (Kemenkes RI 2013).

3. Pembuatan simplisia daun ubi kates (*Ipomoea cairica*)

Daun ubi kates (*Ipomoea cairica*) yang telah dicuci bersih dengan air lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di tempat terbuka dan tidak terkena sinar matahari langsung yang bertujuan untuk menghilangkan kadar air agar daun ubi kates (*Ipomoea cairica*) tidak mudah ditumbuhi jamur dan bakteri, menghilangkan aktivitas enzim yang dapat mengurangi zat aktif, serta agar memudahkan pada proses penggilingan maupun penyimpanan. Bahan yang sudah dikeringkan segera diserbuk dengan mesin penyerbuk kemudian diayak dengan ayakan nomor 60 (Kemenkes RI 2013).

4. Pembuatan serbuk daun ubi kates (*Ipomoea cairica*)

Simplisia dikeringkan lebih lanjut kedalam oven dengan suhu 50°C, dan kemudian dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 60. Tujuan simplisia dibuat bentuk serbuk adalah untuk memperbesar luas permukaan kontak serbuk dengan pelarut pada saat ekstraksi, sehingga senyawa aktif akan terekstrak lebih banyak dan prosesnya lebih cepat (Kemenkes RI 2013).

5. Penetapan susut pengeringan serbuk daun ubi kates

Penetapan susut pengeringan dilakukan pada serbuk daun ubi kates dengan cara menimbang serbuk daun ubi kates sebanyak 2 gram, kemudian dilakukan pengukuran dengan menggunakan alat *Moisture Balance*. Serbuk daun ubi kates hasil pengeringan kemudian ditimbang dan dihitung susut pengeringannya (Kemenkes RI 2013).

6. Pembuatan ekstrak etanol daun ubi kates (*Ipomoea cairica*) dengan metode ekstraksi sokhletasi

Pembuatan ekstrak etanol daun ubi kates (*Ipomoea cairica*) dilakukan dengan cara sebagai berikut: 50 gram serbuk dibungkus dengan kertas saring, diikat kedua ujungnya dengan benang. Sampel dimasukkan dalam alat sokhlet lalu ditambahkan penyari etanol 96% satu setengah sirkulasi, kemudian dipanaskan dengan pembakar spiritus hingga penyarian dapat berlangsung. Proses penyarian dihentikan setelah larutan penyari berwarna jernih, ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator* 40°C hingga diperoleh ekstrak kental, hasil pemekatan dibuat beberapa dosis berdasarkan perhitungan dosisnya (Depkes RI 1986). Hasil pemekatan digunakan untuk uji sedatif.

7. Penetapan kadar air pada ekstrak daun ubi kates

Penetapan kadar air ekstrak etanol 96% daun ubi kates (*Ipomoea cairica*) dilakukan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Metode ini dilakukan dengan cara menimbang sejumlah bahan yang diperkirakan mengandung 1 sampai 4 mL air dimasukkan dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut toluene jenuh air 200 mL sampai ekstrak terendam kemudian memasang alat *Sterling-Bidwell*. Labu dipanaskan dengan api kecil secara hati-hati setelah mendidih api dibesarkan. Pemanasan dihentikan jika pada tetesan sudah tidak ada air yang menetes. Kemudian diukur kadar airnya dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell* dengan melihat volume pada skala alat tersebut. Skema penetapan kadar air dapat dilihat pada Gambar 4. Kadar air dihitung dalam % v/b (Kemenkes RI 2013).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume terbaca}}{\text{Berat bahan}} \times 100\%$$

8. Pengujian kandungan senyawa kimia ekstrak ubi kates (*Ipomoea cairica*)

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat dalam ubi kates. Identifikasi senyawa flavanoid, alkaloid, tanin dan saponin dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

8.1. Identifikasi flavanoid. Sebanyak 1 hingga 2 mL ekstrak dilarutkan dalam methanol panas dan ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 5 tetes HCl pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuk warna jingga.

8.2. Identifikasi alkaloid. Tes Mayer. 1 hingga 2 mL ekstrak diambil dalam tabung reaksi. 0,2 mL HCl dan 0,1 mL reagen Mayer ditambahkan. Pembentukan presipitat berwarna kekuningan memberikan tes positif untuk alkaloid. **Tes Dragendroff:** 0,2 mL HCl dan 0,1 mL reagen Dragendroff ditambahkan dalam 2 mL larutan ekstrak dalam tabung reaksi. Pengembangan endapan berwarna coklat jingga menunjukkan adanya alkaloid (Ralte 2014).

8.3. Identifikasi tanin. Larutkan sebanyak 1 hingga 2 mL ekstrak kedalam 10 mL aquadest, saring dan filtrate ditambah 3 tetes FeCl_3 1%. Identifikasi tanin menunjukkan hasil positif dengan terbentuk warna hijau kehitaman (tanin katekol) atau biru kehitaman (tanin galat).

8.4. Identifikasi saponin. Identifikasi saponin dilakukan dengan 1 hingga 2 mL ekstrak dilakukan air panas dalam tabung reaksi kemudian dikocok kuat-kuat selama \pm 10 detik. Identifikasi saponin menunjukkan hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang stabil (Ralte 2014).

9. Perhitungan dosis ekstrak etanol 96% daun ubi kates (*Ipomoea cairica*)

Faktor konversi dari manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018. Dosis empiris daun ubi kates (*Ipomoea cairica*) untuk manusia secara oral sekali pakai belum diketahui. Variasi dosis ekstrak yang digunakan dalam penelitian yaitu 100 mg /kgBB, 200 mg /kgBB, 400 mg /kgBB.

Larutan ekstrak 5 g/100 mL. Larutan ekstrak dibuat dengan melarutkan 5 g ekstrak daun ubi kates yang telah disuspensikan ke dalam suspensi Na CMC 0,5% sampai volume 100 mL untuk variasi dosis 100 mg /kgBB, 200 mg /kgBB, dan 400 mg /kgBB. Setiap 1 mL larutan ekstrak konsentrasi 5% mengandung 50 mg ekstrak.

Volume yang diberikan untuk ekstrak dengan variasi dosis 100 mg /kgBB yaitu 20 mg / 50 mg/mL maka sediaan uji diberikan peroral dengan volume 0,4 mL/200g BB tikus kepada tikus kelompok uji pertama.

Volume yang diberikan untuk ekstrak dengan variasi dosis 200 mg /kgBB yaitu 40 mg / 50 mg/mL maka sediaan uji diberikan peroral dengan volume 0,8 mL/200g BB tikus kepada tikus kelompok uji kedua.

Volume yang diberikan untuk ekstrak dengan variasi dosis 400 mg /kgBB yaitu 80 mg / 50 mg/mL maka sediaan uji diberikan peroral dengan volume 1,6 mL/200g BB tikus kepada tikus kelompok uji ketiga.

10. Penetapan dosis, pembuatan larutan dan penetapan volume pemberian chlorpromazine 0,3%

Dosis chlorpromazine ditentukan berdasarkan faktor konversi dosis manusia. Dosis oral chlorpromazine untuk orang dewasa adalah 75 mg sekali (BPOM 2015). Pemberian dosis didasarkan pada berat badan orang dewasa rata-rata 70 kg. Faktor konversi dari manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018 maka dosis untuk tikus sebesar 1,35 mg/200g BB atau 6,75 mg /kgBB. Larutan stok chlorpromazine dibuat dengan konsentrasi 0,3% yang artinya 300 mg chlorpromazine dalam 100 mL sediaan.

Dosis chlorpromazine 1,35 mg/200g BB atau 6,75 mg /kgBB, dalam 1 mL stok terdapat 3 mg chlorpromazine, maka volume pemberian chlorpromazine yang diberikan untuk tikus 200 gram yaitu $1,35 \text{ mg} / 3 \text{ mg/mL} = 0,45 \text{ mL}$.

11. Penetapan dosis, pembuatan larutan dan penetapan volume pemberian diazepam 0,02%

Dosis diazepam ditentukan berdasarkan faktor konversi dosis manusia. Dosis oral diazepam untuk orang dewasa adalah 5 mg sekali pakai (BPOM 2015). Pemberian dosis didasarkan pada berat badan orang dewasa rata-rata 70 kg. Faktor konversi dari manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018 maka dosis untuk tikus sebesar 0,09 mg/200g BB atau 0,45 mg /kgBB. Larutan stok diazepam dibuat dengan konsentrasi 0,02% yang artinya 20 mg diazepam dalam 100 mL sediaan.

Dosis diazepam 0,09 mg/200g BB, dalam 1 mL stok terdapat 0,2 mg diazepam, maka volume pemberian diazepam yang diberikan untuk tikus 200 gram yaitu $0,09 \text{ mg} / 0,2 \text{ mg/mL} = 0,45 \text{ mL}$.

12. Penetapan dosis, pembuatan larutan dan penetapan volume pemberian Lelap® 1%

Dosis oral Lelap® untuk orang dewasa adalah 1-2 kaplet sehari (500 mg tiap kaplet). Pemberian dosis didasarkan pada berat badan orang dewasa rata-rata

70 kg. Faktor konversi dari manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018 maka dosis untuk tikus sebesar 9 mg/200g BB atau 45 mg /kgBB tikus. Larutan stok Lelap® dibuat dengan konsentrasi 1% yang artinya 1000 mg Lelap® dalam 100 mL sediaan.

Dosis Lelap® 9 mg/200g BB dalam 1 mL stok terdapat 10 mg Lelap®, maka volume pemberian Lelap® yang diberikan untuk tikus 200 gram yaitu $9 \text{ mg} / 10 \text{ mg/mL} = 0,9 \text{ mL}$.

13. Penetapan dosis Phenobarbital

Stok Phenobarbital dari sediaan ampul yaitu 200 mg / 2 mL. Pemberian larutan Phenobarbital dilakukan secara intra peritoneal.

Faktor konversi dari manusia berat badan 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018. Dosis Phenobarbital Na adalah 100 mg, dosis untuk tikus $100 \text{ mg} \times 0,018 = 1,8 \text{ mg}/200\text{g}$ BB tikus. Larutan stok yaitu $200 \text{ mg} / 2 \text{ mL} = 100 \text{ mg/mL}$. Volume pemberian Phenobarbital adalah $1,8 \text{ mg} / 100 \text{ mg/mL} = 0,018 \text{ mL} = 0,02 \text{ mL}/200\text{g}$ BB.

14. Uji efek sedatif

Prosedur pengujian efek sedatif ekstrak etanol 96% daun ubi kates (*Ipomoea cairica*) terhadap tikus putih jantan galur Wistar yaitu:

Pertama, semua tikus dikelompokkan secara acak sesuai dengan kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Semua tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 16 jam sebelum diberi perlakuan, perlakuan yang diberikan yaitu:

- Kelompok 1 : Kontrol negatif (tikus diberikan CMC Na 0,5%)
- Kelompok 2 : Kontrol positif kimia (tikus diberikan Chlorpromazine 6,75 mg /kgBB atau Diazepam 0,45 mg /kgBB)
- Kelompok 3 : Kontrol positif herbal (tikus diberikan Lelap® 45 mg /kgBB)
- Kelompok 4 : Tikus diberikan ekstrak etanol daun ubi kates dengan dosis 100 mg /kgBB.
- Kelompok 5 : Tikus diberikan ekstrak etanol daun ubi kates dengan dosis 200 mg /kgBB
- Kelompok 6 : Tikus diberikan ekstrak etanol daun ubi kates dengan dosis 400 mg /kgBB.

14.1. Metode potensiasi narkose. Kedua, setelah pemberian ekstrak (100, 200 dan 400 mg /kgBB), kontrol negatif, Lelap® 45 mg /kgBB dan Chlorpromazine (6,75 mg /kgBB) secara per oral setelah 45 menit dari perlakuan pertama, diberi Phenobarbital secara intra peritoneal dengan dosis 1,8 mg/200g BB tikus dengan volume pemberian 0,02 mL/200g BB amati saat tikus mulai tidur yaitu hilangnya reflek posisi tubuh yang dicatat sebagai waktu mulai tidur (onset) untuk setiap tikus. Amati saat reflek pemulihan posisi tubuh tikus muncul kembali seperti normal (durasi). Skema uji dapat dilihat pada Gambar 5.

14.2. Metode *head dip test*. Ketiga, enam kelompok tikus ditempatkan pada kotak kayu dengan 16 lubang board, 30 menit setelah menerima ekstrak (100, 200 dan 400 mg /kgBB P.O), kontrol negatif, Lelap® 45 mg /kgBB dan Diazepam (0,45mg /kgBB). Berapa kali hewan uji memasukan kepala ke lubang board. Pengamatan selama 5 menit. Skema uji dapat dilihat pada Gambar 6.

14.3. Metode *y-maze test*. Keempat, pada menit ke 30, 60, 90 dan 120 setelah pemberian kontrol negatif, Lelap® 45 mg /kgBB ekstrak (100, 200 dan 400 mg /kgBB) dan diazepam (0,45 mg /kgBB). Tikus ditempatkan secara individual di dalam landasan berbentuk Y simetris selama 3 menit dan amati arah tikus masuk di lengan dari labirin. Apabila tikus masuk kedalam lengan yang berbeda (benar), apabila tikus masuk kedalam lengan yang sama (salah). Untuk mengetahui presentase benar dihitung jumlah tikus masuk ke lengan yang berbeda (benar), setelah itu dilakukan perbandingan antara jumlah tikus masuk ke lengan yang berbeda (benar) dan jumlah tikus masuk ke lengan yang sama (salah) sehingga dapat ditentukan presentase benar pada kemampuan berfikir. Skema uji dapat dilihat pada Gambar 7.

$$\text{Persentase benar} = \frac{\text{Jumlah benar}}{\text{Jumlah benar dan salah}} \times 100\%$$

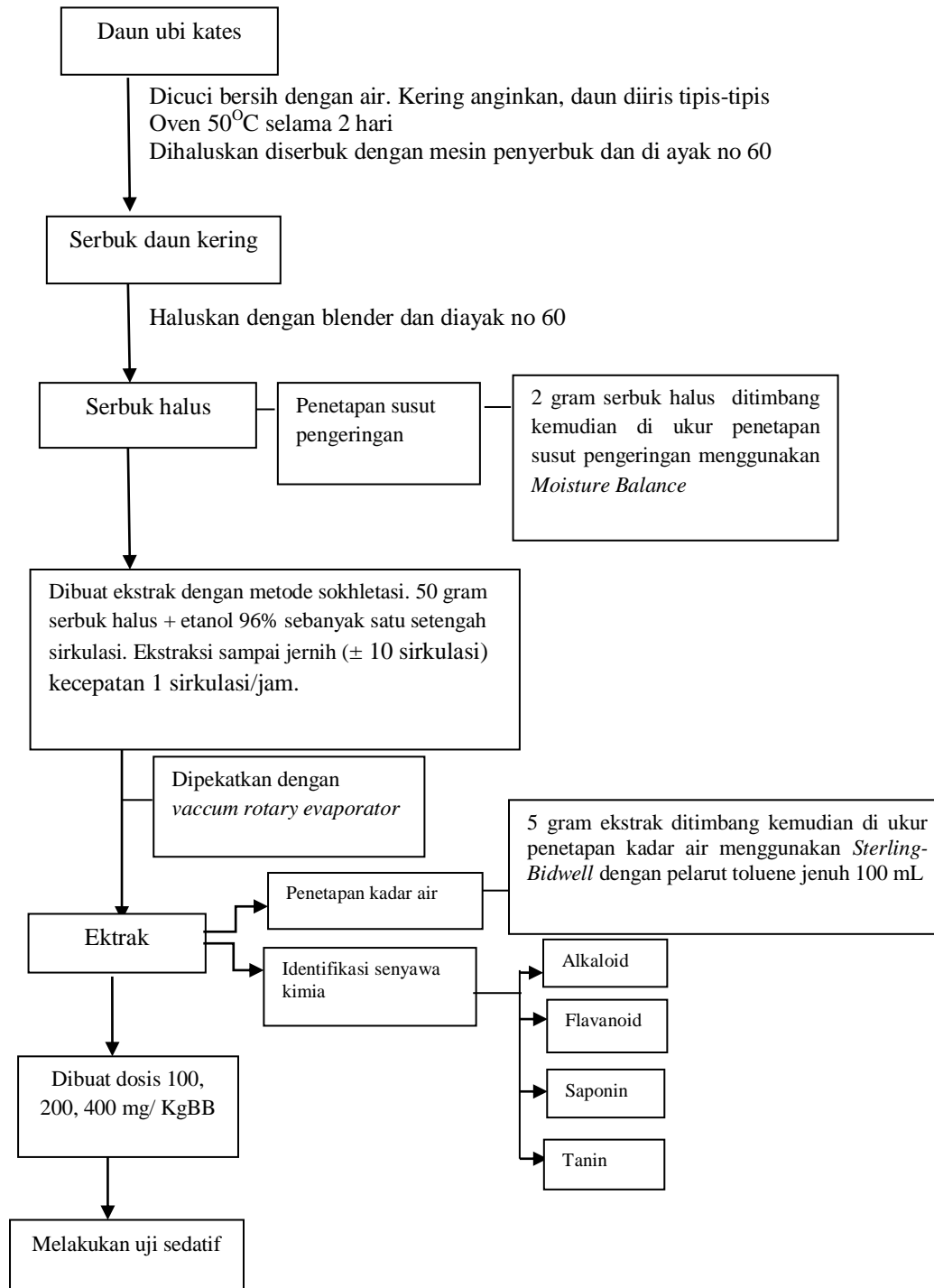
Kelima, mengevaluasi data yang diperoleh secara statistik.

F. Analisis Data

Data hasil pengujian aktivitas sedatif ekstrak etanol daun ubi kates (*Ipomoea cairica*) dengan variasi dosis ekstrak etanol dosis 100, 200, dan 400 mg/kgBB dianalisis secara statistik menggunakan metode *Shapiro-Wilk*. Hasil yang diperoleh jika terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan metode *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan yang nyata diantara perlakuan. Jika hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan hasil normal ($p > 0,05$), selanjutnya dilakukan uji *Post Hoc* untuk mengetahui perbedaan bermakna diantara tiap-tiap kelompok perlakuan dengan uji Tukey untuk mengetahui konsentrasi mana yang memiliki pengaruh sama atau berbeda antara satu dengan yang lainnya.

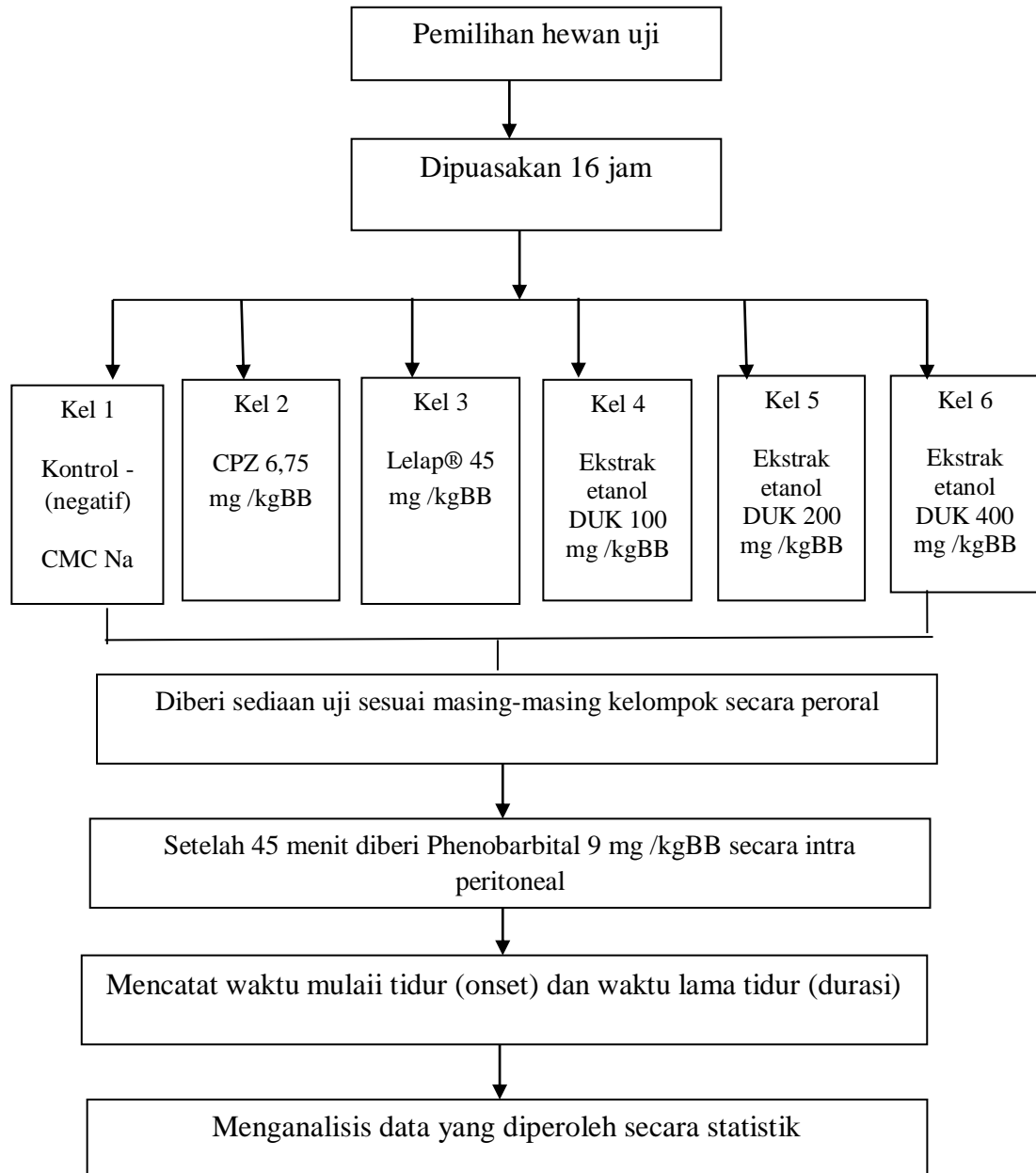
G. Alur Penelitian

1. Pembuatan ekstrak



Gambar 5. Skema pembuatan ekstrak

2. Metode potensiasi narkose



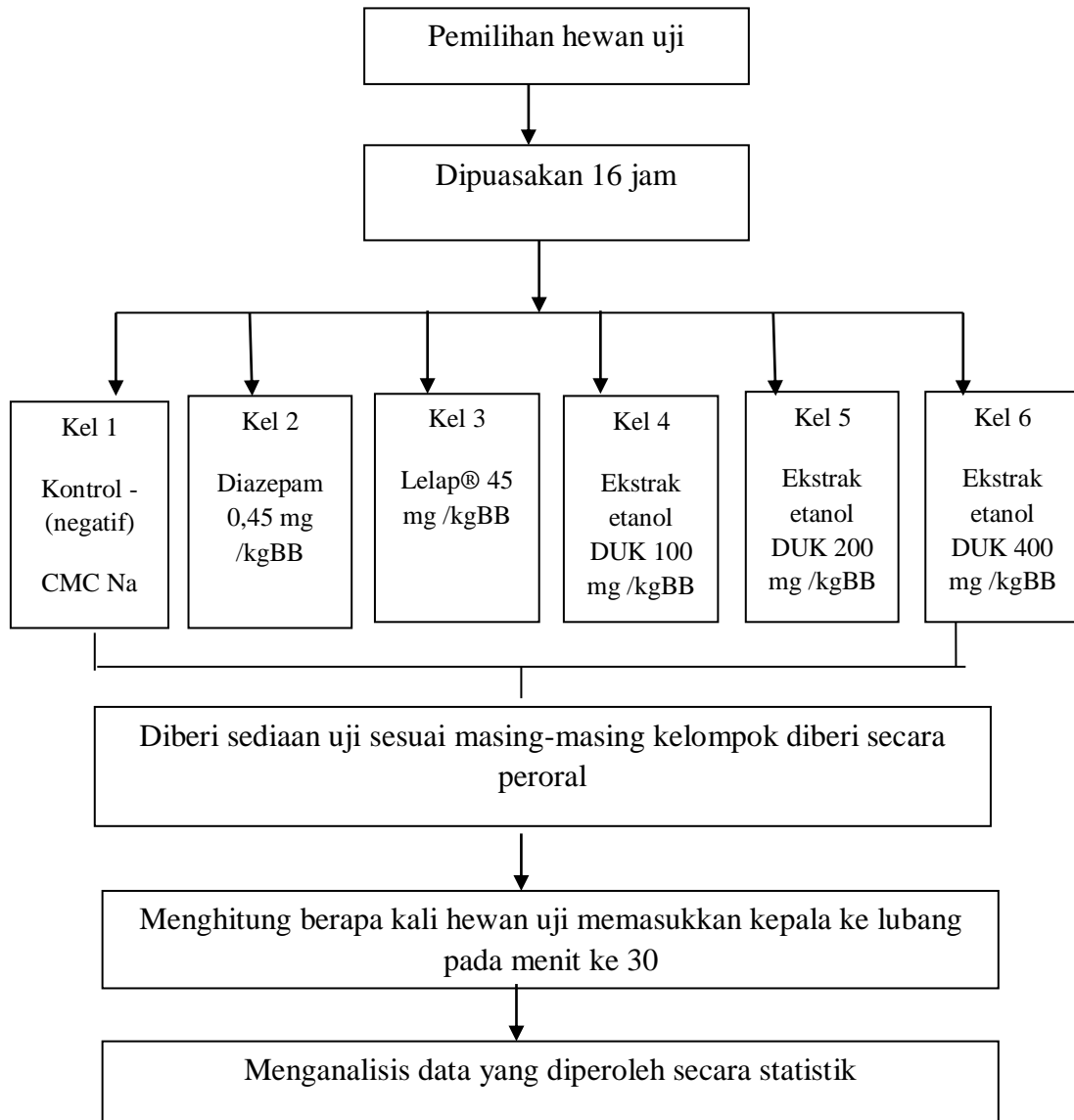
Gambar 6. Skema uji efek sedatif pada tikus dengan metode Potensiasi Narkose

Keterangan:

CPZ: Chlorpromazine

DUK: Daun Ubi Kates

3. Metode *head dip test*

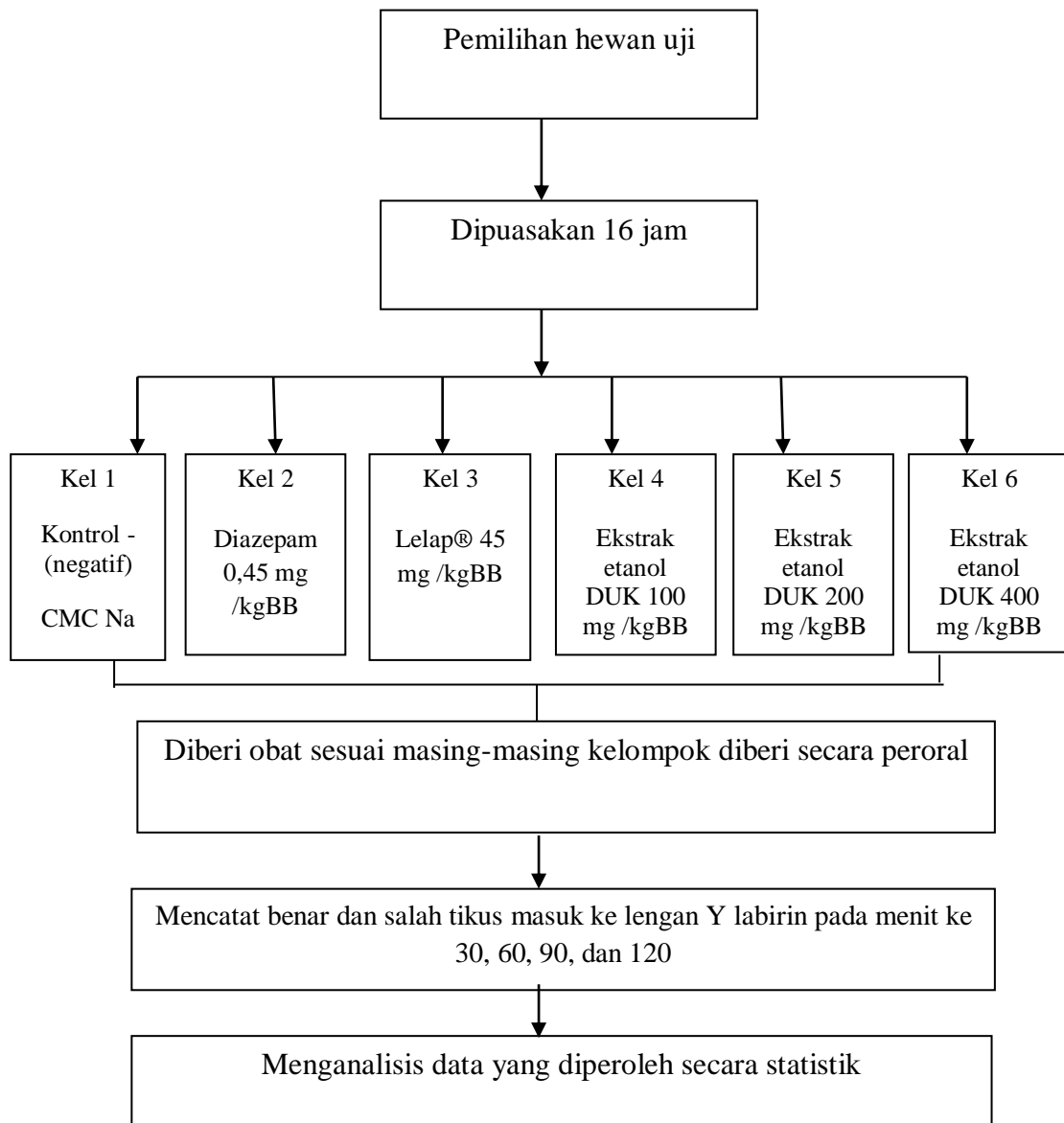


Gambar 7. Skema uji efek sedatif pada tikus dengan metode *Head Dip Test*

Keterangan:

DUK: Daun Ubi Kates

4. Metode y-maze test



Gambar 8. Skema uji efek sedatif pada tikus dengan metode Y-Maze Test

Keterangan:

DUK: Daun Ubi Kates