

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah cabe jawa yang didapat dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah dan madu randu yang didapat dari daerah Sukoharjo, Jawa Tengah bermerk dagang Sari Sekar.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah cabe jawa segar yang akan dikeringkan dan madu murni.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama memuat identifikasi dari semua sampel yang diteliti.

Variabel utama yang pertama pada riset ini ialah kombinasi ekstrak etanol cabe jawa dan madu randu sebagai tonikum.

Variabel utama yang kedua pada riset ini ialah mencit jantan galur *Swiss Webster* dengan metode *Natatory Exhaustion* dan gelantung.

Variabel utama ketiga pada riset ini ialah variasi dosis ekstrak etanol cabe jawa dan madu.

Variabel utama keempat pada riset ini ialah efek tonikum terhadap mencit jantan galur *Swiss Webster*.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diidentifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali. Variabel bebas adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak etanol cabe jawa dan madu.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian yang dilakukan. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek tonikum kombinasi dari larutan ekstrak etanol cabe jawa dan larutan madu pada hewan uji, yang meliputi selisih waktu lelah mencit antara sebelum diberi perlakuan dengan setelah diberi perlakuan.

Variabel terkendali adalah variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel bebas. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah jenis kelamin, berat badan, lingkungan hidup, kondisi kandang, kondisi

peneliti, kondisi laboratorium, kondisi alat-alat yang akan digunakan, dan prosedur pembuatan ekstrak etanol cabe jawa dan madu.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, sampel cabe jawa adalah cabe jawa segar yang didapat dari petani tanaman herbal di daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, yang setelah itu akan dikeringkan melalui penelitian ini. Madu randu yang didapat adalah dari peternak lebah di daerah Sukoharjo, Jawa Tengah dengan merk dagang Sari Sekar.

Kedua, ekstrak etanol cabe jawa adalah cabe jawa kering yang diserbuk menggunakan blender dan di ayak dengan ayakan mesh 40, 1000 gram serbuk ditambahkan 10 L etanol 95%, kemudian didiamkan dalam botol gelap selama 24 jam dan diaduk sesekali, dan diremaserasi menggunakan 5 L etanol 95% selama 24 jam lalu disaring dan dikentalkan menggunakan *rotary evaporator*.

Ketiga, efek aditif adalah interaksi antara dua bahan yang apabila diberikan secara bersamaan dapat memberikan efek saling mendukung dan ditandai dengan hasil yang sebanding dengan pembandingnya, ekstrak buah cabe jawa dan madu randu dapat meningkatkan stamina dengan senyawa alkaloid yang bekerja pada reseptor yang sama dan menghasilkan efek aditif yang saling mendukung.

Keempat, dosis efektif adalah dosis ekstrak cabe jawa (0,026 g/kgBB) dan madu (0,8 g/kgBB) yang menghasilkan efek tonik sebanding dengan kontrol positif kafein (100 mg/kgBB) yang disuspensikan dalam CMC Na 0,5% sebagai kontrol negatif.

Kelima, dosis kombinasi adalah perbandingan dosis antara ekstrak cabe jawa dan madu randu yang didapat dari persentase dosis tunggalnya, tiga variasi perbandingan dosis antara ekstrak cabe jawa dan madu randu yaitu 25% : 75%, 50% : 50%, 75% : 25%

Keenam, tikus jantan galur Swiss Webster, berumur dua hingga tiga bulan, dalam kondisi sehat sempurna, dengan berat sekitar 20 gram, akan menjadi subjek uji dalam penelitian ini.

Ketujuh, waktu lelah adalah waktu yang ditandai dengan kepala mencit yang berada di bawah permukaan air selama 7 detik. Waktu lelah sebelum diberi perlakuan adalah dimana mencit belum diberikan perlakuan oral apapun. Waktu lelah sesudah diberi perlakuan adalah dimana mencit sudah diberikan perlakuan kombinasi ekstrak etanol cabe jawa dan madu.

Kedelapan, % *Immobility time* adalah waktu yang dihabiskan untuk mencit tidak bergerak atau badan, kaki dan tangan dalam keadaan diam. Efek tonikum yang kuat ditandai dengan semakin tingginya nilai % *Immobility time*.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan yang dipergunakan pada riset ini meliputi oven, blender, ayakan mesh no.40, timbangan analitik, alat *moisture balance*, botol kaca gelap, kertas saring, corong, kain flanel, batang pengaduk, *rotary evaporator*, *beaker glass*, tabung reaksi, gelas ukur, cawan penguap, *waterbath*, krus, aquarium berukuran, 50 x 25 x 30 cm, *stopwatch*, spuit ujung tumpul, handuk pengering, kawat, dan kandang mencit.

2. Bahan

2.1 Sediaan Uji. Sampel dipergunakan ialah buah cabe jawa kering yang didapat dari petani tanaman herbal di Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar dan madu randu yang didapat dari peternak lebah di daerah Sukoharjo, Jawa Tengah.

2.2 Hewan Uji. Hewan uji pada riset ini ialah mencit jantan galur Swiss Webster berumur 2-3 bulan, dengan berat badan ± 20 gram dan dalam keadaan sehat tidak cacat, diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi.

2.3 Sediaan Kimia. Sediaan kimia yang dipergunakan pada riset ini meliputi kafein, aquadest, CMC-Na, etanol 95%, *chloroform*, amoniak, H_2SO_4 2N, serbuk magnesium, HCL pekat, amil alkohol, etanol 70%, $CHCl_3$, pereaksi *Lieberman-Burchard*, $FeCl_3$, pereaksi *dragendorf*, pereaksi meyer, pereaksi wagner, n-Heksana, P-diklorometan, P-etil aetat.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengajuan *Ethical Clearance* (EC)

Sebelum dilakukan penelitian, langkah awal yang harus dijalani oleh seorang peneliti adalah mengajukan perizinan *Ethical Clearance* (EC), dimana *Ethical Clearance* atau kelayakan etik adalah keterangan tertulis yang diberikan oleh Komisi Etik Penelitian untuk menyatakan suatu riset yang melibatkan makhluk hidup layak untuk dilakukan.

Pengurusan *Ethical Clearance* (EC) akan dilakukan di RSUD dr.Moewardi, Solo.

2. Determinasi Tanaman

Tahap awal penelitian ini meliputi melakukan penentuan tanaman untuk memastikan keakuratan sampel tanaman mengenai ciri-ciri mikroskopis dan atribut morfologi tanaman yang dilaporkan dalam literatur. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium UPT Herbal Materia Medica Batu, Jawa Timur.

3. Pengumpulan Bahan

Sampel cabe jawa diperoleh dalam keadaan segar dari daerah Tawangmangu, Karanganyar dan sampel madu yang digunakan adalah madu randu yang diperoleh dari daerah Sukoharjo, Jawa Tengah dengan merk dagang Sari Sekar.

4. Pembuatan Serbuk Simplisia

Serbuk simplisia buah cabe jawa (*P. retrofractum* Vahl.) dibuat dari sekitar ± 1 kg buah utuh, dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 45°C. Kemudian proses pembuatan serbuk simplisia dengan cara diblender tanpa menyebabkan kerusakan atau kehilangan kandungan kimia yang dibutuhkan dan diayak dengan menggunakan ayakan mesh no 40 (Istiqomah, 2017).

5. Pengujian Susut Pengerinan Serbuk Simplisia

Pengujian susut pengerinan dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance* pada suhu 105°C. Alat yang akan digunakan dikalibrasi terlebih dahulu dan menara alat yang digunakan dengan akurasi sesuai dengan jumlah serbuk yang diujikan. Serbuk buah cabe jawa yang akan digunakan ditimbang terlebih dahulu sebanyak 2 gram, dimasukkan ke dalam alat plat dan ditunggu 4-5 menit sampai hasilnya keluar untuk setiap pengukuran. Hasil pengukuran berupa dalam persen yang terdapat pada layar dicatat, penetapan susut pengerinan dilakukan sebanyak 3 kali dan mencari rata-rata dari ketiga hasil. Hasil penetapan susut pengerinan yang baik tidak lebih dari 10% (DepKes RI, 2008).

6. Pembuatan Ekstrak

Metode ekstraksi yang digunakan yaitu metode maserasi dengan perbandingan (1:10). Sebanyak 1000 gram serbuk buah cabe jawa dimasukkan ke dalam wadah maserasi, lalu ditambah 10 L etanol 95% hingga terendam sempurna, lalu dibiarkan selama 6 jam sambil sesekali diaduk, lalu lanjut didiamkan selama 18 jam, maserat yang diperoleh kemudian disaring dan disimpan ditempat yang tidak terkena sinar

matahari langsung. Kemudian dilakukan remaserasi dengan menambahkan 5 L etanol 95%, lalu dibiarkan selama 6 jam sambil sesekali diaduk, lalu didiamkan selama 18 jam. Filtrat yang diperoleh kemudian kemudian diuapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah dapat juga menggunakan “*rotavapor*” hingga diperoleh ekstrak kental.

7. Uji Organoleptik Ekstrak Cabe Jawa dan Madu

Uji organoleptik merupakan pengenalan awal sederhana seobjektif mungkin. Uji organoleptik dilakukan dengan pengamatan terhadap bentuk, warna, bau, dan rasa (Depkes RI, 2000)

8. Pengujian Kadar Air Ekstrak Cabe Jawa dan Madu

Pengujian kadar air ekstrak/madu menggunakan metode gravimetri yaitu dengan menimbang 10 gram ekstrak/madu kemudian dimasukkan ke dalam krus yang telah ditara. Keringkan pada suhu 105°C selama 5 jam, dan ditimbang. lanjutkan proses pengeringan dan timbang pada selang waktu 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% atau 0,5 mg (DepKes RI, 2008).

9. Uji Kandungan Fitokimia Ekstrak Cabe Jawa

9.1 Identifikasi Alkaloid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dengan air panas dan disaring lalu dimasukan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 ml HCL 2N dan dipanaskan pada penangas air, tunggu hingga dingin kemudian disaring dan filtrat ditambahkan dengan reagen Mayer maka jika positif mengandung alkaloid maka akan terbentuk endapan warna putih atau kuning, tambahkan reagen Wagner maka akan terbentuk endapan warna coklat sampai hitam, tambahkan pereaksi dragendorff akan terbentuk endapan jingga coklat (Fransworth, 1966 dalam Atikah, 2013).

9.2 Identifikasi Flavonoid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dengan air panas dan disaring lalu dimasukan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,2 mg serbuk magnesium kemudian ditambahkan HCL pekat sebanyak 1 ml dan ditambahkan amil alkohol sebanyak 1 ml lalu dikocok kuat dan dibiarkan hingga larutan memisah. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (DepKes RI, 1993).

9.3 Identifikasi Saponin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dengan air panas dan disaring lalu dimasukan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan air panas 10 ml, kemudian dikocok kuat selama 10 detik, terbentuknya busa yang stabil dengan penambahan 1 tetes asam

klorida 2N busa tidak hilang selama beberapa menit menunjukkan adanya saponin (Farnsworth, 1966 dalam Atikah, 2013).

9.4 Identifikasi Steroid. Sebanyak 0,1 gram ekstrak dimasukan cawan penguap ditambah 5 ml etanol 70% setelah dipnaskan dalam penangas air selama 2 menit, dilakukan penyaringan dalam keadaan panas-panas kemudian filtrat diuapkan dalam penangas air hingga kering. Filtrat kering ditambahkan CHCl_3 hingga larut dimasukan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan air hingga membentuk 2 lapisan CHCl_3 dan air. Lapisan CHCl_3 diambil kemudian dikeringkan dalam plat tetes, ditambah pereaksi *Lieberman-Burchard* (3 tetes asam asetat anhidrat ditambahkan 2-3 tetes H_2SO_4 pekat). Hasil positif steroid apabila terbentuk warna biru atau hijau (DepKes RI, 1993).

9.5 Identifikasi Tanin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dengan air panas dan disaring lalu dimasukan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan FeCl_3 0,1%. Terbentuknya warna biru-hitam, hijau atau biru-hijau dan endapan menunjukkan adanya tanin (Farnsworth, 1966 dalam Atikah, 2013).

10. Uji Kandungan Alkaloid Madu Randu

Sampel madu randu sebanyak 100 ml dimasukan kedalam wadah maserasi kemudian ditambahkan pelarut ethanol 70% sampai sampel madu terendam. Madu dimaserasi selama 24 jam dengan sesekali dilakukan penggojokan, selanjutnya filtrat disaring dan diuapkan diatas *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental (Krisyanella *et al*, 2021).

Sebanyak 5 gram ekstrak ditimbang dan ditambahkan 10 ml kloroform dan 10 ml amoniak lalu larutan disaring dan filtrat dimasukan kedalam erlenmeyer lalu ditambahkan kedalam erlenmeyer 10 tetes H_2SO_4 2N. Campuran akan terbentuk 2 lapisan. Lapisan atas dipindah kedalam tabung reaksi. Larutan diberi pereaksi mayer, bila terbentuk endapan putih atau kuning menunjukkan adanya alkaloid (Krisyanella *et al*, 2021).

11. Identifikasi Senyawa Alkaloid Piperin Ekstrak Cabe Jawa (Kromatografi Lapis Tipis)

Timbang ekstrak kental cabe jawa lebih kurang 50 mg ekstrak, lalu dilarutkan dalam 25 mL etanol P di dalam tabung reaksi. Saring ke dalam labu tentukur 50-mL, bilas kertas saring dengan etanol P dan tambahkan etanol P sampai tanda. kemudian di totolkan pada lempeng KLT meggunakan pipa kapiler. Dielusi dengan larutan pengembang dan ditutup rapat. Fase diam yang digunakan yaitu silica gel GF254. n-

Heksana P-diklorometan P-etil asetat P (20:30:10) (FHI Edisi II, 2017). Sebelum fase diam dimasukkan dalam *chamber*, fase gerak dibiarkan hingga jenuh terlebih dahulu. Setelah itu plat KLT tersebut dimasukkan dalam *chamber* dan tunggu sampai jenuh. Setelah dielusi plat tersebut dikeringkan atau ditunggu hingga kering, lalu diberikan pereaksi semprot dragendorf dan dilihat dengan lampu UV 366 nm, dihitung Rf nya.

12. Pembuatan Larutan CMC-Na (Kontrol -)

Larutan uji menggunakan Na CMC 0,5% dengan cara menimbang Na CMC 500 mg, dimasukkan ke dalam labu takar ad 50 ml air suling panas sedikit demi sedikit dan diaduk-aduk hingga terbentuk mucilago, dan dicukupkan volumenya dengan air suling panas ad 100 ml.

13. Pembuatan Larutan Kafein (Kontrol +)

Larutan kafein dosis 100 mg/kgBB dibuat dengan cara menimbang kafein 250 mg, disuspensikan ke dalam labu takar ad 50 ml CMC Na 0,5% dan diaduk-aduk hingga homogen.

14. Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Cabe Jawa dan Madu

14.1 Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Cabe Jawa. Larutan uji cabe jawa menggunakan dosis 26 mg/kgBB dengan membuat konsentrasi larutan stok 0,06%. Ditimbang ekstrak cabe jawa sebanyak 30 mg yang lalu akan disuspensikan ke dalam labu takar ad 50 ml CMC Na 0,5%.

14.2 Pembuatan Larutan Stok Madu. Larutan uji madu menggunakan dosis 800 mg/kgBB dengan membuat konsentrasi larutan stok 2%. Ditimbang madu randu sebanyak 1000 mg yang lalu akan disuspensikan ke dalam labu takar ad 50 ml CMC Na 0,5%.

15. Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit *Swiss Webster* jantan sejumlah 35 ekor, dengan bobot rentang 20-30 gram dengan usia 8 minggu. Hewan dikelompokkan menjadi 7 kelompok masing-masing 5 ekor mencit jantan galur *Swiss Webster* diberi perlakuan secara oral. Pembagian kelompok sebagai berikut :

- Kelompok I : diberi kafein 100 mg/KgBB sebagai kontrol positif.
- Kelompok II : diberi CMC-Na 0,5% sebagai kontrol negatif.
- Kelompok III : diberi dosis tunggal cabe jawa 26 mg/KgBB.
- Kelompok IV : diberi dosis tunggal madu 800 mg/KgBB.

- Kelompok V : diberi dosis kombinasi (25:75) ekstrak cabe jawa 6,5 mg/kgBB dan madu 600 mg/kgBB.
- Kelompok VI : diberi dosis kombinasi (50:50) ekstrak cabe jawa 13 mg/kgBB dan madu 400 mg/kgBB.
- Kelompok VII : diberi dosis kombinasi (75:25) ekstrak cabe jawa 19,5 mg/kgBB dan madu 200 mg/kgBB.

Tabel 2. Variasi dosis kombinasi cabe jawa dan madu

	F1	F2	F3	F4	F5
	(mg/kgBB)	(mg/kgBB)	(mg/kgBB)	(mg/kgBB)	(mg/kgBB)
Cabe	26	-	6,5	13	19,5
Jawa					
Madu	-	800	600	400	200

Keterangan :

Formula 1 : Dibuat dosis tunggal cabe jawa 26 mg/kgBB.

Formula 2 : Dibuat dosis tunggal madu 800 mg/kgBB.

Formula 3 : Dibuat dosis kombinasi (25:75) ekstrak cabe jawa 6,5 mg/kgBB dan madu 600 mg/kgBB.

Formula 4 : Dibuat dosis kombinasi (50:50) ekstrak cabe jawa 13 mg/kgBB dan madu 400 mg/kgBB.

Formula 5 : Dibuat dosis kombinasi (75:25) ekstrak cabe jawa 19,5 mg/kgBB dan madu 200 mg/kgBB.

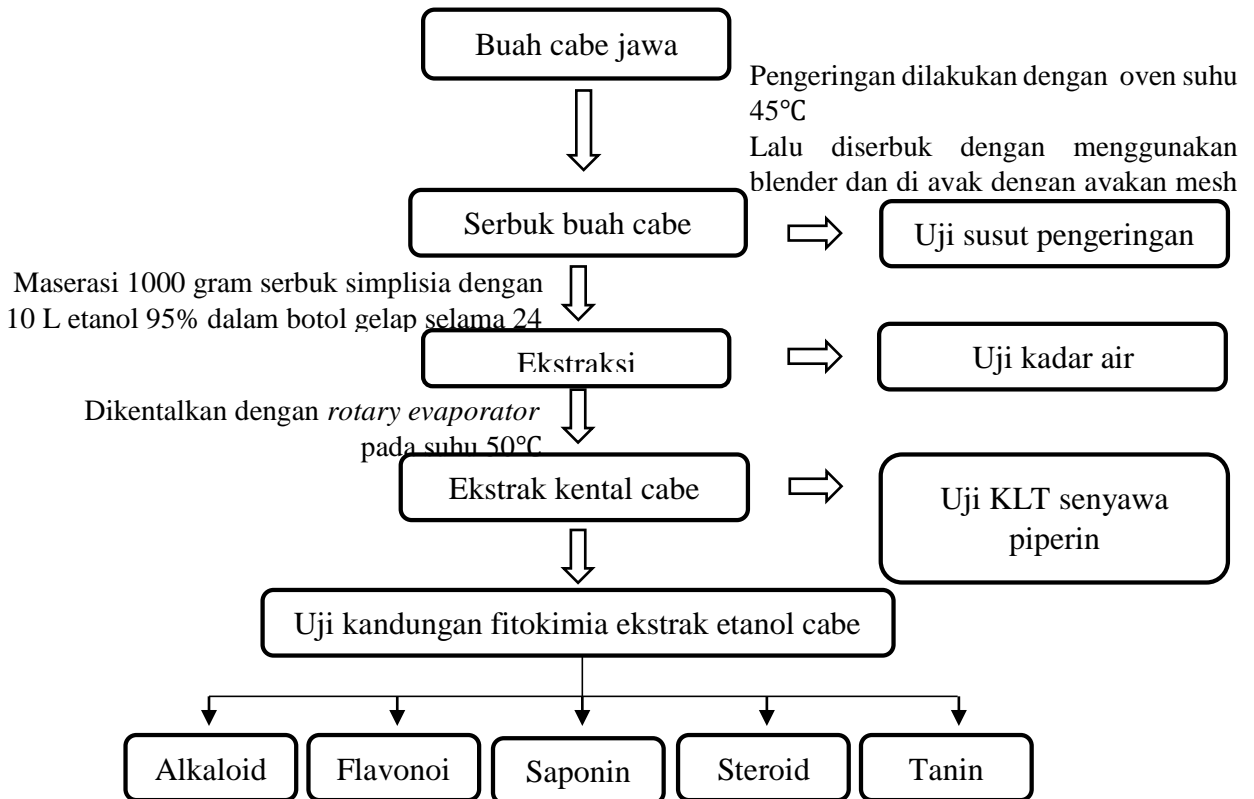
16. Uji Tonikum

Hewan uji dalam penelitian ini adalah mencit *Swiss Webster* jantan dengan jumlah 35 ekor, dengan bobot rentang 20-30 gram dengan usia 8 minggu. Mencit kemudian diadaptasikan dengan lingkungan terlebih dahulu selama 1 minggu, sebelum diberi perlakuan hewan uji dipuaskan selama 8 jam. Mencit akan dibagi menjadi 7 kelompok, dengan masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit. Setiap mencit diberi perlakuan secara oral dengan sediaan uji. Kelompok I diberi kafein 100 mg/kg BB sebagai kontrol positif, kelompok II diberi CMC Na 0,5% sebagai kontrol negatif, kelompok III diberi dosis tunggal cabe jawa 26 mg/kgBB, kelompok IV diberi dosis tunggal madu 800 mg/kgBB, kelompok V diberi dosis kombinasi ekstrak cabe jawa dan madu 25:75 dengan dosis 6,5 mg/kgBB : 600 mg/kgBB, kelompok VI diberi dosis kombinasi ekstrak cabe jawa dan madu 50:50 dengan dosis 13 mg/kgBB : 400 mg/kgBB, dan kelompok VII diberi diberi dosis kombinasi ekstrak cabe jawa dan madu 75:25 dengan dosis 19,5 mg/kgBB : 200 mg/kgBB. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode ketahanan berenang dan gelantung yaitu metode skrining farmakologi yang digunakan untuk mengetahui efek obat yang bekerja pada koordinat gerak, terutama penurunan kontrol syaraf pusat.

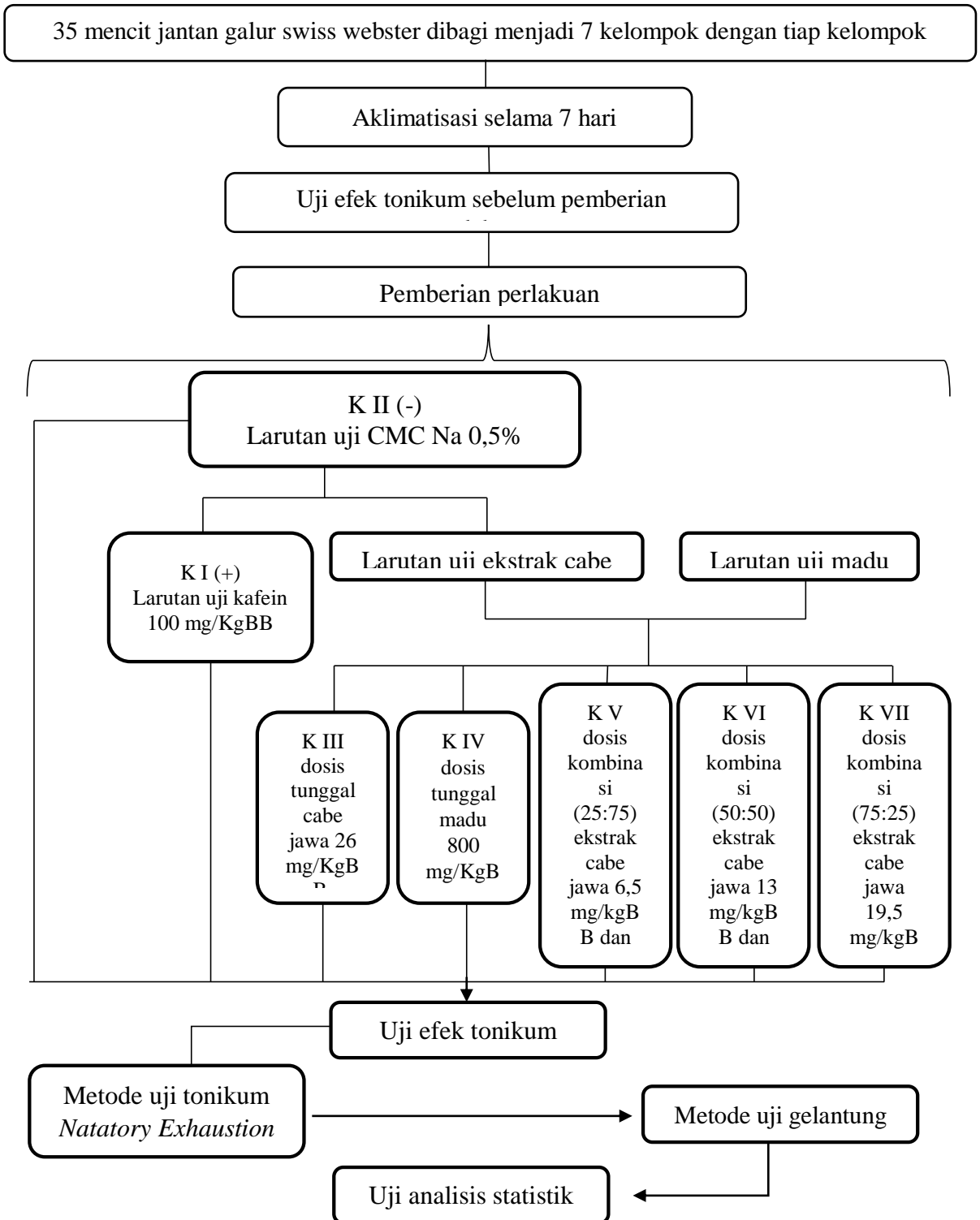
16.1 Uji Ketahanan Renang. Uji ini dilakukan terhadap mencit dengan menggunakan wadah akuarium berukuran, 50 x 25 x 30 cm dengan ketinggian air 18 cm (Turner, 1956 dalam Prastiwi *et al*, 2015). Waktu renang sebelum diberi perlakuan merupakan lama waktu renang dari hewan uji sebelum mendapatkan perlakuan dosis uji, perhitungan dimulai saat memasukkan hewan uji kedalam akuarium sampai timbul adanya tanda lelah yang ditandai dengan hewan uji membiarkan kepalanya di bawah permukaan air selama 7 detik, kemudian hewan uji diangkat dari akuarium dan dicatat waktunya. Hewan uji lalu diistirahatkan selama 60 menit setelah itu diberi sediaan peroral dan diistirahatkan kembali selama 30 menit, setelah 30 menit kemudian hewan uji direnangkan kembali dan dicatat waktu timbul kelelahannya. Parameter lelah adalah hewan uji tidak menggerakkan kakinya untuk berenang serta membiarkan kepalanya berada di bawah permukaan air selama 7 detik. Waktu tidak bergerak seluruh bagian tubuh mencit yang diukur selama mencit berenang dicatat sebagai data *immobility time*. Penambahan daya tahan atau efek tonikum adalah selisih antara waktu renang sebelum perlakuan dan waktu renang sesudah perlakuan (Prastiwi *et al*, 2015).

16.2 Uji Gelantung. Pada pengujian gelantung, mencit diletakkan pada kawat gelantung yang dipasang secara horizontal sepanjang 50 cm dengan tinggi 20 cm diatas permukaan meja. Mencit digantungkan sebelum dan sesudah perlakuan uji. Mencit diistirahatkan sekitar 10 menit kemudian dilanjutkan uji gelantung dan diamati mencit bergelantung di kawat lalu dihitung berapa detik kemampuan mencit berhasil menggantung kemudian dibandingkan dengan kontrol negatif dan positif (Aprilia dan Siregar, 2013).

E. Alur Penelitian



Gambar 10. Alur Ekstraksi



Gambar 11. Alur Uji Efek Tonikum

F. Analisis Hasil

Data hasil rata-rata kenaikan efek tonikum tiap uji yang didapat akan diolah serta dianalisis menggunakan uji statistik parametrik yaitu uji normalitas *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas. Setelah memenuhi persyaratan uji statistik parametrik, selanjutnya dilakukan uji *Analysis of variances* yaitu *One Way ANOVA* dan diakhiri dengan uji Post Hoc menggunakan *Tukey*. Namun, apabila tidak memenuhi persyaratan uji statistik parametrik, maka dilakukan uji non parametrik menggunakan uji *Kruskal Wallis* (Mafitri dan Parmadi, 2018).