

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak (*Annona muricata* L) yang diperoleh dari daerah Solo, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak (*Annona muricata* L) tua yang hijau dan segar yang diperoleh dari daerah Solo, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama adalah ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L), variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah perasan daun sirsak, variabel utama ketiga adalah ekstrak kering metode *freeze dry*, variabel utama keempat adalah dosis ekstrak, variabel utama kelima adalah mencit putih, variabel utama keenam adalah aktivitas daya ingat, variabel utama ketujuh adalah aktivitas peningkatan daya ingat, variabel utama kedelapan adalah waktu latensi, dan variabel utama kesembilan adalah angka kesalahan.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang diidentifikasi dapat diklasifikasikan menjadi berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel kendali, dan variabel tergantung. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung berkaitan dengan perubahan-perubahan. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah variasi dosis ekstrak kering perasan daun sirsak.

Variabel terkendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi fisik dari hewan uji yang meliputi jenis kelamin, umur dan berat badan, kondisi lingkungan badan, kondisi laboratorium dan kondisi peneliti.

Variabel tergantung adalah titik pusat dari persoalan yang merupakan pilihan dalam penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah peningkatan daya ingat mencit putih dan waktu uji *Radial Arm Maze*.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun sirsak (*Annona muricata* L) adalah tanaman yang mempunyai senyawa aktif flavonol dan flavon sebagai antioksidan, diambil bagian tua yang diperoleh dari daerah Solo, Jawa Tengah.

Kedua, perasan daun sirsak (*Annona muricata* L) adalah sari perasan dari daun sirsak segar 500 gram dilarutkan dengan aquadest sebanyak 150 ml diblender, diperas dan disaring menggunakan kain untuk memisahkan ampas dan sarinya hingga diperoleh sari perasan daun sirsak.

Ketiga, ekstrak kering metode perasan adalah ekstrak kering daun kering daun sirsak yang dibuat dari perasan daun segar sirsak yang dikeringkan dengan metode *freeze dry*.

Keempat, dosis ekstrak kering adalah dosis ekstrak perasan daun sirsak sebesar 200 ; 400 ; 800 mg/Kg BB mencit.

Kelima, mencit putih adalah hewan uji dalam penelitian ini yang berumur 6-8 minggu dengan berat badan ± 20 gram.

Keenam, daya ingat adalah daya ingat spasial dimana merupakan kemampuan mengingat ruang bidang, mengetahui jarak, dan mengetahui arah atau posisi.

Ketujuh, aktivitas peningkatan daya ingat adalah efek dari ekstrak daun sirsak dengan melihat lebih cepat untuk mencapai lengan yang berisi umpan setelah dibandingkan dengan ginkgo biloba (kontrol positif) dengan melihat angka kesalahan dan waktu latensi yang diuji dengan metode *Radial Arm Maze*.

Kedelapan, angka kesalahan adalah jumlah mencit memasuki lengan lebih dari separuh panjang lengan tetapi tidak memakan umpan yang disediakan (a) dibagi dengan jumlah lengan yang dimasuki (b) dikalikan dengan 100%.

Kesembilan, waktu latensi adalah waktu yang dibutuhkan mencit untuk mencapai lengan berisi umpan dan memakannya yang dimulai dari bagian tengah alat *Radial Arm Maze*.

Kesepuluh, dosis efektif adalah dosis terkecil yang memberikan efek dimana berbeda bermakna terhadap kontrol negatif dan sebanding terhadap kontrol positif.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: alat timbang, blender, *moisture balace*, tabung reaksi, gelas ukur, kain flanel, kandang mencit, tempat makan dan minum.

Alat lain yang digunakan dalam penelitian ini adalah labu gelas ukur dengan ukuran 100 ml, spuit insulin skala 0,1 ml, dan alat uji daya ingat menggunakan metode *Radial Arm Maze* berupa alat yang terdiri dari delapan lengan berukuran 48 × 12 (cm) yang memiliki sudut yang sama tiap lengannya. Empat lengan labirin diberi umpan pelet dan empat lainnya tidak diberi pelet.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan adalah daun sirsak (*Annona muricata* L) bagian tua yang diperoleh dari daerah Solo, Jawa Tengah yang telah dinyatakan bebas dari hama, ginkgo biloba, dan aquadest.

3. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih (*Mus musculus*) yang berumur 6-8 minggu. Pengelompokan dilakukan secara acak terdiri dari 25 ekor mencit, kelompok I kontrol negatif, kelompok II kontrol positif, kelompok III ekstrak kering dosis 200 mg/kg BB, kelompok IV ekstrak kering dosis 400 mg/kg BB, kelompok V ekstrak kering dosis 800 mg/kg BB.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman daun sirsak

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi daun. Determinasi daun sirsak ini dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran sampel yang digunakan untuk penelitian yang berkaitan dengan ciri-ciri mikroskopis dan makroskopis dari tanaman tersebut dan mencocokkan ciri-ciri morfologis yang ada pada daun sirsak terhadap pustaka yang dibuktikan di Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengambilan bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak (*Annona muricata* L) diambil bagian daun yang tua dan masih segar, yang diperoleh dari daerah Solo, Jawa Tengah.

3. Pembuatan ekstrak kering perasan daun sirsak

Daun sirsak yang masih segar diblender sebanyak 500 gram dengan ditambah aquadest 100 ml, setelah halus dipindahkan ke dalam kain flanel untuk diambil perasannya, kemudian ditambah aquadest lagi untuk membilas sari yang masih ada pada ampas hingga mencapai volume 150 ml (Permatasari 2013).

Ekstrak kering dibuat dengan menggunakan metode *freeze dry*. Ada dua tahapan dalam proses pengeringan beku vakum yaitu tahap pembekuan dan tahap pengeringan (sublimasi). Perasan daun sirsak sebanyak 150 ml dimasukkan dalam alat *freeze dry*, kemudian sari perasan akan dirubah menjadi serbuk melalui proses pembekuan dan pengeringan dengan adanya pemanfaatan panas buang dari kondensor.

4. Penetapan kelembaban sediaan ekstrak kering perasan daun sirsak

Penetapan kelembaban sediaan ekstrak kering perasan daun sirsak dilakukan menggunakan alat *moisture balance*. Sebanyak 2 gram ekstrak dimasukkan ke dalam wadah pada alat *moisture balance*. Alat dijalankan dan ditunggu sampai berat konstan atau alat menunjukkan kadar kelembaban dalam satuan persen.

5. Identifikasi kualitatif ekstrak daun sirsak

5.1 Pemeriksaan organoleptis. Identifikasi ekstrak secara organoleptis bentuk, warna, bau, dan rasa dari ekstrak kering daun sirsak.

5.2 Identifikasi alkaloid. Ekstrak diencerkan dengan air kemudian ditambahkan 1 ml HCl 2N, setelah itu dipanaskan selama 2 menit di atas penangas air kemudian didinginkan, dan disaring. Filtrat tersebut dipipet dan dimasukkan dalam 2 tabung reaksi, masing-masing sebanyak 3 tetes. Tabung pertama ditambahkan dengan pereaksi Mayer dan tabung kedua ditambah dengan pereaksi Bouchardat, jika dengan pereaksi Mayer terbentuk endapan menggumpal berwarna putih, dan dengan pereaksi Bouchardat terbentuk endapan berwarna coklat yang menandakan adanya alkaloid (Adeanne *et al.* 2012).

5.3 Identifikasi saponin. Ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah 10 ml air kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik secara vertikal, kemudian dibiarkan selama 10 menit. Terbentuknya busa yang stabil dalam tabung reaksi menunjukkan adanya senyawa golongan saponin, bila ditambahkan 1 tetes HCl 2N busa tetap stabil (Djamil & Anelia 2009).

5.4 Identifikasi tanin. Sebanyak 2 gram ekstrak ditambahkan 100 ml, kemudian dipanaskan hingga mendidih selama 15 menit, didinginkan, dan disaring dengan kertas saring. Filtrat dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan feri (III) klorida. Hasil positif tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru kehitaman atau hijau kehitaman (Djamil & Anelia 2009).

5.5 Identifikasi kumarin. Ekstrak dimasukkan dalam beaker glass dan ditambahkan air panas, kemudian didinginkan. Larutan yang telah dingin dibagi ke dalam 2 tabung. Tabung pertama diberi ammonia 10% dan tabung kedua sebagai pembanding, setelah itu dilihat di bawah lampu UV, jika terdapat fluoresensi kuning kehijauan atau kebiruan berarti positif mengandung kumarin (Isnawati *et al.* 2008).

5.6 Identifikasi flavonoid. Sebanyak 2 g ekstrak ditambahkan 100 ml air panas, dididihkan selama 5 menit, dan disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh diambil 5 ml kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan serbuk magnesium secukupnya, ditambah 1 ml HCl pekat, dan 5 ml amil alkohol.

Campuran tersebut dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Hail positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Djamil & Anelia 2009). Jingga sampai merah menunjukkan flavon, merah sampai merah tua untuk flavonol, dan merah tua sampai magenta untuk flavanon (Rahayu *et al.* 2015, Muthmainnah 2017).

6. Penentuan dosis

6.1 Pb asetat. Pb asetat memiliki kelarutan 20% dalam aquadest, dan dosis Pb asetat 100 mg/kg BB tikus. Volume pemberian dengan larutan stok 0,2% dari larutan induk, sehingga pembuatan larutan stock dengan memipet 1 ml larutan induk kemudian dimasukkan dalam labu takar 100 ml dan ditambah aquadest sampai tanda batas 100 ml. Volume pemberian pada mencit dilakukan secara intra peritoneal dan perhitungan volume pemberian dapat dilihat pada lampiran 5.

6.2 Dosis ginkgo biloba. Dosis 1 kapsul ginkgo biloba berisi 500 mg mengandung ekstrak ginkgo biloba 75 mg/70 kg BB manusia. Dosis untuk manusia 75 mg/70 kg BB manusia dikonversikan ke mencit $75 \text{ mg} \times 0,0026$ maka diperoleh dosis ginkgo biloba 0,195 mg/20 g BB mencit. Volume pemberian ginkgo biloba dilakukan secara peroral dan perhitungan volume pemberian dapat dilihat pada lampiran 6.

6.3 Dosis ekstrak kering perasan daun sirsak. Penentuan penggunaan dosis mengacu pada jurnal Yunianto (2014) yang mengatakan bahwa dosis ekstrak daun sirsak sebesar 400 mg/kg BB mencit menunjukkan aktivitas sebagai antioksidan pada sistem respirasi mencit terpapar asap anti nyabuk bakar. Dosis ekstrak kering perasan daun sirsak pada penelitian ini yaitu 200, 400, dan 800 mg/kg BB mencit. Volume pemberian ekstrak kering dilakukan secara peroral dan perhitungan volume pemberian dapat dilihat pada lampiran 3,4, dan 5.

7. Pengelompokan hewan uji

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit. Mencit mudah ditangani karena cara penanganan jauh lebih mudah dan ekonomis, sebelum dilakukan percobaan mencit terlebih dahulu diadaptasi 3 hari kemudian ditimbang berat badannya. Penelitian ini digunakan mencit sebanyak 25 ekor

dengan 5 kelompok uji, dengan masing-masing kelompok uji terdiri dari 5 ekor mencit, yaitu sebagai berikut :

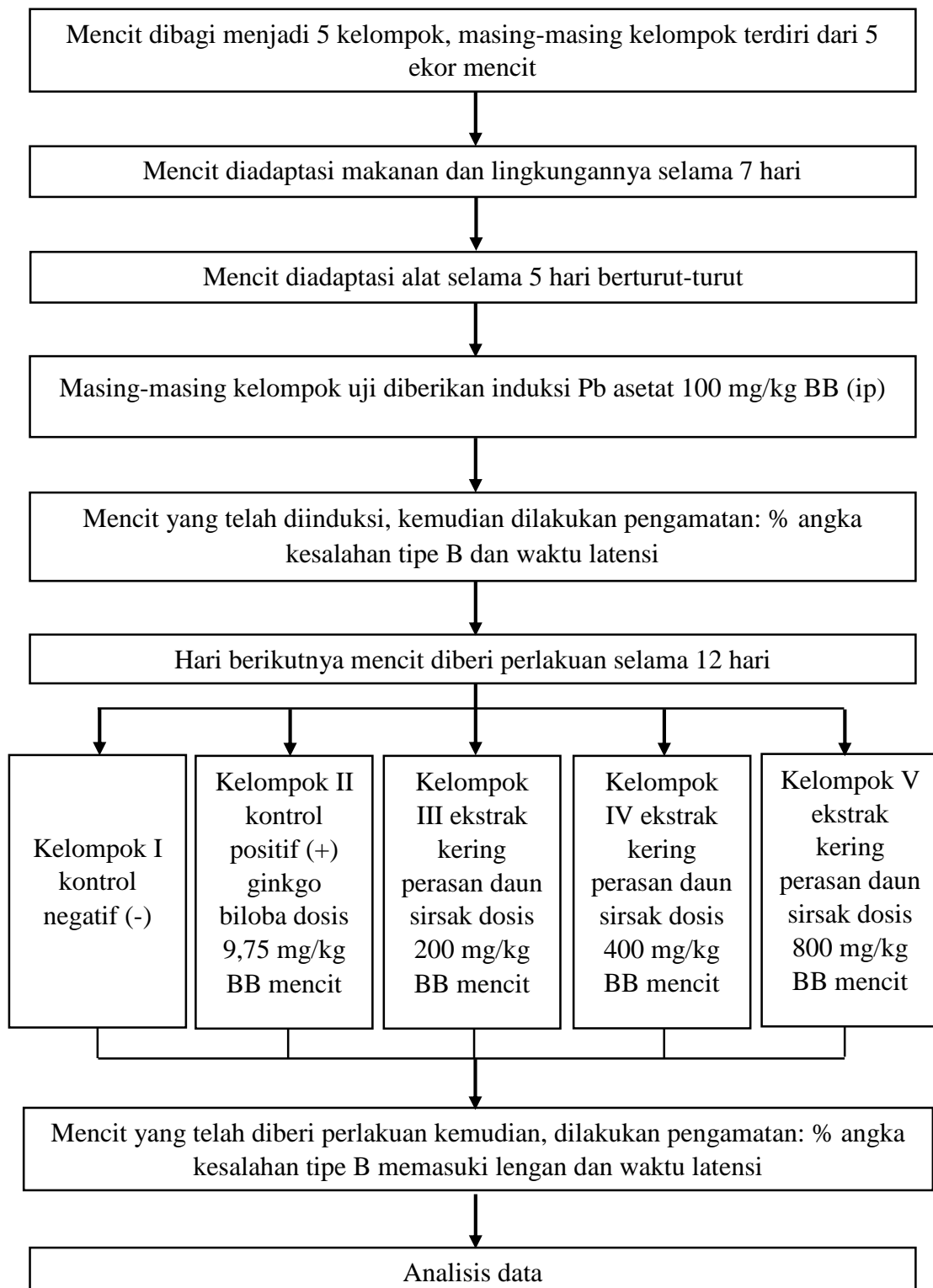
Tabel 1. Kelompok perlakuan hewan uji

Kelompok	Perlakuan
Kelompok I	Sebagai kontrol negatif, perlakuan dengan aqua destilata
Kelompok II	Sebagai kontrol positif ginkgo biloba 9,75 mg/kg BB mencit
Kelompok III	Pemberian ekstrak kering perasan daun sirsak dosis 200 mg/kg BB mencit
Kelompok IV	Pemberian ekstrak kering perasan daun sirsak dosis 400 mg/kg BB mencit
Kelompok V	Pemberian ekstrak kering perasan daun sirsak dosis 800 mg/kg BB mencit

8. Prosedur pengujian daya ingat

Prosedur uji daya ingat menggunakan hewan coba mencit, karena itu perlu dilakukan pengonversian dosis dari manusia ke mencit. Volume larutan stock yang diberikan sesuai dengan berat badan masing-masing mencit.

Mencit dilakukan adaptasi selama 5 hari berturut-turut, setiap harinya mencit dipuaskan 12 jam dahulu sebelum dilatih dalam *Maze*. Hari ke-1 sampai hari ke-3 mencit dimasukkan ke dalam *maze* dan umpan diletakkan di semua lengan dan diletakkan di ujung lengan *maze*. Hari ke-4 dan ke-5 mencit dimasukkan ke dalam *maze* dengan 4 lengan berisi umpan dan 4 lengan tidak berisi umpan. Proses adaptasi selesai dan di hari berikutnya dilakukan penginduksian Pb asetat selama sehari dan dilakukan pengujian dalam lengan *maze* dengan 4 lengan berisi umpan dan 4 lengan tidak berisi umpan. Hari berikutnya setelah mencit diinduksi, kemudian mencit diberi perlakuan selama 12 hari berturut-turut dan dilakukan uji kinerja *maze* dengan umpan diletakkan pada 4 lengan, sebelum dilakukan pengujian mencit dipuaskan selama 12 jam. Perlakuan diakhiri setelah hewan uji memakan semua umpan di seluruh lengan *maze* yang berisi umpan atau selama 10 menit. Parameter yang diamati adalah angka kesalahan tipe B dan waktu latensi, dimana kesalahan dihitung saat mencit memasuki lengan *maze* lebih dari separuh panjang lengan *maze* tetapi tidak memakan umpan yang ada di ujung lengan *maze*.



Gambar 6. Skema uji daya ingat

E. Analisis Hasil

Data yang diperoleh dari metode ini berupa angka kesalahan tipe B dan waktu latensi. Data yang diperoleh ini diuji menggunakan uji *One-Sample Kolmogorov-smirnov* untuk mengetahui bahwa data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak dan *Levene test* untuk mengetahui apakah varian populasi data tersebut sama atau berbeda, jika kedua uji memenuhi persyaratan ($p > 0,05$) maka dilanjutkan analisis parametrik dengan *analysis of varian* (ANOVA) satu jalan tarif kepercayaan 95% dengan *post-hoc Tukey test* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan atau tidak signifikan. Hasil kedua uji jika tidak memenuhi persyaratan ($p < 0,05$) maka dilanjutkan analisis non-parametrik dengan uji *Kruskall-Wallis* atau *Mann Whitney*.