

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman Adas yang diperoleh dari daerah Lereng Gunung Merapi, Selo, Boyolali, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah batang dan daun Adas yang diambil secara acak. Batang dan daun adas yang diambil dalam keadaan segar, bersih, daun tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, serta terbebas dari hama dan penyakit. Pengambilan sampel diambil pada pagi hari di daerah Lereng Gunung Merapi, Selo, Boyolali, Jawa Tengah yang diambil pada bulan Januari 2019.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama penelitian ini adalah aktivitas ekstrak batang dan daun adas hasil maserasi dengan pelarut etanol 96% terhadap peningkatan air susu dan histopatologi kelenjar *mammae* tikus.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang biasa diubah-ubah yang dimaksudkan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol batang dan daun adas dengan variasi dosis yang berbeda.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah produksi air susu pada tikus menyusui dengan pemberian ekstrak etanol batang dan daun adas.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh

tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah peneliti, kondisi laboratorium, kondisi hewan meliputi umur, berat badan dan galur.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, batang dan daun ada adalah batang dan daun dari tanaman adas yang masih segar, sehat dan terbebas dari hama dan penyakit yang tumbuh di daerah Lereng Gunung Merapi, Selo, Boyolali, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk batang dan daun ada adalah batang dan daun ada yang sudah dipetik kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran, setelah itu daun yang sudah dicuci bersih dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C, kemudian diserbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak batang dan daun ada adalah hasil ekstraksi serbuk batang dan daun ada dengan larutan penyari etanol 96% menggunakan metode maserasi.

Keempat, hewan uji dalam penelitian ini adalah tikus betina putih yang sedang menyusui berumur 5 – 6 bulan dengan berat badan rata-rata 200-300 g.

Kelima, asifit adalah obat laktagogum oral yang diperoleh dari Kimia Farma. Laktagogum merupakan obat yang dapat meningkatkan atau memperlancar pengeluaran air susu.

Keenam, kondisi histologi kelenjar *mammae* adalah peningkatan diameter dan jumlah alveoli kelenjar *mammae*.

Ketujuh, dosis efektif adalah dosis dari ekstrak batang dan daun ada yang memiliki aktivitas meningkatkan produksi air susu dengan parameter peningkatan diameter dan jumlah alveoli kelenjar *mammae* yang setara dengan kontrol positif.

## **C. Alat, Bahan dan Hewan Uji**

### **1. Alat**

Alat yang digunakan adalah oven, peralatan maserasi, *rotary evaporator*, alat-alat gelas, blender, *moisture balance*, neraca listrik, timbangan hewan uji, kandang hewan uji, spuit injeksi 1,0 ml, rangkaian alat bedah (scalpel, pinset, pisau, gunting, jarum, dan meja lilin), mikrotom putar (*rotary microtome*), object glass dan deck glass, mikroskop.

## **2. Bahan**

**2.1 Bahan sampel.** Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang dan daun adas (*Foeniculum vulgare* Mill ) yang segar, secara acak berwarna hijau, tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda dan tidak rusak yang diperoleh dari daerah Lereng Gunung Merapi, Selo, Boyolali, Jawa Tengah.

**2.2 Bahan kimia.** Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96% sebagai larutan penyari. untuk uji farmakologi digunakan Moloco, *Carbonyl Metil Cellulose Natrium* (CMC-Na) 0,5%, larutan fisiologis NaCl 0,9% dan aquadest. Bahan untuk pengamatan histopatologi adalah formalin PA, larutan warna *Haematoxylin Eosin*, formaldehid, etanol, xylene dan alkohol. Untuk uji identifikasi senyawa tanaman alkohol, anhidrida asam asetat, kloroform, asam sulfat, HCL 2N, serbuk magnesium, amil alkohol, xylene, asam klorida, besi (III) klorida dan air suling.

## **3. Hewan uji**

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih betina berumur 5-6 bulan yang sedang menyusui dengan berat badan 200-300 g sebanyak 24 ekor yang dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan dilakukan secara acak. Semua tikus dipelihara dan dirawat dengan cara yang sama, mendapat perlakuan yang sama, ukuran kandang yang sesuai dengan temperature  $\pm 10^{\circ}\text{C}$ . Penerangan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap, selama penelitian kebutuhan makanan dan minuman harus selalu terkontrol agar kondisi tikus tetap sehat.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi tanaman adas**

Tahapan pertama penelitian adalah determinasi tanaman yang dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman adas sesuai kepustakaan dan dibuktikan di Balai Besar Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

## **2. Pengambilan dan pengeringan simplisia**

Tanaman adas diambil dari daerah Lereng Gunung Merapi, Selo, Boyolali, Jawa Tengah. Bagian tanaman yang digunakan adalah batang dan daun adas dengan cara dipetik, yang kemudian disortasi basah lalu dicuci dan dibersihkan dari kotoran dan debu yang menempel, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 45°C sampai didapatkan batang dan daun dengan kadar air tertentu, lalu dilakukan sortasi kering.

## **3. Pembuatan Serbuk**

Sampel yang kering kemudian digiling dengan mesin penggiling dan dihaluskan dengan diblender lalu diayak dengan ayakan nomor 60 sampai didapatkan serbuk batang dan daun adas yang diinginkan. Serbuk yang diperoleh disimpan dalam wadah kering tertutup rapat dan dilakukan pemeriksaan secara organoleptis.

## **4. Pembuatan ekstrak etanol batang dan daun adas**

Ekstraksi serbuk batang dan daun adas dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10. Serbuk batang dan daun adas ditimbang sebanyak 1 bagian lalu dimasukkan ke dalam bejana kemudian ditambahkan etanol 96%, direndam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk kemudian didiamkan selama 18 jam. Maserat dengan ampas dipisahkan dengan cara filtrasi menggunakan kain flanel. Proses penyarian diulang sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarutnya 1:5 dari volume pelarut pada penyarian pertama. Maserat kemudian dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator* dengan suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental (Kemenkes RI 2013).

## **5. Penetapan susut pengeringan**

Penetapan susut pengeringan batang dan daun adas menggunakan alat *moisture balance*, dengan cara menimbang 2 gram serbuk batang dan daun adas kemudian dimasukkan dalam plat alumunium dengan suhu yang digunakan adalah 105°C. Penandaan hasil analisa setelah selesai yaitu sampai diperoleh bobot konstan yang dilakukan penimbangan sebanyak tiga kali.

## 6. Identifikasi kandungan senyawa kimia

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk memastikan kebenaran zat kimia yang terkandung di dalam batang dan daun adas. Identifikasi dilakukan terhadap senyawa golongan alkaloid, saponin, tanin, flavonoid, triterpenoid.

**6.1 Alkaloid.** Serbuk dan ekstrak masing-masing dimasukkan dalam tabung reaksi dibasakan dengan larutan amonia 10%, larutan basa di sari dengan kloroform, ekstrak kloroform diasamkan dengan HCl 1N, kemudian asam dipisahkan dan filtrat diuji dengan pereaksi dragendorf. Hasil positif apabila terbentuk kekeruhan atau endapan jingga kecoklatan. Jika ditambahkan dengan pereaksi mayer hasil positif akan terbentuk endapan putih kekuningan menyatakan adanya alkaloid (Harborne 1987).

**6.2 Saponin.** Serbuk dan ekstrak masing-masing dimasukkan dalam tabung reaksi dididihkan dalam penangas air selama 5 menit, setelah dingin kemudian disaring, filtrat dikocok kuat-kuat dengan arah vertikal selama 1-2 menit, senyawa saponin dapat ditunjukkan dengan adanya busa setinggi 1cm yang stabil setelah dibiarkan selama 1 jam atau pada penambahan 1 tetes HCl 0,1N (Harborne 1987).

**6.3 Tanin.** Sebanyak 1 g serbuk dan ekstrak batang dan daun adas masing-masing dilarutkan dalam 100ml air panas, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambah dengan 3 tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%. Tanin positif apabila berbentuk warna hijau kehitaman pada reaksi dengan  $\text{FeCl}_3$  (Depkes 1995).

**6.4 Flavonoid.** Serbuk dan ekstrak masing-masing ditambahkan dengan 100ml air panas kemudian dididihkan selama 5 menit, disaring dan diambil filtratnya 5 ml dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan serbuk magnesium secukupnya, 1 ml asam klorida dan 2 ml amil alkohol, dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Terbentuknya warna merah/kuning/jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan positif flavonoid (Sarker 2006).

**6.5 Steroid/Triterpenoid.** Serbuk dan ekstrak masing-masing dilarutkan dalam 5 ml eter kemudian diuapkan di dalam cawan penguap. Residu yang

didapat ditambahkan dengan 2 tetes asam asetat anhidrat, kemudian 1 tetes asam sulfat pekat, akan terbentuk warna merah hijau, hijau biru atau violet-biru (Farnsworth 1966).

## **7. Penentuan dosis**

**7.1 Dosis Asifit.** Dosis penggunaan Asifit sekali pemakaian adalah 754 mg untuk manusia dengan berat badan 70 Kg. Faktor konversi manusia 70 Kg ke tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018, sehingga dosis Asifit untuk tikus 200 gram adalah  $754 \text{ mg} \times 0,018 = 13,572 \text{ mg}/200 \text{ gram}$  berat badan tikus (67,86 mg/Kg bb tikus).

**7.2 Dosis ekstrak etanol batang dan daun adas.** Dosis sediaan yang diberikan berdasarkan penelitian Rifqiyati (2016) dengan dosis paling efektif 631,6 mg ekstrak etanol daun adas dengan pemberian 2 kali sehari. Dari dosis tersebut diperoleh variasi dosis pada kelompok pemberian ekstrak etanol daun dan batang adas sebesar 135 mg/Kg BB, 630 mg/Kg BB, dan 945 mg/Kg BB induk tikus.

## **8. Pembuatan sediaan uji**

**8.1 CMC Na 0,5%.** CMC Na 0,5% digunakan sebagai kontrol negatif. CMC Na 0,5% dibuat dengan cara melarutkan 0,5 g CMC Na 0,5% dengan aquadest hangat sedikit demi sedikit, kemudian dimasukkan ke dalam mortir dan digerus sampai halus. Setelah itu, aquadest ditambahkan hingga 100 ml dan diaduk.

**8.2 Asifit.** Suspensi Asifit dibuat dengan cara menggerus 1 tablet Asifit (kandungan zat aktif 754 mg) lalu di suspensikan dengan CMC Na 0,5% hingga volume 100 mL.

**8.3 Sediaan uji.** Sediaan uji dibuat dengan menimbang 500 mg CMC Na kemudian ditaburkan ke dalam cawan penguap yang telah berisi air panas dan diaduk hingga mengembang. Ekstrak batang dan daun adas ditimbang 10 g, kemudian digerus dalam mortir dengan tujuan untuk mengecilkan partikel setelah itu ditambahkan mucilago Na CMC sampai volume 100 ml dan diaduk sampai homogen.

## 9. Pengelompokan dan perlakuan hewan uji

Hewan uji yang digunakan yaitu induk tikus betina yang sedang menyusui sebanyak 24 ekor yang dipelihara dalam kandang bersuhu 21°C, kelembaban 55% dan diberi pakan berupa pelet dan air ad libitum. Sebelum diberi perlakuan, tikus diadaptasi selama 1 minggu dengan tujuan untuk membiasakan pada kondisi percobaan dan mengontrol kesehatan dan dipuaskan selama  $\pm$  16–18 jam. Kemudian tikus dikelompokkan menjadi 6 kelompok dimana masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus dengan perlakuan yang berbeda sebagai berikut:

Kelompok I : Kelompok normal tanpa perlakuan.

Kelompok II : Kontrol negatif. Tikus diberikan CMC 0,5%

Kelompok III : Kontrol positif. Tikus diberikan Asifit 67,86 mg/kg BB tikus.

Kelompok IV : Kelompok perlakuan I. Tikus diberikan ekstrak etanol batang dan daun adas 315 mg/kg BB selama 25 hari.

Kelompok V : Kelompok perlakuan II. Tikus diberikan ekstrak etanol batang dan daun adas dengan dosis 630 mg/kg BB selama 25 hari.

Kelompok VI : Kelompok perlakuan III. Tikus diberikan ekstrak etanol batang dan daun adas dengan dosis 945 mg/kg BB selama 25 hari.

## 10. Penyiapan preparat histologi

Pertama, hewan uji dikorbankan dengan cara *decapitation* (perusakan otak lewat leher) dan dibedah, kemudian di ambil kelenjar *Mammae*. Jaringan kemudian difiksasi dengan menggunakan formalin 10% PA. Tujuan dari fiksasi untuk menjaga agar jaringan tetap normal dan tidak cepat rusak.

Kedua, tahap dehidrasi untuk mengeluarkan air yang terkandung dalam jaringan dengan menggunakan etanol berturut-turut etanol 70%, 80% dan 90% masing-masing selama 1 jam.

Ketiga, tahap *clearing* atau penjernihan dilakukan dengan menggunakan xylene, dimulai dengan memasukkan jaringan ke dalam xylene I selama 20 menit, kemudian xylene II selama 20 menit dan selanjutnya xylene III selama 20 menit. kemudian dilakukan *embedding* dimana tahap ini bertujuan untuk mengeluarkan cairan pada saat proses *clearing* dan mengganti dengan paraffin karena pada saat

proses clearing cairan dapat mengkristal didalam jaringan dan menyebabkan jaringan mudah robek saat pemotongan.

Keempat, dilakukan tahap blocking yaitu proses pembuatan blok preparat agar organ dapat dipotong dengan mikrotom.

Kelima, proses pemotongan jaringan menggunakan mikrotom. Blok paraffin direkatkan diatas blok kayu dengan cara memanaskan salah satu sisi blok paraffin hingga sedikit mencair kemudian langsung ditempelkan. Blok paraffin dan blok kayu diletakkan pada *holder* (pemegang) di mikrotom lalu dikencangkan. Jaringan dipotong dengan ketebalan 5 mikrometer. Potongan blok paraffin yang telah selesai dipotong direndam dalam waterbath dengan suhu air 37-40°C hingga potongan tersebut merenggang. Langkah selanjutnya dengan mengoleskan gliserin pada kaca objek secukupnya, lalu potongan tersebut diambil menggunakan kaca objek dan diletakkan pada hotplate.

Keenam, dilakukan tahap deparafinasi dan rehidrasi dengan tujuan untuk menghilangkan parafin dari blok paraffin sehingga lebih mudah untuk diwarnai, selain itu rehidrasi dilakukan dengan tujuan agar zat pewarna tidak larut jika blok masih mengandung air. Suhu yang dibutuhkan untuk pengeringan yaitu 40-45°C setelah itu potongan siap untuk diwarnai dengan HE.

Ketujuh, pewarnaan dengan HE (*Hematoxylin-eosin*). Jaringan dimasukkan ke dalam pewarna hematoxylin selama 10 sampai 20 menit, kemudian diamati apakah jaringannya sudah berwarna ungu. Selanjutnya, jaringan yang sudah diwarnai tadi dicuci di bawah air mengalir selama 10 menit. Setelah itu, pewarnaan dilanjutkan dengan memasukkan sediaan ke dalam pewarna eosin selama 10 menit.

## **11. Pemeriksaan histologi**

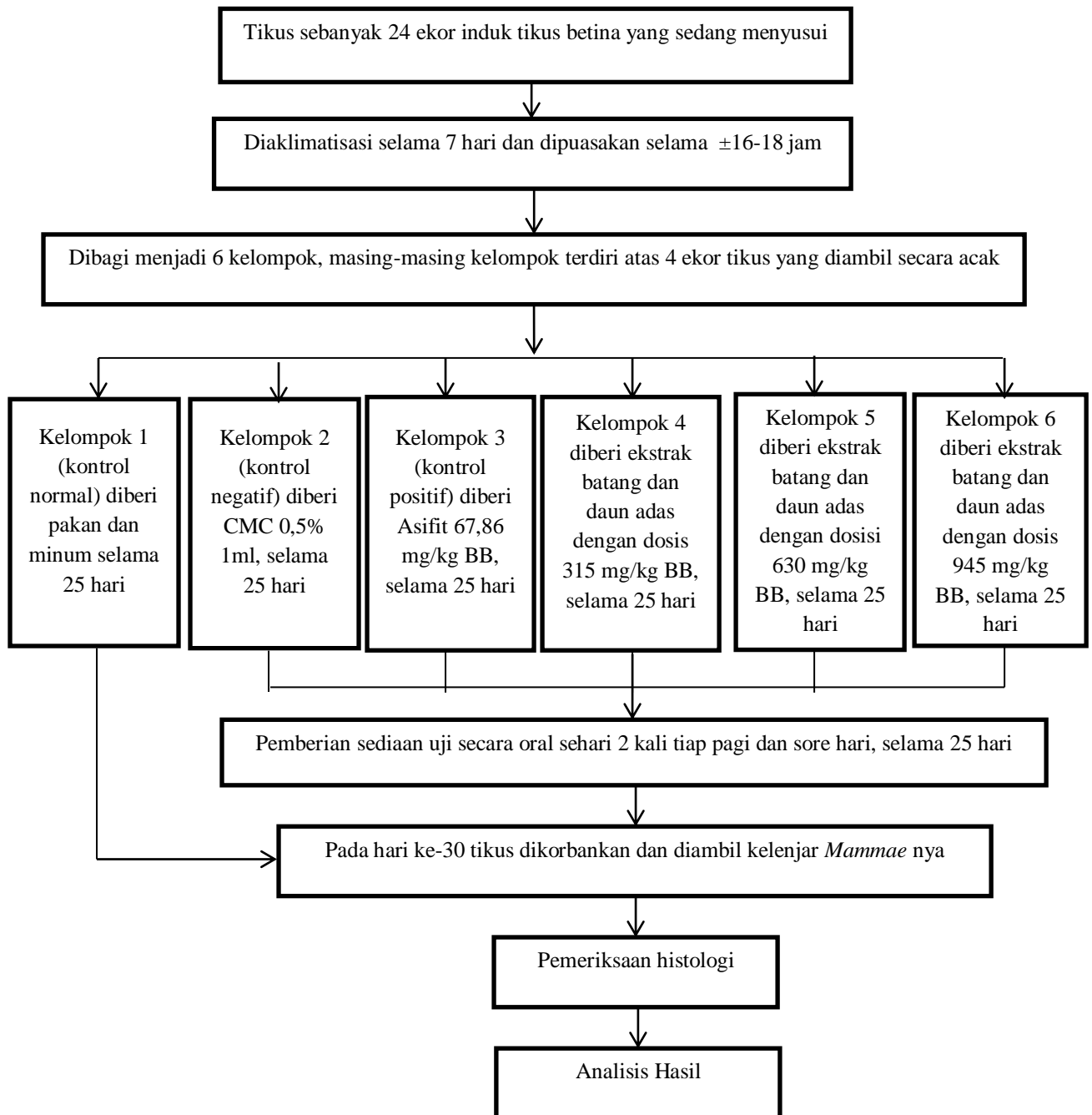
Pembacaan sampel dilakukan dengan menghitung jumlah dan mengukur diameter alveloinya menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Perhitungan jumlah alveoli rata-rata preparat dilakukan pengamatan dengan 5 lapang pandang mikroskop. Sedangkan untuk pengukuran diameter alveoli rata-rata dilakukan dengan bantuan mikroruler, pada masing-masing daerah pengamatan diamati 5 buah alveolus.



### **E. Analisis Hasil**

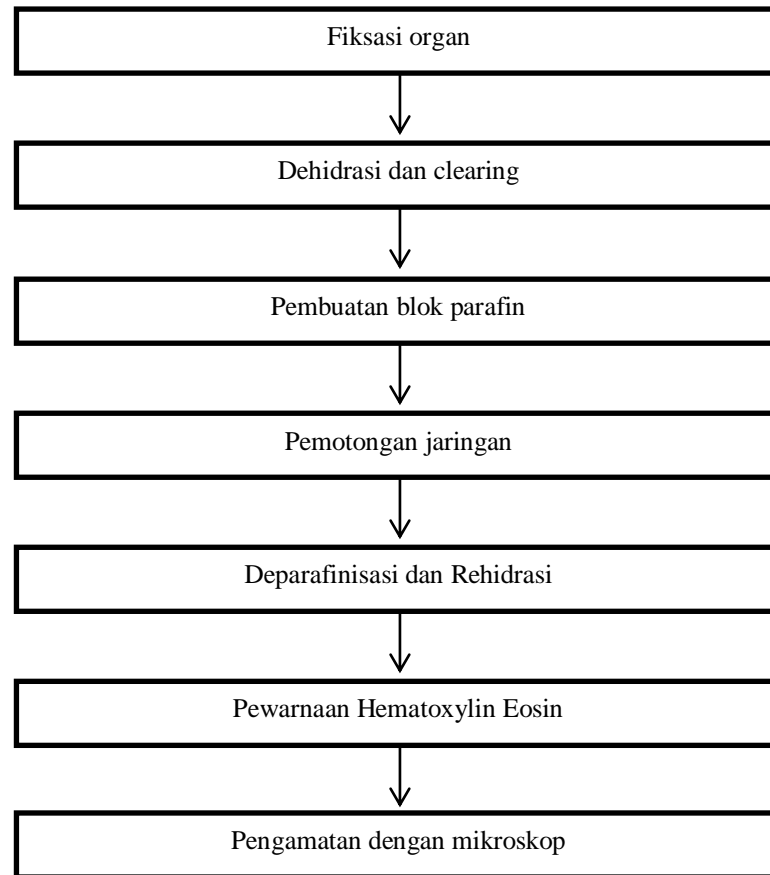
Data yang diperoleh dari penelitian ini berupa data kuantitatif hasil penelitian dinyatakan sebagai rata-rata (mean) ( $\pm$ ) standar deviasi (SD). Sedangkan data kualitatif diperoleh dari hasil gambaran histologi kelenjar *Mammae* dengan pewarnaan HE. Analisis data secara statistik, dilakukan dengan melihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji distribusi normal *Shapiro Wilk*. Jika data terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ), maka dilanjutkan dengan uji parametrik *one-way ANOVA*. Kemudian uji dilanjutkan dengan *Tukey Post Hoc Test* untuk melihat apakah terdapat perbedaan di antara masing-masing kelompok perlakuan. Jika tidak terdistribusi normal ( $p < 0,05$ ), maka dilanjutkan dengan uji non parametrik (kruskal-Wallis).

### F. Alur penelitian



Gambar 2. Alur Penelitian

### G. Alur pemeriksaan histologi



**Gambar 3. Alur Pemeriksaan Histologi**