

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia kering daun gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) yang diperoleh dari Kota Palembang, Sumatera Selatan.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) yang berwarna coklat, kering, dan diambil secara acak.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Daun gambir merupakan variabel utama dalam penelitian ini. Variabel primer kedua dalam penelitian ini adalah ekstrak daun gambir. Variabel signifikan ketiga adalah waktu latensi. *Morris water maze* adalah variabel utama keempat.

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 dosis ekstrak daun gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.).

Variabel tergantung adalah variabel yang faktornya diamati dan diukur untuk menentukan pengaruh yang disebabkan oleh variabel bebas dimana variabel tergantung dari penelitian ini adalah peningkatan daya ingat pada mencit putih dan waktu latensi uji *Morris water maze*.

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 terkontrol dalam penelitian ini adalah waktu panen, waktu pangan, waktu aklitipasi kondisi hewan dan kandang, ketepatan dosis, kebenaran pembuatan simplisia dan ekstrak.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) dalam kondisi kering dan tidak rusak yang diperoleh dari daerah Kabupaten Lima Puluh Kota, Sumatera Barat.

Kedua, ekstrak daun gambir adalah ekstrak yang dibuat berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia dari penarikan sari daun gambir dengan cara merebus langsung menggunakan air, hasil rebusan tersebut disaring dan peras endapan yang diperoleh hingga masa berbentuk pasta kekuningan.

Ketiga, mencit putih (*Mus musculus*) adalah mencit putih jantan yang berumur 6-8 minggu dengan berat badan 16-29 gram.

Keempat, bahan penginduksi adalah etanol 10% yang diperoleh dari pengenceran etanol 96% dan diberikan secara oral pada mencit.

Kelima, dosis efektif adalah dosis terkecil yang dapat memberikan efek terhadap peningkatan daya ingat, yang setara dengan kontrol positif.

Keenam, uji *Morris Water Maze* adalah uji yang dilakukan pada mencit untuk mengamati waktu yang dibutuhkan mencit berenang mencapai *platform* dengan parameter waktu latensi.

Ketujuh, waktu latensi adalah lama waktu yang dibutuhkan mencit untuk berpindah dari kuadran awal menuju platform di kuadran sasaran.

Kedelapan, efek peningkatan daya ingat adalah efek dari ekstrak daun gambir dengan melihat peningkatan kecepatan renang untuk mencapai platform setelah dibandingkan dengan kontrol positifnya.

Kesembilan, uji histopatologi adalah dengan mengamati jumlah sel hipokampus yang mengalami perbaikan setelah pemberian ekstrak daun gambir.

C. Bahan dan Alat, dan Hewan Percobaan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah panci *stainless steel*, kain flanel, blender, corong glass, kertas saring, alat penimbang digunakan timbangan listrik AEG-120 *Shimidzu*, alat uji *Morris water maze*, kandang mencit lengkap dengan makanan dan minum, *stopwatch*, *hair dryer*, kain handuk.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) diperoleh dari daerah Kabupaten Lima Puluh Kota, Sumatera Barat.

3. Hewan percobaan

Hewan uji yang digunakan adalah mencit putih (*Mus musculus*) yang berumur 6-8 minggu. Pengelompokkan dilakukan secara acak

terdiri dari 3 kelompok uji yaitu, kelompok kontrol positif, kontrol negatif, dan kelompok perlakuan ekstrak.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahapan pertama determinasi ini adalah menetapkan kebenaran tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) dengan melakukan identifikasi tanaman. Identifikasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman gambir dan dibuktikan oleh Laboraturium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional. Tahapan kedua dilakukan identifikasi makroskopis dan mikroskopis terhadap serbuk daun gambir. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati organoleptis dan tekstur simplisia. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan membuat preparat dari serbuk kering simplisia yang selanjutnya diamati di bawah mikroskop yang dilakukan di Laboraturium Anatomi Patofisiologi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengambilan bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun gambir yang diperoleh dari Kabupaten Lima Puluh Kota, Sumatera Barat. Daun gambir yang digunakan adalah simplisia kering yang kemudian pilih yang memiliki kualitas paling baik misalnya terhindar dari hama, dan bebas dari bahan kimia.

3. Pembuatan serbuk simplisia

Pembuatan serbuk bertujuan agar luas partikel bahan yang kontak dengan larutan penyari dapat diperluas sampai penyarian berlangsung secara efektif. Setelah daun gambir yang telah kering, digiling dengan mesin giling dan kemudian dihaluskan dengan diblender. Setelah itu, daun gambir diayak dengan ayakan nomor 40.

4. Pemeriksaan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun gambir

Susut pengeringan adalah pengurangan berat bahan setelah dikeringkan. Hal ini untuk menghilangkan kadar air yang masih berada pada serbuk simplisia daun gambir. Sebelum melakukan susut pengeringan, menimbang secara seksama serbuk dan ekstrak daun gambir sebanyak 2 gram. Kemudian diletakkan ke dalam moisture balance dengan suhu 105⁰C hingga bobot konstan dilakukan sebanyak

3 kali percobaan. Serbuk memenuhi syarat apabila didapatkan susut pengeringan dengan kadar tidak lebih dari 10% (Kemenkes RI 2013).

5. Pemeriksaan kadar air serbuk daun gambir

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara menimbang 20 gram serbuk kering gambir kemudian dimasukkan kedalam labu alas bulat pada alat Sterling Bidwell kemudian ditambahkan xylen sebanyak 100 ml dan dipanaskan sampai tidak ada tetesan air lagi. Kemudian dilihat volume tetesan tadi dan dihitung kadarnya dalam satuan persen (Depkes 2008). Penetapan kadar air ekstrak dengan cara :

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume air (ml)}}{\text{Berat sampel (g)}} \times 100\%$$

6. Pemeriksaan kadar abu total

Penentuan kadar abu total dilakukan dengan cara menimbang dengan seksama 2 g sampai 3 g sampel yang telah dihaluskan dan dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditaratakan. Memijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan dan timbang. Jika cara ini arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas, aduk, saring melalui kertas saring bebas abu. Pijarkan sisa kertas beserta sisa penyaringan dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan, dan pijarkan hingga bobot tetap, timbang. Hitung kadar abu terhadap berat bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes 2008). Penetapan kadar abu dengan cara :

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{Berat abu}}{\text{Berat ekstrak}} \times 100\%$$

7. Pembuatan ekstrak daun gambir

Pada pembuatan ekstrak daun gambir, dilakukan proses merebus langsung menggunakan air. Daun gambir dimasukkan satu bagian daun kedalam wadah nirkarat (*stainless steel*), dan ditambahkan 5 bagian air, rebus selama 1 jam dihitung setelah mendidih sambil sesekali diaduk. Saring air rebusan dan peras ampas daun. Tampung hasil perasan dan gabungkan dengan air rebusan, endapkan selama 2 x 24 jam. Saring dan peras endapan yang diperoleh hingga masa berbentuk pasta kekuningan (FHI, 2017).

8. Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun gambir

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk memastikan kebenaran zat kimia yang terkandung di dalam daun gambir. Identifikasi dilakukan terhadap senyawa golongan alkaloid, triterpenoid, steroid, saponin, fenolik dan flavonoid.

8.1. Identifikasi alkaloid. Ekstrak diencerkan dengan air kemudian ditambahkan 1 ml HCl 2N, setelah itu dipanaskan selama 2 menit diatas penangas air kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat dipipet dan dimasukkan kedalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 3 tetes. Tabung pertama ditambahkan pereaksi Mayer dan tabung kedua ditambah pereaksi Bouchardat. Reaksi positif ditunjukkan apabila tabung pertama terdapat endapan putih yang menggumpal, sedangkan tabung kedua terbentuk endapan coklat (Adeanne *et al* 2012).

8.2. Identifikasi tanin. Sebanyak 0,1 gram dilakukan ekstraksi dengan 20 ml etanol 70%. Larutan yang dihasilkan diambil sebanyak 1 ml kemudian tambahkan 2 tetes larutan FeCl₃. Reaksi positif adanya fenol ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kebiruan, sedangkan hasil positif adanya tanin ditunjukkan oleh terbentuknya warna hijau kehitaman (Harborne 1987).

8.3. Identifikasi saponin. Ekstrak dilarutkan dalam metanol kemudian 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 (Djamil dan Anelia 2009).

8.4. Identifikasi flavonoid. Pada identifikasi flavonoid dilakukan dua uji yaitu uji tabung dan KLT. Pada uji tabung, ekstrak dimasukkan ke dalam beaker glass dan ditambahkan air panas, kemudian disaring. Filtrat dituang ke dalam tabung reaksi yang berisi butiran logam Mg, 1 ml larutan HCl 2N dan 5 ml amil alkohol dikocok kuat-kuat, warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Djamil dan Anelia 2009). Pada uji dengan KLT, ekstrak metanol daun gambir dan perbandingan (rutin) dilarutkan dengan methanol, ditotolkan bersama-sama pada lempeng KLT dengan fase diam silica gel dan fase gerak n-Butanol:Asam Asetat:Air(4:1:5). Bercak yang dihasilkan diamati dengan penampak noda sinar ultraviolet 254 nm dan 366 nm dan disemprot dengan sitroborat (Haeria dan Andi, 2016).

9. Penentuan dosis

9.1. Ekstrak daun gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.). Dosis pada penelitian sebelumnya Xian et al. 2011 ekstrak etanol cacar

kucing 200; 400 mg/kg bb mencit, pada penelitian ini digunakan dosis 500 mg/kgBB mencit.

9.2. Dosis ginkgo biloba. Kapsul *Ginkgo Biloba* memiliki bobot 200 mg mengandung ekstrak ginkgo biloba 75 mg/70 kg BB manusia. Hasil perhitungan dosis *Ginkgo Biloba*. (Lampiran 14).

10. Pembuatan larutan Na-CMC 1%

Na-CMC ditimbang sebanyak 1 gram lalu melarutkannya dengan air panas sedikit demi sedikit hingga larut lalu menambahkan *aquadest* hingga volume 100 ml (Kurniawati 2013). Larutan Na-CMC 1% yang diperoleh digunakan sebagai larutan pembawa.

11. Pembuatan etanol 10%

Etanol yang digunakan adalah etanol 10% yang dibuat dari pengenceran etanol 96% dilarutkan dalam *aquadest*. Volume etanol 96% yang diambil adalah 10,42 ml kemudian menambahkan *aquadest* sampai 100 ml. Volume pemberian etanol yang diinduksi pada hewan uji yaitu 0,2 ml/20 gram BB mencit. Etanol yang digunakan sebagai larutan penginduksi kerusakan otak (Narwanto et al. 2007)

12. Pengelompokan hewan uji

Pada metode penelitian menggunakan metode *Morris water maze*. Sebelum dilakukan percobaan mencit terlebih dahulu diaklimasi selama 1 minggu disesuaikan dengan kondisi bobot yang diharapkan dan penyesuaian wadah hewan uji kemudian ditimbang berat badannya. Pada penelitian ini digunakan mencit sebanyak 25 ekor dengan 3 kelompok uji, dengan kelompok uji I dan II masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit, sedangkan kelompok III 15 ekor mencit.

Kelompok I yaitu kontrol positif *Glingko biloba* 0,195 mg/20 grBB

Kelompok II yaitu kontrol negatif Na CMC 1%

Kelompok III yaitu ekstrak daun gambir (500 mg/kg BB Mencit)

13. Prosedur uji aktivitas daya ingat

Prosedur uji daya ingat menggunakan hewan coba mencit, karena itu perlu dilakukan pengkonversian dosis dari manusia ke mencit. Volume larutan stok yang diberikan pada mencit berbeda-beda, tergantung dari berat badan masing-masing mencit.

Metode *Morris water maze* dalam penelitian ini dilakukan sesuai dengan metode yang dilakukan dengan 2 tahapan pengujian yang telah dimodifikasi yaitu tahap dasar dan *acquisition trial*. Hewan uji setelah mengalami penyesuaian dengan lingkungan dan kondisi sekitar serta penyesuaian dengan metode *Morris water maze* hewan uji

diinduksi dengan larutan etanol 10% secara oral kemudian dilakukan pengujian. Hewan uji dibagi menjadi 5 kelompok, setiap kelompok masing-masing 5 ekor (Vorhees dan Williams 2006).

13.1. Tahap dasar. Selama lima hari dilakukan adaptasi hewan uji agar dapat menyesuaikan bobot hewan uji sesuai dengan bobot yang diinginkan dan menyesuaikannya dengan lingkungan tempat tinggalnya (Alvin dan Terry 2009).

13.2. *Acquisition trial*. Selama lima hari merenangkan mencit sebanyak dua kali dalam sehari, waktu dicatat sebagai T_0 . Selama 10 hari mencit diberi perlakuan dengan menginduksi etanol 10% dan merenangkannya sebanyak dua kali dalam sehari, waktu tempuh mencit untuk menemukan dan mencapai *platform* dicatat sebagai T_1 . Setelah *acquisition trial* hewan uji diberi perlakuan selama 14 hari untuk pemberian kontrol positif *Ginkgo biloba* L pada kelompok I, kontrol negatif Na-CMC 1% pada kelompok II, ekstrak daun gambir pada kelompok III (dosis 500 mg/kgBB). Selama 14 hari mencit direnangkan sebanyak dua kali dalam sehari. Perlakuan pada hari ke-14 waktu dicatat sebagai T_2 . Pengorbanan hewan dilakukan pada hari ke-15 yaitu setelah hari terakhir pemberian perlakuan (Alvin dan Terry 2009).

14. Uji histopatologi

Sehari setelah dilakukan induksi ekstrak pada masing-masing mencit, dilakukan pengambilan organ otak untuk selanjutnya dibuat preparat histopatologinya. Pengambilan organ diawali dengan menganestesi, mencit dibedah, dan diambil organ otaknya kemudian dilanjutkan dengan pembuatan preparat histopatologi dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) untuk pengamatan peningkatan jumlah sel hipokampus secara mikroskopis (Muntiha 2001). Pembuatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Kedokteran Universitas Sebelas Maret. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 \times , dibuat 2 replikasi, dan diamati lapang pandangnya dengan tujuan untuk melihat ada tidaknya sel piramidal pada otak mencit. Pengamatan mikroskopis dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Sebelas Maret.

14.1. Persiapan awal pengambilan sampel. Sampel diambil dalam keadaan segar atau segera diambil setelah hewan mati, lalu jaringannya difiksasi. Jaringan direndam dalam zat-zat kimia pengawet seperti *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10% dengan perbandingan

1:10 antara organ dan larutan serta pH antara 6,5-7,5 dengan pH ideal adalah 7. Lakukan deklasifikasi menggunakan campuran antara asam format sebanyak 160 ml dengan formalin teknis sebanyak 100 ml lalu ditambah 1.740 ml atau dengan perbandingan 1:20 antara jaringan dan larutan serta waktu perendaman selama 24 jam (Muntiha 2001).

14.2. Pembuatan preparat histopatologi. Proses pembuatan preparat hispatologi dimulai dari memotong jaringan organ yaitu jaringan organ yang dalam larutan fiksatif matang lalu meniriskan pada saringan selanjutnya, potong menggunakan pisau *scapel* dengan ketebalan 0,3-0,5 mm lalu susun ke dalam *tissue cassette* dan masukkan ke dalam keranjang khusus (basket) / botol bening.

14.3. Proses dehidrasi. Masuk ke proses dehidrasi botol bening yang di dalamnya terdapat jaringan organ dimasukkan dalam mesin *processor* otomatis. Jaringan mengalami proses dehidrasi bertahap dengan putaran waktu : ethanol 70% (2 jam), ethanol 80% (2 jam), etanol 90% (2 jam), etanol absolut (2 jam), etanol absolut (2 jam), xylol (2 jam), xylol (2 jam), parafin cair (2 jam), parafin cair (2 jam). Botol yang berisi *tissue cassette* dikeluarkan untuk dilakukan proses berikutnya.

14.4. Vakum. Penghilangan udara dari jaringan dilakukan dengan menggunakan mesin vakum yang di dalamnya terdapat tabung untuk menyimpan botol bening yang diisi parafin cair dengan temperatur (59-60⁰C) di vakum selama 30 menit. Botol bening diangkat, lalu mengeluarkan *tissue cassette* dan menyimpannya pada temperatur 60⁰C untuk sementara waktu sebelum pencetakan dilakukan dengan parafin cair.

14.5. Mencetak blok parafin. Cetakan dari bahan *stainles steel* dihangatkan di atas api bunsen, lalu memasukkan jaringan ke dalam tiap cetakan sambil mengatur dan sedikit menekan. Sementara menunggu sembari menyiapkan parafin cair dalam tempat khusus, sehingga mencapai suhu 60⁰C. Parafin dibiarkan membeku di atas mesin pendingin. Selanjutnya blok parafin dilepas dari cetakan dan disimpan di *freezer* (-20⁰C) sebelum dilakukan pemotongan.

14.6. Memotong blok jaringan. Blok parafin yang di dalamnya terdapat jaringan dipotong dengan menggunakan mesin mikrotom dengan ketebalan 3-4 μ m. Potongan tersebut diletakan hati-hati di atas permukaan air dalam waterbath bersuhu 46⁰C. Buat irisan yang dirapikan dan letakkan di atas kaca obyek yang telah diolesi

ewith, yang berfungsi sebagai pelekat. Kaca obyek dengan jaringan di atasnya disusun di dalam rak khusus dan masukkan dalam inkubator bersuhu 60°C sampai preparat siap untuk diwarnai.

14.7. Pembuatan larutan hematoksilin untuk pewarnaan.

Timbang serbuk hematoksilin 1 gram, potasium alumunium sulfat sebanyak 50 gram dan sodium iodate (NaIO₃) sebanyak 0,2 gram lalu larutkan dalam 1 liter akuades menggunakan alat pengaduk (*stirer*) dengan sedikit panaskan lalu disimpan selama satu malam dengan temperatur ruangan. Keesokkan harinya tambahkan larutan tersebut dengan asam sitrat (C₆H₈O₇) sebanyak 50 gram dan chloral hydrate (C₂H₃Cl₃O₂) sebanyak 50 gram. Panaskan larutan dan mengaduknya selama 5 menit, kemudian mendinginkan dan menyaringnya.

14.8. Pembuatan larutan eosin untuk pewarnaan.

Menimbang serbukeosin Y sebanyak 7,5 gram, erythrosin sebanyak 7,5 gram dan calcium chlorida sebanyak 2,5 gram lalu melarutkannya dalam akuades 1 liter kemudian menyaringnya.

14.9. Pembuatan larutan pembiru untuk pewarnaan.

Lithium carbonat sebanyak 1,5 gram dilarutkan dengan akuades 1 liter dan diaduk hingga homogen.

14.10. Proses perwarnaan hematoksilin dan eosin.

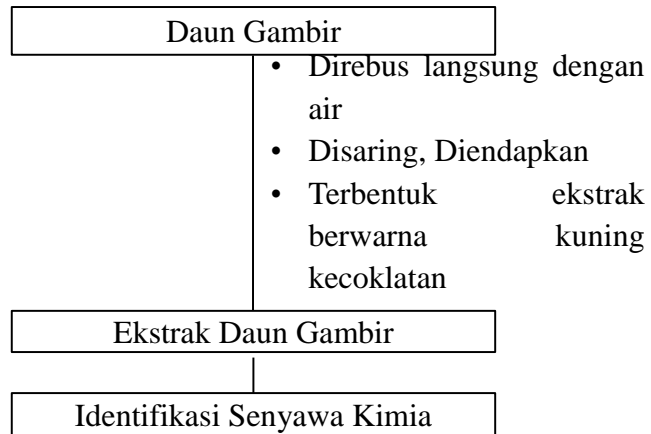
Letakkan preparat yang akan diwarnai pada rak khusus dan celupkan preparat tersebut secara berurutan ke dalam larutan dengan waktu berikut: xylol (3 menit), xylol (3 menit), ethanol absolute (3 menit), ethanol absolute (3 menit), ethanol 90% (3 menit), ethanol 80% (3 menit), bilas dengan air keran (1 menit), larutan hematoksilin (6-7 menit), bilas dengan air keran (1 menit), larutan pembiru (1 menit), air keran (1 menit), larutan eosin (1-5 menit), bilas dengan air keran (1 menit), ethanol 80% (10 celupan), ethanol 90% (10 celupan), ethanol absolute (10 celupan), ethanol absolute (1 menit), xylol (3 menit), xylol (3 menit), xylol (3 menit). Setelah itu angkat preparat satu persatu dari larutan xylol dalam keadaan basah, lalu berikan satu tetes cairan perekat (DPX) dan selanjutnya tutup dengan kaca penutup. Hasil pewarnaan dapat dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000×.

15. Analitik statistik

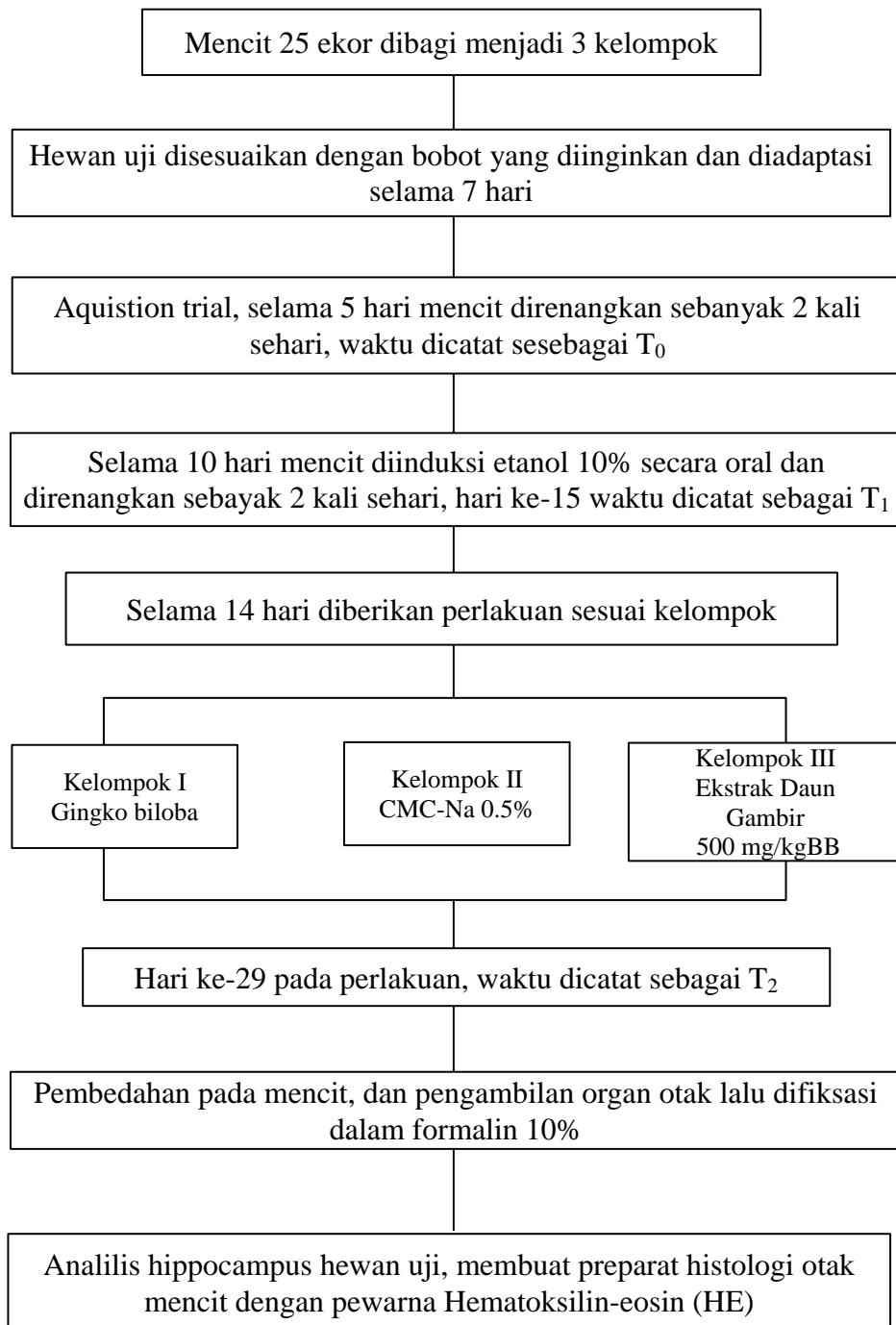
Analisis data yang akan digunakan pada penelitian uji daya ingat melalui metode *Morris water maze* ini menggunakan analisis Shapiro wilk untuk menguji normalitas data dan dilanjutkan uji hipotesis *one-way* ANOVA untuk menganalisis persentase waktu

pengujian aktivitas yang akan dibandingkan antar kelompok. Lalu untuk mengetahui adanya perbedaan nyata antara kelompok uji maka dilanjutkan dengan uji *Tukey Post Hoc Test* dianalisis menggunakan analisis *Tukey HSD*. Data tidak homogen dianalisis menggunakan uji non parametrik *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.

E. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak daun gambir



Gambar 4. Skema pengujian kelompok perlakuan.