

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yaitu semua objek atau bagian yang menjadi sasaran dari penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dan batang adas (*Foeniculum vulgare* Mill) yang diperoleh dari petani budidaya tanaman adas di daerah Selo Boyolali Jawa tengah pada bulan Januari 2019.

Sampel adalah bagian dari populasi yang digunakan untuk melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dan batang adas (*Foeniculum vulgare* Mill) yang diambil dari populasi dilakukan secara acak. Daun dan batang adas yang diambil dalam keadaan hijau, segar, bersih, bebas dari hama dan penyakit, umur tidak terlalu tua ataupun tidak terlalu muda.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak daun dan batang adas dalam meningkatkan kadar protein air susu tikus menyusui.

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah kualitas air susu dari tikus yang menyusui dengan menggunakan parameter peningkatan kadar protein air susu.

Variabel utama yang ketiga dalam penelitian ini adalah tikus putih betina galur wistar yang sedang menyusui.

Variabel utama yang keempat dalam penelitian ini adalah kondisi peneliti, laboratorium, tanaman, tikus, bahan dan alat yang digunakan.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama memuat pengelompokan variabel – variabel yang diteliti secara langsung. Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dikelompokkan menjadi variabel bebas, variabel terkendali, variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah – ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam

penelitian ini adalah ekstrak etanol daun dan batang adas dengan variasi dosis yang berbeda.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi peneliti, kondisi laboratorium, dan kondisi hewan meliputi umur, berat badan dan galur.

Variabel tergantung adalah pusat permasalahan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah peningkatan kadar protein air susu tikus menyusuidengan pemberian ekstrak etanol daun dan batang adas.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, tanaman adas (*Foeniculum vulgare* Mill) adalah tanaman segar yang diambil dari petani di daerah Lereng Gunung Merapi, Selo Boyolali Jawa Tengah.

Kedua, simplisia tanaman adas diperoleh dari proses pengeringan daun dan batang adas yang segar. Dan serbuk daun dan batang adas diperoleh dari simplisia kering yang telah diserbukkan dan diayak dengan pengayak nomor 60.

Ketiga, ekstrak daun dan batang adas adalah ekstrak kental yang diperoleh dari maserasi tanaman adas dengan pelarut etanol 96% dan dilakukan pemekatan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50° C.

Keempat, dosis ekstrak daun dan batang adas yaitu dosis 315 mg/kg bb, 630 mg/kg bb, 945 mg/kg bb.

Kelima, pengukuran kadar protein air susu tikus dengan menggunakan metode Biuret.

Keenam, dosis efektif ekstrak etanol dalam meningkatkan kadar protein air susu adalah dosis yang sebanding dengan kontrol positif (Asifit) dan lebih besar dari kontrol negatif (CMC Na 0,5%).

C. Bahan, Alat, dan Hewan Uji

1. Bahan

1.1. Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dan batang adas (*Foeniculum vulgare* Mill) yang diperoleh dari daerah Lereng Gunung Merapi, Selo, Boyolali, Jawa Tengah.

1.2. Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah bahan kimia untuk pembuatan ekstrak yaitu etanol 96%. Bahan kimia yang digunakan untuk uji kandungan ekstrak daun dan batang adas adalah Asam klorida, KOH, Fenilklorida 1%, HCL, serbuk Magnesium, reagen Liberman Burchard, dan etanol. Bahan kimia untuk uji farmakologi yaitu Asifit, untuk uji penetapan kadar protein dengan metode Biuret yaitu Bovine Serum Albumin (BSA), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, potasium tartrat, NaOH.

2. Alat

Alat untuk pembuatan simplisia seperti pisau, oven dengan suhu yang konstan, mesin penggiling, blender, ayakan nomor 60. Alat untuk penyarian yaitu botol coklat, corong kaca, gelas beker, batang pengaduk, kertas saring, labu takar, rotary evaporator, erlemeyer, dan timbangan digital.

Alat yang digunakan untuk membuat larutan stock ekstrak etanol daun dan batang adas adalah gelas ukur, gelas beker, batang pengaduk, botol, labu takar, timbangan elektrik. Alat yang digunakan untuk perlakuan hewan seperti spuit oral, timbangan, kandang tikus. Alat yang digunakan untuk penetapan kadar protein yaitu spektrofotometer UV-Visible, kuvet kuarsa, plastik, rak tabung reaksi, tabung reaksi, pompa bulb, vorteks, pipet mikro, gelas piala, labu takar, gelas ukur dan kertas saring.

3. Hewan Uji

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus menyusui betina galur wistar sebanyak 30 ekor dengan berat antara 200 g – 300 g, berumur 5 - 6 bulan. Tikus yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman adas

Determinasi tanaman adas dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman adas yang diambil, agar terhindar dari kesalahan pada pengumpulan bahan. Dalam penelitian ini determinasi dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu.

2. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel diambil pada daun dan batang adas yang segar dari daerah Lereng Gunung Merapi, Selo, Boyolali, Jawa Tengah. Bagian tanaman yang diambil yaitu daun dan batang adas dengan cara dipetik, kemudian dibersihkan dari kotoran dan debu yang menempel.

3. Pembuatan serbuk daun dan batang adas

Daun dan batang adas yang telah dibersihkan dari kotoran atau bahan asing yang menempel dengan pencucian dan sortasi, kemudian dikeringkan pada oven dengan suhu yang konstan. Pengeringan bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga simplisia dapat disimpan dalam waktu lama. Kemudian dilakukan penyerbukan dengan penggilingan dan diblender untuk mendapatkan serbuk adas, diayak dengan pengayak nomor 60.

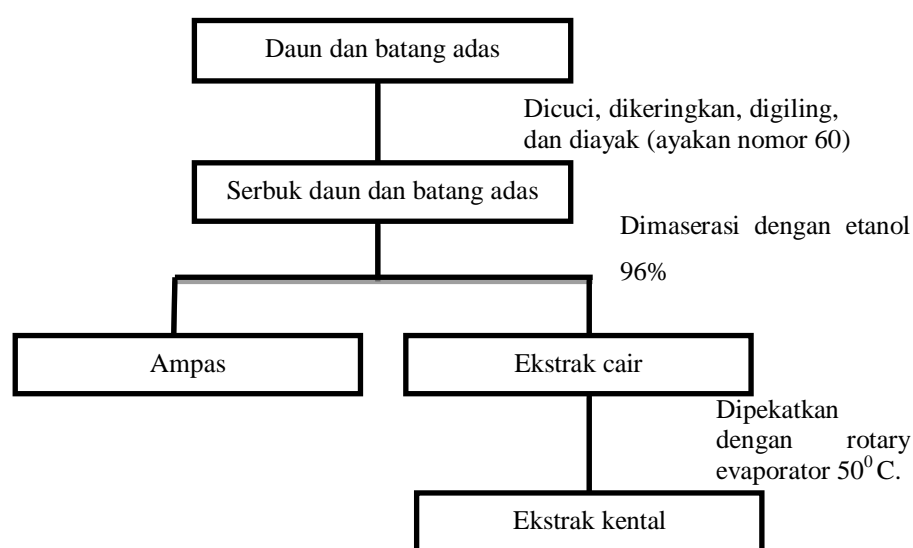
4. Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan daun dan batang adas dengan menggunakan alat *moisture balance*. Cara penggunaan *moisture balance* yaitu sebanyak 2 gram serbuk daun dan batang adas serta 2 gram ekstrak etanol daun dan batang adas dimasukkan kedalam cakram *moisture balance* yang telah ditara. Kemudian dimasukkan dalam alat *moisture balance* (alat posisi menyala) ditunggu sampai terdengar bunyi, bunyi alat menandakan bahwa penetapan susut pengeringan sudah selesai. Data diambil dalam satuan % dan penetapan susut pengeringan dilakukan tiga kali.

5. Pembuatan ekstrak etanol daun dan batang adas

Pembuatan ekstrak etanol daun dan batang adas diperoleh dengan menggunakan metode ekstraksi yaitu maserasi. Dengan perbandingan serbuk dan pelarut yaitu 1 : 10. Sebanyak 500 g serbuk adas dimasukkan kedalam botol

bewarna coklat kemudian direndam dengan etanol 96% sebanyak 5000 ml, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari, proses maserasi harus terlindung dari cahaya matahari sambil berulang – ulang dilakukan pengadukan. Hasil maserasi disaring dengan menggunakan kain flanel dan kertas saring. Sisa ampas kemudian ditambahkan lagi dengan pelarut etanol 96% dengan volume penambahan pelarut yaitu setengah kali dari pelarut pertama. Sari yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C. Hasil dari pemekatan merupakan ekstrak kental daun dan batang adas.



Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanol daun dan batang adas

6. Identifikasi senyawa kimia berdasarkan reaksi warna

6.1 Identifikasi alkaloid. Sampel ekstrak etanol daun dan batang adas dilarutkan dalam 2 ml asam klorida, dipanaskan 5 menit dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditambah 2 – 3 tetes pereaksi Dragendorff. Adanya senyawa alkaloid ditunjukkan dengan endapan jingga (Ningsih *et al* 2016).

6.2 Identifikasi saponin. Sebanyak 2 ml sampel ekstrak etanol daun dan batang adas dilarutkan dalam aquadest pada tabung reaksi ditambah 10 tetes KOH dan dipanaskan dalam penangas air 50°C selama 5 menit, dikocok selama 15 menit. Jika terbentuk busa mantap setinggi 1 cm dan tetap stabil selama 15 menit menunjukkan adanya senyawa saponin (Ningsih *et al* 2016).

6.3 Identifikasi tanin. Sampel ekstrak etanol daun dan batang adas dididihkan dengan 20 ml air lalu disaring. Ditambahkan beberapa tetes feriklorida 1%

dan terbentuknya warna coklat kehijauan atau biru kehitaman menunjukkan adanya tanin (Mustikasari *et al* 2010).

6.4 Identifikasi flavonoid. Sampel ekstrak etanol daun dan batang adas dicampur dengan 5 ml etanol, dikocok, dipanaskan, dan dikocok lagi kemudian disaring. Ditambahka Mg 0,2 gram dan 3 tetes HCl pada masing – masing filtrat. Terbentuknya warna merah pada lapisan etanol menunjukkan adanya flavonoid (Mustikasari *et al*2010).

6.5 Identifikasi triterpenoid. Sebanyak 2 ml sampel ekstrak etanol daun dan batang adas dilarutkan dalam 10 ml aquadest ditambah dengan pereaksi Liberman Burchard 1 ml. Adanya senyawa terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman (Ningsih *et al* 2016).

7. Pembuatan larutan uji

7.1 Larutan Na CMC 0,5%. Larutan Na CMC dibuat dengan menimbang serbuk Na CMC sebanyak 500 mg kemudian dimasukkan kedalam cawan penguap dan ditambah sedikit aquadest. Kemudian dipanaskan hingga mengembang dan dimasukkan ke dalam mortar dan ditambahkan aquadest sedikit demi sedikit sampai 100 ml, diaduk hingga homogen.

7.2 Larutan Asifit. Larutan Asifit dibuat dengan menimbang 1 tablet Asifit (kandungan 754 mg) kemudian dilarutkan dengan CMC 0,5% hingga 100 ml.

7.3 Pembuatan sediaan uji. Pembuatan sediaan uji ekstrak dibuat dengan menimbang 500 mg Na CMC kemudian ditaburkan ke dalam cawan penguap yang telah berisi air panas dan diaduk hingga mengembang. Ekstrak daun dan batang adas ditimbang 1 g, lalu digerus dalam mortir dengan tujuan untuk mengecilkan partikel setelah itu ditambahkan mucilago Na CMC sampai volume 50 ml dan diaduk sampai homogen.

8. Penentuan dosis

8.1 Dosis Asifit. Dosis Asifit pada manusia yaitu sekali pemakaian 754 mg untuk berat badan 70 kg. Faktor konversi manusia (70 kg) ke tikus (200 gram)

adalah 0,018 sehingga dosis Asifit untuk tikus 200 gram adalah $754 \text{ mg} \times 0,018 = 13,572 \text{ mg}/200 \text{ gram BB tikus}$ (67,86 mg/kg Bbtikus).

8.2 Dosis ekstrak etanol daun dan batang adas. Dosis ekstrak etanol daun adas yang efektif sebagai *lactagogum* berdasarkan penelitian Rifqiyati *et al* (2016) yaitu 631,6 mg/kg bb dengan perlakuan pada tikus yaitu 2 kali sehari. Jadi dosis pada ekstrak etanol daun dan batang adas yaitu 315 mg/kg BB, 630 mg/kg bb, 945 mg/kg bb selama 2 kali sehari.

9. Penyiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah 30 ekor tikus putih betina dengan bobot 200 g – 300 g berumur 5 – 6 bulan. Tikus tersebut telah diadaptasikan pada lingkungan. 30 ekor tikus diambil secara acak yang dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan masing – masing kelompok terdiri atas 5 ekor tikus.

10. Perlakuan hewan uji

Induk tikus betina dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, yang diambil secara acak dari 30 ekor tikus. Perlakuan setiap kelompok tikus adalah sebagai berikut :

- Kelompok 1 : Kontrol normal. Tikus hanya diberi pakan dan minum.
- Kelompok 2 : Kontrol negatif (CMC Na 0,5%) 1 ml.
- Kelompok 3 : Kontrol positif (Asifit) dengan dosis 67,86 mg/kg BB.
- Kelompok 4 : Ekstrak etanol daun dan batang adas dengan dosis 315 mg/kg BB.
- Kelompok 5 : Ekstrak etanol daun dan batang adas dengan dosis 630 mg/kg BB.
- Kelompok 6 : Ekstrak etanol daun dan b=atang adas dengan dosis 945 mg/kg BB.

11. Pengambilan air susu tikus

Air susu tikus diambil dari induk tikus yang sedang menyusui. Pengambilan dilakukan pada hari ke 2 dan 14 selama masa menyusui. Air susu diambil dengan cara puting susu tikus disambungkan dengan selang yang sudah terhubung spuit dan diambil dengan cara pemerasan.

12. Prosedur uji kadar protein air susu

12.1 Pembuatan larutan pereaksi Biuret. Sejumlah 1,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 6 g potasium tartrat dicampur dengan 500 ml aquadest pada beker glass lalu diaduk. Saat diaduk, ditambahkan 300 ml NaOH 10%. Dipindahkan ke labu terukur 1 L dan ditambahkan dengan air hingga 1 L.

12.2 Pembuatan Buffer Asam Asetat pH 5. Larutan buffer merupakan campuran dari 2,8 ml asam asetat 0,2 M dengan 5 ml natrium asetat 0,2 M dalam 100 ml labu takar dengan penambahan aquadest sampai pH 5. Pembuatan larutan asam asetat 0,2 M dengan mengencerkan 1,2 ml asam asetat glasial 100% dengan aquadest ad 100 ml. Larutan natrium asetat 0,2 M dibuat dengan cara 1,64 gram natrium asetat dilarutkan dengan aquadest ad 100 ml.

12.3 Penentuan panjang gelombang maksimum. Larutan BSA induk 22 % diencerkan menjadi konsentrasi 3% dengan mengambil 0,9 ml larutan BSA ditambah 0,8 ml reagen biuret kemudian ditambah dengan 1,3 ml aquadest, diaduk dengan vortex. Larutan didiamkan 10 – 11 menit, diukur serapan pada panjang gelombang 400 – 800 nm. Diperoleh panjang gelombangnya.

12.4 Penetapan operating time . Dipipet larutan stock BSA 22% sebanyak 0,5 ml ditambah 1,7 ml aquadest dan 0,8 ml reagen biuret, setelah itu dibaca operating time dengan panjang gelombang yang sudah diketahui, pembacaan operating time dilakukan selama 60 menit.

12.5 Pembuatan kurva kalibrasi. Larutan stock BSA dengan konsentrasi 22% disiapkan untuk pembuatan kurva standar. Dibuat larutan seri dengan konsentrasi 2, 3, 4, 5, 6 dan 7%, kemudian masing – masing larutan ditambahkan 0,8 ml reagen Biuret ditambahkan aquadest ad 3 ml kedalam tiap tabung dan larutan divortex kemudian didiamkan selama 10 – 11 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang telah ditetapkan.

12.6 Pengukuran kadar protein air susu tikus. Sebanyak ± 55 mg sampel dilarutkan dalam aquadest ad 5 ml. Sampel ditambahkan sedikit demi sedikit amonium sulfat kristal sambil diaduk menggunakan vortex, dilakukan sampai amonium sulfatnya jenuh. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit, diperoleh 2 lapisan yaitu lapisan atas (protein yang

mengendap) dan lapisan bawah (larutan garam amonium sulfat). Lapisan atas diambil dan ditambahkan 10 ml larutan buffer asam asetat pH 5. Larutan kemudian diambil 5 ml dimasukkan tabung reaksi, ditambahkan 10 ml reagen biuret dan diaduk dengan vortex, didiamkan 10 – 11 menit, diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang telah ditetapkan (Salim *et al* 2017)

13. Metode Validasi Analisis

13.1 Kecermatan (*accuracy*). Kecermatan merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita 2004).

13.2 Keseksamaan (*precision*). Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata – rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel yang diambil dari campuran yang homogen (Harmita 2004).

13.3 Linearitas (*Linearity*). Pengukuran linearitas dilakukan dengan mengukur absorbansi dari seri konsentrasi larutan induk Bovin Serum Albumin. Seri pengenceran konsentrasi dibuat dalam satuan persen (%), dimana ada 6 seri konsentrasi yaitu 2, 3, 4, 5, 6, 7% dibaca pada panjang gelombang maksimum yang telah diketahui. Hasil kemudian digunakan untuk menghitung nilai regresi linear antara konsentrasi dan absorbansi.

13.4 Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ). Batas deteksi dan batas kuantitasi penetapan kadar didapat dari perolehan nilai *b* (slope) pada persamaan garis linear $y = a + bx$, sedangkan simpangan blanko sama dengan simpangan baku residu (sy/x).

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \text{ } sy/x}{b}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \text{ } sy/x}{b}$$

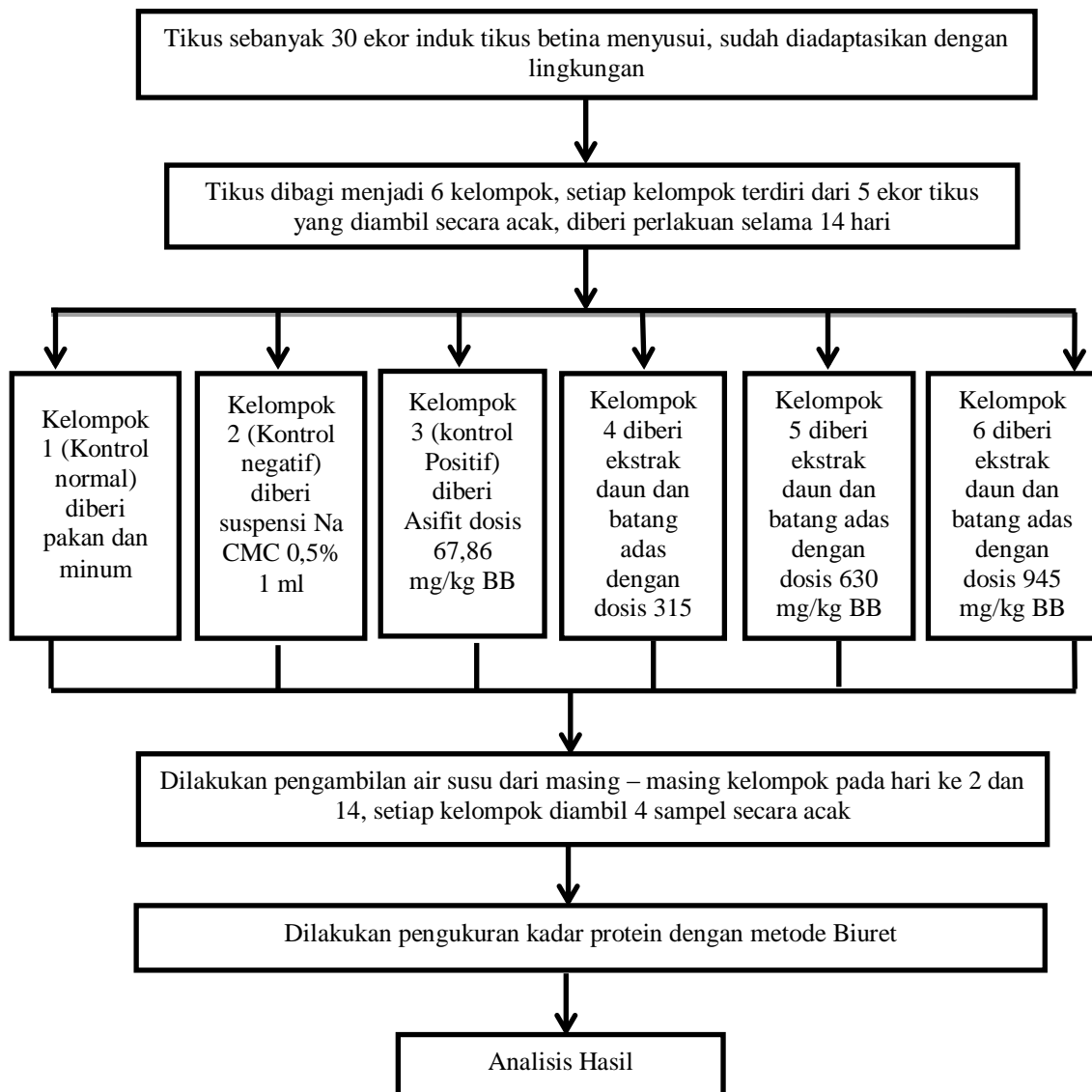
E. Analisis Hasil

Data pengukuran kadar protein air susu tikus menyusui yang diperoleh pada penelitian ini dianalisa dengan menggunakan *software SPSS for Windows Release 21.0* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan.

Data yang diperoleh tersebut diolah untuk melihat apakah data terdistribusi normal atau tidak dengan metode uji distribusi normal *Shapiro wilk*. Hasil data yang terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan metode *Two Way Anova* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan atau tidak diantara perlakuan, jika ada perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) maka dilakukan uji *Tukey Post Hoc Test*.

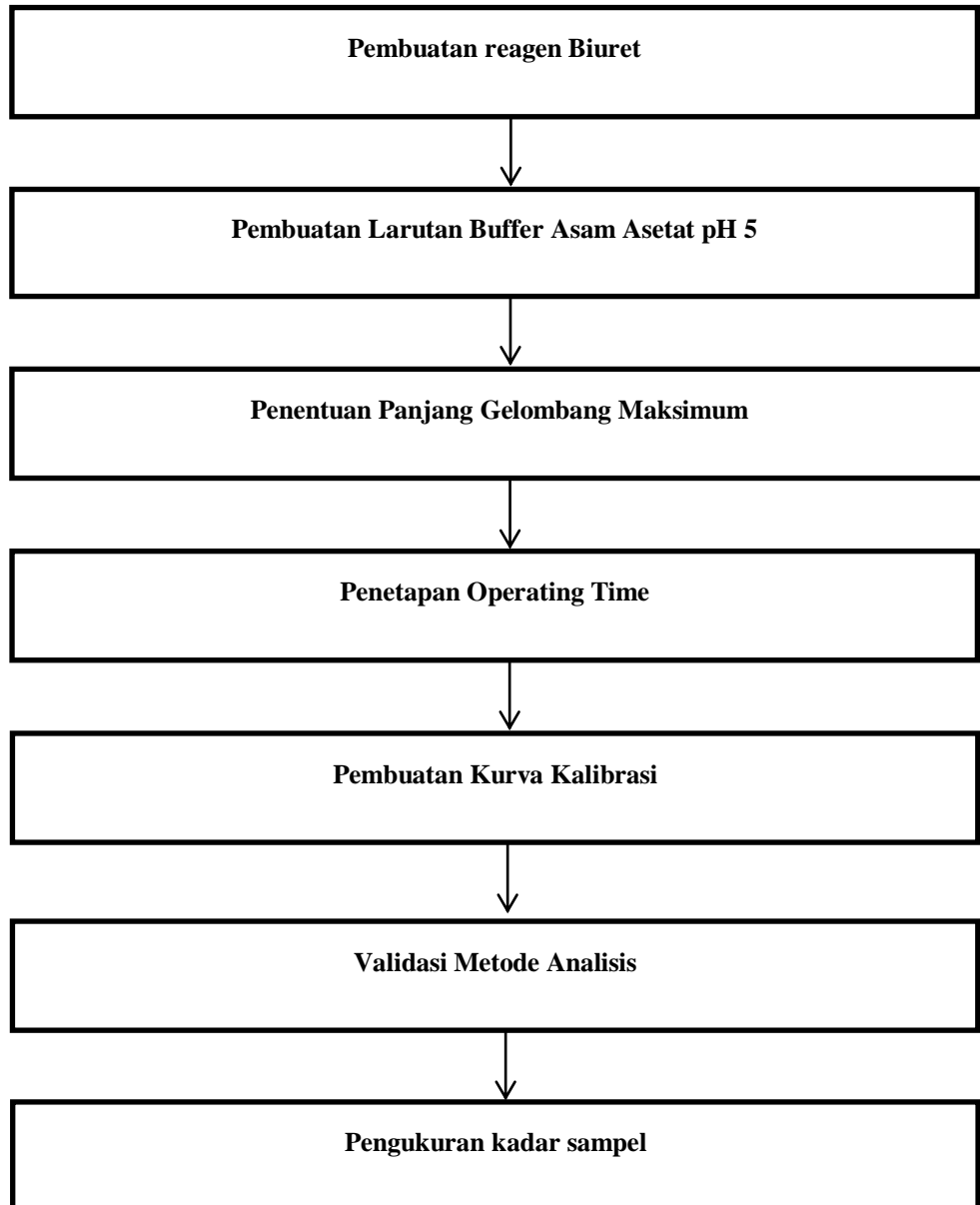
F. Skema Penelitian

1. Skema Prosedur Penelitian



Gambar 3. Skema prosedur penelitian

2. Skema penetapan kadar protein air susu dengan metode Biuret



Gambar 4. Skema penentuan kadar protein