

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

##### **1. Populasi**

Populasi adalah keseluruhan obyek dalam ruang lingkup penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi bawang putih yang didapatkan dari petani bawang putih di Tawangmangu.

##### **2. Sampel**

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bawang putih siap panen yang berasal dari petani bawang putih di wilayah Tawangmangu. Pengambilan sampel dilakukan pada bulan September 2019.

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

##### **1. Indikasi variabel utama**

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah maserat dan perkolat bawang putih (*Allium sativum*). Variabel utama kedua adalah variasi dosis maserat dan perkolat bawang putih (*Allium sativum*) pada mencit jantan galur *Swiss*. Variabel utama ketiga adalah selisih waktu lelah mencit. Variabel utama keempat adalah mencit jantan putih.

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

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yang meliputi variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali.

Variabel bebas merupakan variabel yang dengan sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi dosis dan metode ekstraksi bawang putih sebagai tonikum.

Variabel tergantung merupakan titik permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian dan akibat dari variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah aktivitas tonikum ekstrak umbi bawang putih.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang dianggap mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar memperoleh hasil yang tidak tersebar dan penelitian lain dapat mengulangi secara tepat. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah kondisi pengukur atau peneliti, kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, usia dan suhu.

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

Pertama, bawang putih adalah tanaman yang termasuk dalam marga *Allium* yaitu spesies (*Allium sativum*), berukuran sedang dan siap panen. Bawang putih diambil dari Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak bawang putih adalah bawang putih yang telah diekstraksi dengan menggunakan dua metode yang berbeda yaitu maserasi dan perkolasi.

Ketiga, dosis efektif adalah dosis atau konsentrasi obat yang menghasilkan respons terapeutik.

Keempat, tonikum adalah suatu bahan atau campuran bahan yang dapat memperkuat sistem fisiologi tubuh sebagaimana halnya olahraga yang dapat memperkuat otot yaitu dengan meningkatkan kelenturan alami dan sistem pertahanan tubuh.

Kelima, *nataatory exhaustion* adalah metode yang digunakan untuk mengungkapkan efek obat dalam koordinasi gerak. Metode ini dilakukan dengan merenangkan mencit di dalam air.

Keenam, waktu kelelahan adalah lamanya mencit mengalami kelelahan selama direnangkan dengan tanda hewan uji membiarkan kepalanya dibawah permukaan air dengan posisi kepala dan ekor vertikal selama lebih dari 7 detik, serta tidak menunjukkan gerak dari keempat kakinya, dan ekor menegang.

Ketujuh, hewan uji adalah mencit putih jantan galur *Swiss*, berusia 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram.

Kedelapan, maserasi adalah ekstraksi yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari.

Kesembilan, perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses

terdiri dari tahapan pengembangan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya terus-menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat).

### C. Bahan dan Alat

#### 1. Bahan

**1.1 Bahan sampel.** Bahan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bawang putih siap panen berukuran sedang, yang didapatkan dari petani bawang putih di Wilayah Tawangmangu, Jawa Tengah.

**1.2 Bahan kimia.** Bahan yang digunakan untuk kontrol negatif yaitu CMC 1 % dan kontrol positif yang digunakan yaitu kafein. Selain itu juga digunakan etanol 96%, asam klorida, magnesium, amil alkohol, akuades, fehling A, fehling B, reagen sudan III, asam asetat, *n*-butanol, kloroform, metanol, etil asetat, benzen, uap amonia, anisaldehyd-asam sulfat.

**1.3 Hewan uji.** Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan galur *Swiss* yang berusia 2-3 bulan dengan berat badan 20-30gram. Jumlah hewan uji dalam penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus Ferderer :

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan : n = besar kelompok perlakuan

t = jumlah hewan uji

#### 2. Alat

Alat dalam pembuatan ekstrak antara lain perkolator, botol maserasi. Untuk membuat larutan kafein menggunakan *beaker glass*, pipet volume, batang pengaduk, gelas ukur, timbangan elektrik. Alat untuk mengukur waktu lamanya mencit mengalami kelelahan yaitu *stopwatch* dan bak untuk pengujian tonikum. Untuk pemberian obat secara oral menggunakan sonde lambung. Alat-alat lain yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain : kandang mencit yang lengkap dengan tempat makan dan minumannya, timbangan mencit, spuit injeksi, jarum peroral, bak besar untuk uji tonikum.

## D. Jalannya Penelitian

Metode uji efek tonik berdasarkan metode *natatory exhaustion* merupakan metode skrining farmakologi yang dilakukan untuk mengetahui efek obat yang bekerja pada koordinasi gerak terutama penurunan kontrol saraf pusat. Uji ini dilakukan terhadap hewan uji dengan menggunakan sebuah bak yang berisi air dengan panjang 50 cm dan tinggi 25 cm, lebar dari kolam adalah 30 cm dan kedalaman air mencapai 18 cm, temperatur dari kolam tersebut diatur 20°C dan disertai dengan pemberian gelombang buatan yang dihasilkan dari pompa udara yang terpasang dalam bak uji.

### 1. Determinasi bawang putih

Pada tahap pertama penelitian ini adalah melakukan determinasi bawang putih dengan tujuan untuk memastikan identitasnya yang berkaitan dengan ciri-ciri mikroskopis, makroskopis, serta ciri-ciri morfologi pada bawang putih terhadap kepustakaan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

### 2. Pengambilan Bahan

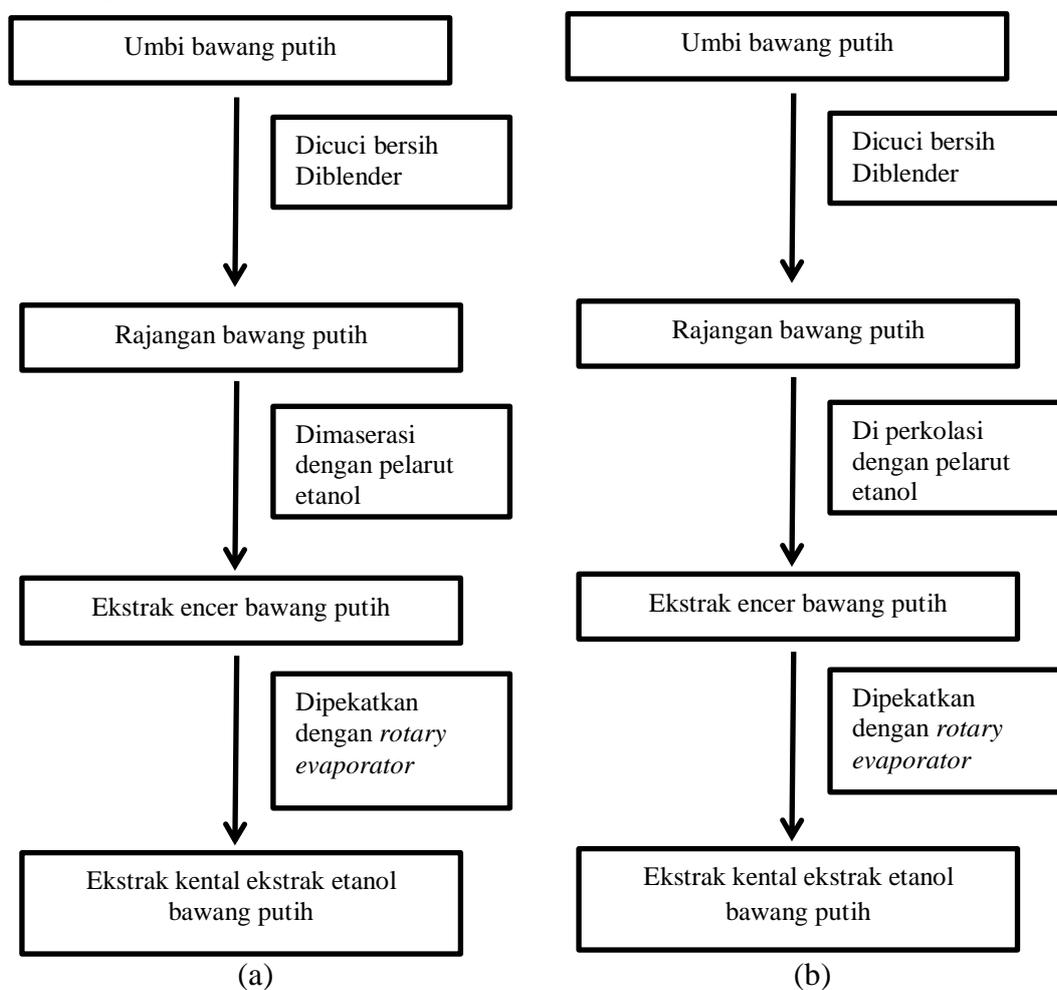
Pengambilan bahan bawang putih dilakukan secara acak (random) yang diperoleh dari Wilayah Tawangmangu, Jawa Tengah. Bawang putih diambil seluruh bagian umbinya, kemudian dicuci menggunakan air mengalir yang bersih, kemudian ditiriskan.

### 3. Pembuatan Ekstrak Etanol Bawang Putih (*Allium sativum*)

**3.1 Ekstrak secara maserasi.** Bawang putih dicuci bersih menggunakan air bersih, kemudian ditiriskan, ditimbang sebanyak 510 gram bawang putih, dihancurkan dengan menggunakan blender, kemudian dimasukkan ke dalam bejana, ditambahkan etanol 5100 mL kemudian ditutup dan didiamkan selama 18 jam terlindung dari cahaya sinar matahari sambil diaduk sebanyak 3 kali sehari, kemudian diperas sari yang didapatkan, sari ditampung, dipisahkan filtrat dengan ampasnya. Ampas ditambahkan 2600 mL etanol kemudian ditutup dan didiamkan selama 18 jam terlindung dari cahaya sinar matahari sambil diaduk sebanyak 3 kali sehari, kemudian diperas sari yang didapatkan, sari ditampung, dipisahkan filtrat dengan ampasnya. Filtrat dipekatkan dengan menggunakan evaporator

sampai didapatkan ekstrak kental. Kemudian ekstrak ditimbang sesuai dengan dosis yang diinginkan. Kemudian dilarutkan dengan CMC 1% (Depkes 1986).

**3.2 Ekstrak secara perkolasi.** Bawang putih dicuci bersih menggunakan air bersih, kemudian ditiriskan, ditimbang sebanyak 500 gram bawang putih, dihancurkan dengan menggunakan blender, kemudian dilakukan maserasi pendahuluan selama 4 jam dengan menambahkan etanol 250 mL kemudian ditutup dan diekstraksi dengan pelarut etanol 96% sampai bawang putih terekstraksi secara sempurna, sari ditampung, sari dipekatkan dengan menggunakan evaporator sampai didapatkan ekstrak kental. Kemudian ekstrak ditimbang sesuai dengan dosis yang diinginkan. Kemudian dilarutkan dengan CMC 1% (Depkes 1986).



**Gambar 2.** Pembuatan ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) dengan metode maserasi (a) dan metode perkolasi (b).

#### 4. Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Bawang Putih

Identifikasi kandungan kimia ekstrak umbi bawang putih dilakukan terhadap flavonoid, saponin, minyak atsiri, alkaloid, vitamin C, vitamin B6 dan zat besi. Identifikasi senyawa flavonoid, saponin, minyak atsiri, alkaloid, vitamin C, vitamin B6 dan zat besi dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

**4.1 Identifikasi flavonoid.** Ekstrak umbi bawang putih ditimbang sebanyak 0,5 gram dicampur 5 mL air panas, lalu ditambahkan 0,1 gram ekstrak Mg, 2mL alkohol : asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol. Campuran dikocok kuat-kuat kemudian, dibiarkan memisah. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya warna merah atau kuning jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes 1989).

**4.2 Identifikasi saponin.** Identifikasi saponin dilakukan dengan cara sampel dididihkan dengan air kemudian didinginkan lalu dikocok dan didiamkan beberapa menit. Reaksi positif mengandung saponin jika terbentuk busa yang stabil (Depkes 1989).

**4.3 Identifikasi alkaloid.** Identifikasi alkaloid dilakukan dengan cara maserat dan perkolat umbi bawang putih, kemudian ditambah 1 mL asam klorida 2N, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit. Kemudian ditambah dengan larutan Mayer. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning yang larut dalam metanol dan dengan Bouchardat terbentuk endapan coklat sampai hitam (Depkes 1986).

**4.4 Identifikasi triterpenoid.** Sebanyak 5 mL ekstrak yang sudah dibuat dalam bentuk filtrat, residu ditambahkan beberapa tetes pereaksi Liebermann-Burchard yang berisi anhidrida asetat dan asam sulfat pekat (2:1). Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah sampai ungu (Farnsworth 1966).

**4.5 Identifikasi minyak atsiri.** Identifikasi minyak atsiri dilakukan dengan menambahkan larutan NaCl jenuh, kemudian dikocok. Reaksi positif ditunjukkan dengan terjadinya pemisahan larutan (Depkes 1995).

**4.6 Identifikasi vitamin B6.** Identifikasi vitamin B6 dilakukan dengan menambahkan 2 mL larutan dengan 0,5 mL larutan  $\text{FeCl}_3$ . Reaksi positif mengandung vitamin B6 jika terbentuk warna jingga (Mardiana 2011).

**4.7 Identifikasi vitamin C.** Identifikasi vitamin C dilakukan dengan menambahkan sampel dengan larutan *metilen blue*, kemudian dihangatkan hingga suhu  $40^\circ \text{C}$ , terjadi warna biru tua dalam waktu 3 menit yang berubah menjadi lebih muda atau hilang (Aminah 2019).

**4.8 Identifikasi zat besi.** Identifikasi zat besi dilakukan dengan menambahkan sampel dengan larutan amonium sulfida. Reaksi positif jika terbentuk endapan hitam. Endapan larut dalam asam klorida encer dan membebaskan gas hidrogen sulfida (Juniarianto 1987).

## **5. Kadar Air**

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi toluen. Toluena yang digunakan dijenuhkan dengan air terlebih dahulu, setelah itu dikocok dan didiamkan, kedua lapisan air dan toluena akan memisah kemudian air dibuang. Menimbang secara seksama sejumlah bahan yang diperkirakan mengandung 1 ml sampai 4 ml air, kemudian dimasukkan pada labu alas bulat dimasukkan 200 ml toluena pada labu. Labu dipanaskan secara hati-hati selama 15 menit, setelah toluena mendidih atur penyulingan dengan kecepatan penyulingan kurang lebih 2 tetes/detik, hingga sebagian besar air tersuling. Kecepatan penyulingan ditingkatkan hingga kurang lebih 4 tetes/detik. Bagian pendingin pada alat dibilas dengan toluena jenuh air setelah semua air tersaring. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit, kemudian didinginkan tabung pada suhu ruang. Volume air dibaca setelah air dan toluena memisah secara sempurna.

## **6. Pembuatan Larutan Uji**

Larutan CMC 1% dibuat dengan cara melarutkan 1 gram CMC sedikit demi sedikit dalam akuades panas 100 mL sambil diaduk sampai larut. Larutan kafein dibuat dengan cara melarutkan 0,5 gram kafein kemudian disuspensikan dengan CMC 1% ad 100 ml. Larutan ekstrak bawang putih dibuat dengan cara menimbang 0,05 gram maserat dan perkolat kemudian disuspensikan dengan CMC 1% pada volume ad 100 mL sampai homogen.

## **7. Penetapan Dosis**

**7.1 Pembuatan larutan stok kafein.** Dalam uji efek tonikum ekstrak umbi bawang putih ini digunakan kafein sebagai kontrol positif. Dosis kafein yang digunakan adalah dosis moderate yaitu 0,1g/kgBB untuk pengujian efek tonikum pada hewan uji mencit (Turner 1965).

Pembuatan larutan stok berdasarkan pada volume pemberian sebesar 0,5 ml. Hal ini dikarenakan volume cairan maksimal yang dapat diberikan per oral pada mencit adalah 1 ml/20 gram BB mencit, disarankan takaran pemberian tidak melebihi setengah kali volume maksimalnya (Ngatidjan 1991).

Dari dosis tersebut untuk volume pemberian 0,5 mL /20 gram BB, diperoleh tiap 1 mL mengandung 4 mg kafein. Sehingga untuk membuat 10 mL larutan stok kafein dibuat dengan menimbang kafein sebanyak 40 mg, lalu dilarutkan dengan CMC 1% sampai larut, kemudian ditambahkan CMC 1% sampai 10 mL.

**7.2 Penentuan dosis ekstrak etanolik umbi bawang putih.** Penggunaan umbi bawang putih untuk pengobatan secara empiris adalah 8 gram bawang putih segar. Adapun konversi dosis pada manusia dengan berat 70 kg ke mencit 20 gram adalah 0,0026 (Laurence & Bacharach 1964). Penggunaan dosis umbi bawang putih segar sebagai antioksidan adalah 250mg/kg BB tikus. Adapun konversi dosis tikus ke mencit 20 gram adalah 0,14 (Laurence & Bacharach 1964). Pada penelitian ini, dosis yang digunakan adalah hasil dari orientasi dosis.

Hasil orientasi dosis, menunjukkan bahwa dosis 17,5mg/20 g BB mencit, memiliki beda makna dengan kontrol negatif. Sehingga pada penelitian ini digunakan dosis 8,75mg/20 g BB mencit dan 17,5mg/20 g BB mencit. Peringkat dosis yang dihitung dari dosis ekstrak umbi bawang putih yang didapat yaitu 8,75 mg maserat (DE), 17,5 mg maserat (2 DE), 8,75 mg perkolat (DE), 17,5 mg perkolat (2 DE). Dosis umbi bawang putih yang dapat digunakan sebagai tonikum belum diketahui, sehingga perlu dilakukan orientasi dosis berdasarkan dosis antioksidan bawang putih.

## 8. Perlakuan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan galur *Swiss webster* yang sehat. Berat badan hewan uji standar yaitu 20-30 gram. Usia sekitar 2-3 bulan. Hewan uji diadaptasi selama tujuh hari dalam ruangan kandang hewan uji Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi sebelum dilakukan pengujian efek tonikum.

Pengujian efek tonikum dilakukan pada hari ke-8 setelah aklimatisasi hewan uji. Sebelum hewan uji diberi perlakuan, hewan uji direnangkan terlebih dahulu dalam bak pengujian tonikum, hingga mencit kelelahan dan menenggelamkan kepalanya selama 7 detik disertai ekor mencit menegang dan tidak muncul pergerakan di keempat kaki mencit. Setelah hewan uji timbul kelelahan, diangkat dari bak pengujian dan dicatat waktu sebagai waktu lelah pertama ( $T_1$ ) dan mengistirahatkan mencit selama 30 menit. Hewan uji diberi perlakuan sesuai masing-masing kelompok uji setelah waktu yang diistirahatkan selesai dan diistirahatkan kembali selama 30 menit untuk digunakan sebagai waktu masuknya perlakuan ke dalam fisiologis mencit. Setelah 30 menit, mencit direnangkan kembali hingga timbul kelelahan dan mencatat waktu ( $T_2$ ). Kemudian selisih waktu lelah antara sebelum perlakuan ( $T_1$ ) dan sesudah perlakuan ( $T_2$ ), dicatat sebagai data kuantitatif untuk dianalisis.

Berikut ini adalah kelompok hewan uji dengan masing-masing perlakuan uji :

- |              |   |
|--------------|---|
| Kelompok I   | : kontrol positif (larutan kafein 2 gram/20 gram BB mencit)     |
| Kelompok II  | : kontrol negatif (larutan CMC 1%)                              |
| Kelompok III | : maserat umbi bawang putih dosis (8,75 mg/20 gram BB mencit)   |
| Kelompok IV  | : maserat umbi bawang putih dosis (17,5 mg/20 gram BB mencit)   |
| Kelompok V   | : perkolat umbi bawang putih dosis (8,75 mg /20 gram BB mencit) |
| Kelompok VI  | : perkolat umbi bawang putih dosis (17,5 mg/20 gram BB mencit)  |

### **E. Analisis Hasil**

Data dianalisis dengan *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* untuk mengetahui apakah terdistribusi normal atau tidak. Jika data terdistribusi normal, dengan nilai  $\text{sig} > 0,05$ , maka analisis data dilanjutkan dengan uji *One way ANOVA* untuk mengetahui homogenitas varian dari keenam kelompok tersebut. Analisis data menggunakan output program SPSS 21. Jika hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan hasil  $\text{sig} > 0,05$  maka antar kelompok perlakuan memiliki varian yang sama. Kemudian akan dilanjutkan dengan uji Tukey untuk mengetahui perbedaan yang nyata antar kelompok hewan uji setelah diberi perlakuan sesuai dengan masing-masing kelompok uji. Jika data tidak terdistribusi normal, dengan nilai  $\text{sig} < 0,05$ , maka analisis dilanjutkan dengan uji non parametrik.

### F. Skema Penelitian

