

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) yang diperoleh di daerah Magetan, Jawa Timur. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun ceremai yang masih segar, daun tidak terlalu muda dan tua, berwarna hijau dan bebas dari kotoran, serta diambil pada bulan Desember 2018.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) yang diperoleh dari simplisia kering yang dibuat serbuk.

Variabel utama kedua adalah aktivitas antikonvulsi pada hewan uji mencit yang diinduksi Isoniazid.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama memuat berbagai macam variabel yang meliputi variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang dengan sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) yang diperoleh dengan tehnik maserasi dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak diberikan dalam dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB.

Variabel tergantung adalah pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antikonvulsi hewan uji mencit setelah diberikan induksi isoniazid dosis 300 mg/kgBB.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kondisi peneliti, kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, usia, jenis kelamin, galur, lingkungan tempat tinggal dan laboratorium.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun ceremai adalah daun yang berwarna hijau, tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda yang diperoleh dari pohon ceremai yang berasal dari daerah Magetan, Jawa Timur.

Kedua, serbuk daun ceremai adalah serbuk yang diperoleh dari hasil pengeringan, penggilingan dan pengayakan daun ceremai yang dapat melalui pengayak mesh 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun ceremai adalah hasil ekstraksi serbuk daun ceremai dengan menggunakan metode maserasi pelarut etanol 96% yang kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental.

Keempat, hewan uji dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan berumur 5-6 minggu dengan berat badan 20-30 gram yang diinduksi isoniazid 300 mg/KgBB sehingga mengalami kejang.

Kelima, induksi kejang dalam penelitian ini adalah isoniazid yang dilarutkan dalam NaCl fisiologis, diberikan secara intraperitoneal dalam dosis 300 mg/KgBB pada hari ke 10.

Keenam, parameter yang diamati adalah onset kejang, durasi kejang, frekuensi kejang, dan jumlah kematian hewan uji.

Ketujuh, kejang yang terjadi setelah induksi isoniazid adalah kejang tonik klonik dimana terjadi kekakuan otot kaki dilanjutkan hentakan simetris.

Kedelapan, onset kejang adalah waktu yang dihitung mulai dari pemberian induksi isoniazid sampai timbulnya kejang pada hewan uji.

Kesembilan, durasi kejang adalah waktu yang dihitung mulai dari timbulnya kejang sampai selesai kejang pada hewan uji.

Kesepuluh, frekuensi kejang adalah jumlah kejang yang terjadi pada hewan uji.

C. Alat, Bahan dan Hewan Percobaan

1. Alat

Alat untuk membuat simplisia yaitu oven, mesin penggiling dan ayakan ukuran mesh no 40. Alat penyari yang digunakan yaitu alat maserasi, evaporator, kain flanel, corong, beaker glass, timbangan analitik, pipet dan pengaduk. Alat pengukur kelembapan serbuk yaitu *moisture balance Ohaus*. Alat pengukur kadar air ekstrak yaitu *sterling bidwell*. Alat yang digunakan untuk perlakuan hewan uji yaitu timbangan, kandang mencit, beaker glass, spuit injeksi, spuit oral dan gelas ukur.

2. Bahan

2.1. Bahan Sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) yang segar, berwarna hijau, tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, serta tidak rusak yang diperoleh di daerah Magetan, Jawa Timur.

2.2. Bahan Kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 96%, *Carbonyl Metil Cellulose Natrium* (CMC Na), toluen, larutan fisiologis *Natrium Klorida* (NaCl), Isoniazid, Fenobarbital, serbuk magnesium, HCl 2N, reagen Mayer, reagen Dragendrof, FeCl₃ 1%, asam asetat, asam sulfat pekat, reagen Lieberman Bourchat dan akuades.

3. Hewan Percobaan

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan berumur 5-6 minggu dengan berat 20-30 gram. Mencit dibagi menjadi 5 kelompok yang dipelihara dalam kandang. Tiap kandang berisi 6 ekor mencit yang dipelihara dan dirawat dengan cara yang sama. Penerangan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap, serta kebutuhan makanan dan minuman yang terkontrol agar kondisi tikus tetap sehat (Rohadi 2015).

D. Jalannya penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi ini bertujuan untuk menetapkan kebenaran identitas tanaman yang diinginkan, sehingga dapat menghindari kesalahan dalam pengumpulan

bahan yang akan diteliti. Daun ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) yang digunakan pada penelitian ini dibuktikan dengan determinasi yang dilakukan di Laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Tawangmangu.

2. Pembuatan serbuk

Daun ceremai yang telah dicuci dengan air untuk menghilangkan kotoran dan cecairan, setelah itu dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C. Simplisia kering dihaluskan dengan menggunakan mesin penggiling atau blender, kemudian diayak dengan pengayak mesh nomor 40 dan hasil serbuk disimpan dalam wadah tertutup kering dan tertutup rapat yang selanjutnya digunakan untuk penelitian (Depkes 1985).

3. Pengukuran kelembapan serbuk daun ceremai

Pengukuran kelembapan serbuk daun ceremai dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance* dengan cara serbuk dari simplisia daun ceremai ditimbang sebanyak 2 gram dalam wadah yang sudah ditara. Wadah dimasukkan ke dalam alat *moisture balance Ohaus* pada suhu 105°C. Pemanasan akan berhenti jika alat sudah berbunyi, kemudian dicatat hasil susut pengeringan (dalam satuan %). Pengukuran kelembapan serbuk dilakukan sebanyak 3 kali, di laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

4. Pembuatan ekstrak daun ceremai

Masukkan 500 gram serbuk kering daun ceremai, tambahkan 10 bagian pelarut. Rendam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara pengendapan, sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan penguap *vacum* atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental. Kemudian hitung rendemen yang diperoleh. Rendemen harus mencapai angka sekurang-kurangnya sebagaimana ditetapkan pada monografi ekstrak (Kemenkes RI 2013).

Rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat simplisia daun ceremai}} \times 100\%$$

5. Penetapan kadar air ekstrak daun ceremai

Alat labu 500 mL (A) dihubungkan dengan pendingin air balik melalui alat balik (C) melalui alat penampung (B) yang dilengkapi dengan tabung penerima 5 mL (E) yang berskala 0,1 mL. Panaskan menggunakan pemanas listrik yang suhunya dapat diatur atau tangas minyak. Bagian atas labu tabung penyambung (D) sebaiknya dibungkus dengan asbes. Bersihkan tabung penerima dan pendingin dengan *asam pencuci*, bilas dengan air, kemudian keringkan dalam lemari pengering. Timbang seksama sejumlah bahan yang diperkirakan mengandung 1 sampai 4 mL air, masukkan kedalam labu kering. Jika zat berupa pasta, timbang dalam sehelai lembaran logam dengan ukuran yang sesuai dengan leher labu. Untuk zat yang dapat menyebabkan gejalak saat mendidih, tambahkan batu didih secukupnya. Masukkan lebih kurang 200 mL toluen jenuh air kedalam labu, pasang rangkaian alat. Masukkan toluen jenuh air kedalam tabung penerima (E) melalui pendingin sampai leher alat penampung (B). Panaskan labu hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mulai mendidih, atur penyulingan dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik, hingga sebagian besar air tersuling, kemudian naikkan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluen jenuh air, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan telah dibasahi dengan toluen jenuh air. Lanjutkan penyulingan selama 5 menit. Dinginkan tabung penerima hingga suhu ruang. Jika ada tetes air yang melekat, gosok tabung pendingin dan tabung penerima dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluen jenuh air hingga tetesan air turun. Baca volume air setelah air dan toluen memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b (Kemenkes 2011).

Rumus penetapan kadar air :

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

6. Pembuatan suspensi ekstrak daun ceremai

R/ Ekstrak daun ceremai	1,2%
CMC Na	1%
Akuades ad	100 ml

Pembuatan suspensi dilakukan dengan melarutkan 1 gram CMC Na dalam 20 ml aquadest hangat, digerus sampai terbentuk mucilago. Menimbang 1,2 gram ekstrak kental daun ceremai masukkan dalam mortir dan tambahkan mucilago secukupnya, digerus sampai homogen dengan penambahan akuades. Memasukkan sediaan ke dalam botol kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas 100 ml (Pradiningsih *et al.* 2017).

7. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun ceremai

Pengujian fitokimia ekstrak daun ceremai dilakukan berdasarkan metode analisis tanaman obat.

6.1. Identifikasi Flavonoid. Sebanyak 2 mL ekstrak ditambahkan 2 mL etanol 95%, 0,5 gram serbuk magnesium, dan 2 mL HCl 2N. Larutan didiamkan selama 1 menit dan kemudian ditambahkan 2 mL HCl pekat. Hasil positif jika terbentuk warna merah jingga atau ungu.

6.2. Identifikasi Alkaloid. Ekstrak ditimbang 0,5 gram ditambah dengan sedikit larutan HCl 2N dengan dipanaskan, kemudian ditambahkan larutan Mayer terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning dan dengan reagen Dragendrof terbentuk endapan warna coklat sampai hitam, maka ada kemungkinan terdapat alkaloid.

6.3. Identifikasi Tanin. Sebanyak 2 mL ekstrak ditambahkan 2 mL air dan kemudian ditambahkan beberapa tetes FeCl₃ 1%. Hasil positif jika terbentuk larutan bitru kehitaman.

6.4. Identifikasi Saponin. Sebanyak 2 mL ekstrak ditambahkan 10 mL akuades panas dalam tabung reaksi, digojog selama 15 menit, kemudian ditambahkan beberapa tetes HCl 2N. Hasil positif jika terbentuk busa yang stabil (Depkes 1989).

6.5. Identifikasi steroid dan terpenoid. Sejumlah tertentu ekstrak ditambahkan dengan satu tetes Liebermann Bouchard yang terdiri dari 1 ml asam

asetat amhidrat dan asam sulfat pekat 1 tetes. Terbentuk warna merah berubah menjadi hijau, ungu dan terakhir biru, menunjukkan positif steroid dan triterpenoid (Diana *et al.* 2016).

8. Pembuatan suspensi Fenobarbital

Salah satu obat yang digunakan dalam terapi kejang pada epilepsi adalah fenobarbital dengan dosis pada manusia 2 kali sehari 100 mg/70kgBB. Dosis fenobarbital untuk mencit adalah 26 mg/kgBB. Suspensi fenobarbital diperoleh dengan melarutkan 0,25 gram fenobarbital ke dalam CMC Na 0,5%.

9. Pembuatan larutan NaCl fisiologis 0,9%

NaCl digunakan untuk melarutkan induksi isoniazid. NaCl fisiologis 0,9% dibuat dengan cara melarutkan 0,9 gram NaCl dalam 100 ml akuades diaduk sampai larut.

10. Pembuatan induksi Isoniazid

Induksi kejang dalam penelitian ini adalah isoniazid dengan dosis 300 mg/KgBB yang diberikan secara intraperitoneal. Isoniazid dilarutkan dalam NaCl fisiologis 0,9%.

11. Pembuatan larutan CMC Na 0,5%

Pembuatan larutan CMC 0.5% dilakukan dengan cara melarutkan 0.5 gram CMC Na yang telah ditimbang ke dalam air panas sampai volume 100 mL.

12. Penetapan dosis sediaan uji

Dalam penelitian ini dosis CMC Na 0,5% sebagai induksi kelompok tanpa perlakuan yang diberikan pada mencit adalah 1 mL/20gramBB.

Dosis fenobarbital sebagai induksi kelompok pembanding ditentukan berdasarkan dosis manusia dengan berat badan 70 kg. Konversi dosis yang digunakan adalah konversi dosis manusia ke mencit dengan berat badan 20 gram dengan nilai konversi adalah 0,0026. Dosis fenobarbital untuk manusia sebesar 200 mg sehingga jika dikonversikan ke mencit menjadi 26 mg/20gBB.

Dosis ekstrak etanol daun ceremai sebagai antikonvulsi yaitu 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB untuk hewan uji mencit. Dosis tersebut dihitung berdasarkan dosis efektif dari penelitian sebelumnya terhadap tanaman dengan genus yang sama yaitu tanaman meniran hijau (*Phyllanthus amarus* L.) sebagai

antikonvulsi pada dosis efektif 70 mg/kgBB dengan hewan uji tikus (Manikkoth, *et.al.* 2011).

13. Prosedur pengujian

Prosedur pengujian efek antikonvulsi ekstrak daun ceremai terhadap mencit putih jantan yang diinduksi isoniazid yaitu pertama 30 ekor mencit, sebelum diberikan perlakuan diadaptasi terlebih dahulu dengan pakan dan lingkungan penelitian selama seminggu. Kedua, hewan uji dibagi secara acak menjadi 5 kelompok perlakuan sebagai berikut :

Kelompok I yaitu kelompok positif yang diberikan induksi fenobarbital 26 mg/kgBB pada hari ke-10, 30 menit kemudian diberikan induksi isoniazid 300 mg/kgBB.

Kelompok II yaitu kelompok negatif, mencit diberikan CMC Na 0,5% dosis 0,5 mL/20gBB selama 10 hari berturut-turut dan induksi isoniazid 300 mg/KgBB pada hari ke-10.

Kelompok III yaitu kelompok yang diberikan suspensi ekstrak daun ceremai 100 mg/kgBB selama 10 hari berturut-turut dan induksi isoniazid 300 mg/kgBB pada hari ke-10.

Kelompok IV yaitu kelompok yang diberikan suspensi ekstrak daun ceremai 200 mg/kgBB selama 10 hari berturut-turut dan induksi isoniazid 300 mg/kgBB pada hari ke-10.

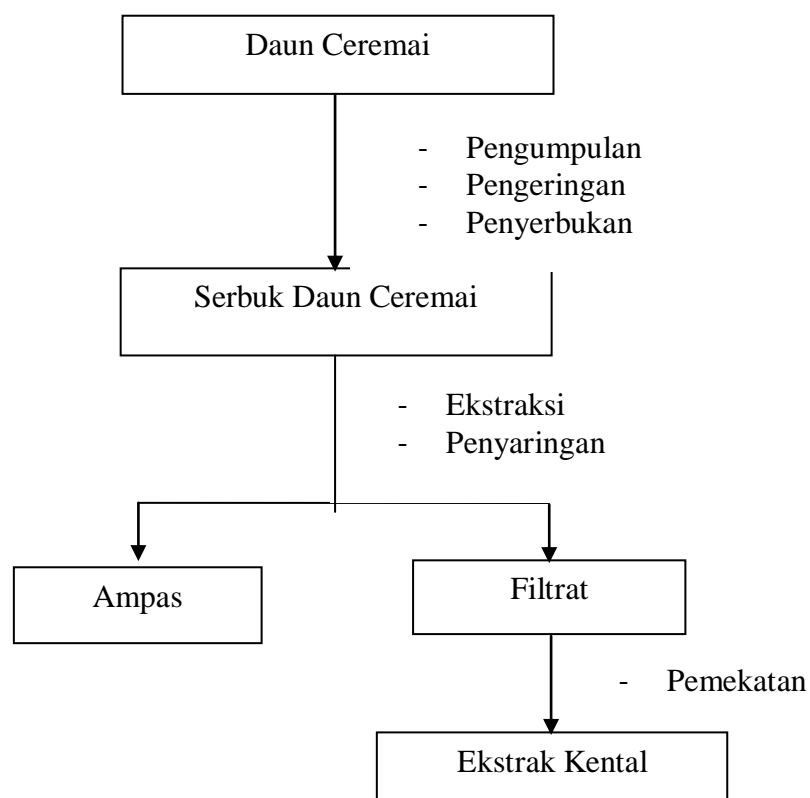
Kelompok V yaitu kelompok yang diberikan suspensi ekstrak daun ceremai 400 mg/kgBB selama 10 hari berturut-turut dan induksi isoniazid 300 mg/kgBB pada hari ke-10.

Pada hari ke-10 yaitu setelah 30 menit perlakuan, mencit diberikan induksi isoniazid 300 mg/kgBB yang telah dilarutkan dalam NaCl fisiologis 0,9%. Kemudian mengamati dan menilai parameter selama 120 menit, meliputi onset, durasi, frekuensi kejang dan jumlah mencit mati (Asehinde *et al.* 2018). Kejang tonik-klonik didefinisikan sebagai episode kejang otot yang melibatkan tungkai depan dengan atau tanpa kehilangan refleks meluruskan. Kejang tonik ditandai dengan perpanjangan secara keseluruhan kaki depan dan kaki belakang (Rohadi 2015).

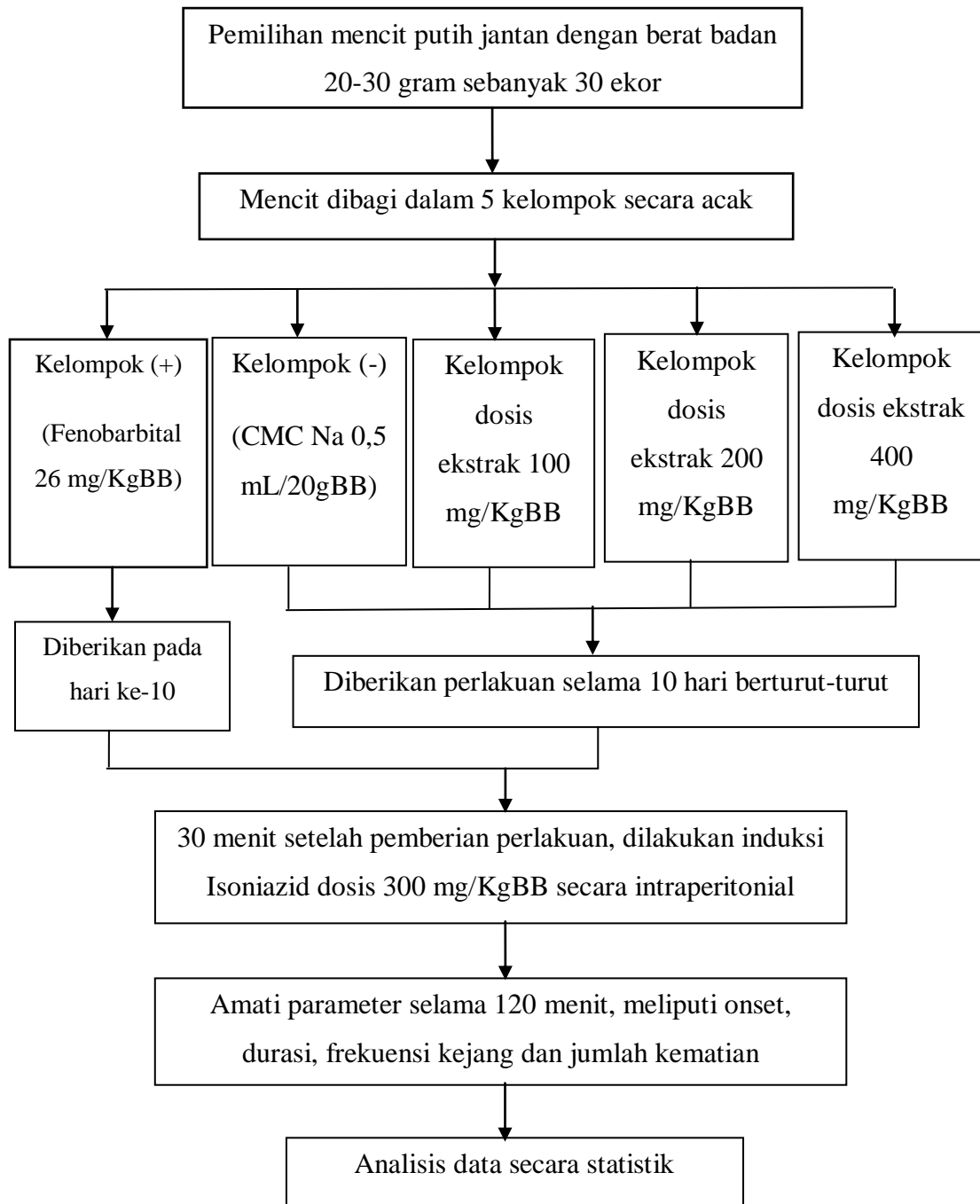
E. Analisa Hasil

Analisis data pertama yang digunakan dalam penelitian ini untuk melihat apakah data yang telah didapat terdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji normalitas *Shapiro-wilk* ($p > 0,05$) dan dilanjutkan dengan uji parametrik (*One Way ANOVA*) untuk mengetahui perbedaan diantara perlakuan ($p < 0,05$). Uji homogenitas varians menggunakan uji *Levene Statistic* untuk menunjukkan adanya homogenitas varians ($p > 0,05$). Data yang memenuhi syarat uji ANOVA dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* untuk mengetahui perbedaan mean antara kelompok tersebut, signifikasikan atau tidak dengan menggunakan program *SPSS for Windows Release*.

F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 12. Pembuatan Ekstrak Daun Ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels)



Gambar 13. Prosedur Penelitian Uji Efektivitas Antikonvulsi Ekstrak Etanol Daun Ceremai