

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang diperoleh dari wilayah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah yang diambil pada bulan Juli tahun 2023 dan mencit putih jantan (*Mus musculus*) didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi.

Sampel dalam penelitian ini adalah daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang dipilih adalah kondisi daun berwarna hijau dengan kondisi baik, segar serta tidak mudah busuk dan menggunakan sampel mencit yang terbagi menjadi 5 kelompok. Setiap kelompok terdiri dari 5 ekor mencit putih jantan (*Mus musculus*) dengan berat rata-rata 20-30 gram yang ditentukan berdasarkan rumus Federer, yaitu:

Keterangan :

N = besar kelompok perlakuan

T = jumlah mencit

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

$$(5 - 1)(t - 1) \geq 15$$

$$4t - 4 \geq 15$$

$$4t \geq 19$$

$$t \geq 4,75$$

$$t \geq 5$$

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian yang pertama adalah ekstrak etanol dari daun binahong.

Variabel utama dalam penelitian yang kedua adalah aktivitas tonikum dari daun ekstrak binahong terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus*).

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang diidentifikasi dapat diklasifikasikan menjadi berbagai variabel antara lain variabel bebas, variabel kontrol, dan variabel terikat. Variabel bebas merupakan variabel yang disengaja dapat diubah guna mengetahui pengaruh terhadap variabel kontrol.

Variabel terikat merupakan titik masalah berupa kriteria penelitian ini. Variabel terkontrol merupakan variabel yang dianggap berpengaruh berbeda dengan variabel bebas.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi dosis ekstrak daun binahong.

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas tonikum dengan ekstrak dari daun binahong terhadap mencit jantan (*Mus musculus*), mencakup selisih dari waktu lelah mencit berenang dan bergelantung sebelum perlakuan dan setelah perlakuan.

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah umur mencit (2-3 bulan), kondisi mencit baik dengan bobot (20-30g), jenis kelamin (jantan), lingkungan, kondisi kandang, kondisi alat uji gelantung dan *Natatory Exhaustion*, kondisi penelitian dan pengamatan, serta prosedur pembuatan ekstrak.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) merupakan daun dalam kondisi yang baik terbebas dari penyakit, tidak busuk, dan segar didapatkan dari daerah Tawangmangu pada bulan Juli 2023.

Kedua, serbuk daun binahong adalah serbuk yang didapatkan dari proses mengambil daun binahong, mencuci, mengeringkan menggunakan bantuan oven dari suhu 50°C, berikutnya simplisia daun binahong yang telah kering dihaluskan menggunakan blender, selanjutnya pengayakan menggunakan ayakan no. 40 agar mendapat derajat kehalusan agak kasar.

Ketiga, ekstrak etanol daun binahong adalah hasil ekstraksi serbuk daun binahong dengan campuran pelarut etanol memanfaatkan metode maserasi.

Keempat, *Natatory exhaustion* adalah metode skrining farmakologi yang dilakukan untuk mengetahui efek obat yang bekerja pada koordinasi gerak, terutama pada penurunan kontrol saraf pusat.

Kelima, *swimming time* adalah lama waktu ketahanan mencit berenang sebelum dan setelah pemberian larutan uji. Semakin lama waktu mencit berenang maka efek tonikum juga semakin tinggi.

Keenam, waktu bergelantung adalah lama waktu mencit berhasil menggantung kakinya pada kawat gelantung hingga terjatuh dengan mencatat selisih waktu gelantung mencit sebelum dan setelah pemberian larutan uji.

Ketujuh, dosis efektif adalah dosis terkecil yang mampu memberikan efek tonikum yang sebanding dengan kontrol positif. Semakin tinggi dosis yang diberikan maka semakin kuat efek yang terjalin.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan yaitu oven, pipet tetes, batang pengaduk, ayakan no.40, gelas ukur, tabung reaksi, beaker glass, spuit 1 ml, timbangan analitik, water bath, *stopwatch*, akuarium, kawat gelantung, cawan penguap, blender, kertas saring, kain flanel, *chamber*, lempeng KLT, lampu UV 254 nm dan 366 nm, lampu spiritus, corong, botol berwarna gelap, handuk pengering, *hairdryer*, dan kandang mencit.

2. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu simplisia daun binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten.) Stennis), etanol 70%, kafein, Na-CMC, aquadest, serbuk mg, amil alkohol, pereaksi Dragendorff, mayer, wagner, $AlCl_3$, ammonia, HCL 2N, H_2SO_4 , HCl (p), metanol, kloroform, asam format, air, etil asetat, dan mencit putih jantan (*Mus musculus*).

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap awal dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi tanaman binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten.) Stennis). Determinasi dilakukan untuk mengetahui suatu kebenaran sampel berdasarkan ciri-ciri mikroskopis dan morfologi tanaman binahong yang terdapat pada pustaka. Determinasi tanaman dilakukan di B2P2TOOT Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Pengambilan bahan

Sampel diperoleh dari wilayah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa tengah. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berupa daun binahong yang berwarna hijau dengan kondisi baik, segar, dan tidak mudah busuk.

3. Pembuatan serbuk daun binahong

Daun binahong dibersihkan dari kotoran lalu dicuci hingga bersih, dipotong sesuai ukuran, lalu dijemur terlindung sinar matahari. Daun yang sudah kering di oven guna menghilangkan sisa kadar air pada suhu $50^{\circ}C$. Daun binahong kering dibuat menjadi serbuk dengan

cara diblender dan diayak menggunakan ayakan no. 40 artinya 1 inci mesh terdapat lubang sebanyak 40 (Kemenkes, 2017).

4. Penetapan susut pengeringan serbuk

Penetapan susut pengeringan daun binahong ditentukan dengan sampel yang dipanaskan pada oven suhu 105°C. Dipanaskan krus dengan tutup dan ditara. Lalu krus digunakan sebagai wadah penimbangan sebanyak 2 gram. Simplisia dalam krus diseragamkan dengan menggoyangkan wadah. Lalu dimasukkan dalam ruang pengering dengan kondisi terbuka. Proses pengeringan dilakukan pada suhu yang ditetapkan hingga konstan dan dilakukan triplikasi. Bobot dikatakan konstan jika deviasi hasil penimbangan berturut-turut kurang dari 0,25% (Kemenkes, 2017). Pengukuran susut pengeringan serbuk binahong ini dilakukan di laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

5. Pembuatan ekstrak etanol daun binahong

Pembuatan ekstrak etanol daun binahong mengikuti prosedur Kementerian Kesehatan RI (2017), yakni menimbang serbuk simplisia daun binahong sebanyak 1000 gram dan dimasukkan ke dalam botol berwarna coklat dengan 10 liter pelarut etanol 70%. Penyarian dilakukan selama 24 jam, perendaman selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian didiamkan kurang lebih 18 jam. Filtrat dipisahkan dari residu dengan cara difiltrasi. Proses penyarian dilakukan pengulangan satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan volume pelarut menjadi setengah volume pelarut pada penyarian pertama, yaitu 5 liter. Seluruh filtrat dikumpulkan, dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental daun binahong.

6. Penetapan kadar air ekstrak daun binahong

Metode gravimetri merupakan salah satu metode untuk menetapkan kadar air ekstrak, yaitu dengan cara menimbang sebanyak 10 gram ekstrak daun binahong lalu memasukkannya ke dalam krus porselin yang telah ditara. Dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam lalu di timbang. Tahapan diulang setiap 1 jam sekali hingga perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut kurang dari 0,25% (Kemenkes RI, 2017).

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak daun binahong

7.1 Alkaloid. Identifikasi kandungan alkaloid dengan memasukkan ekstrak daun binahong sebanyak 0,5 gram ke dalam

tabung reaksi, ditambahkan 10 ml ammonia dan 2 ml kloroform lalu ditambahkan 10 tetes H_2SO_4 . Campuran dikocok hingga membentuk 2 lapisan. Lapisan H_2SO_4 terbagi menjadi 3 tabung pada masing-masing volume 2,5 mL. Sebanyak tiga larutan di uji dengan pereaksi Wagner, Mayer, dan Dragendorff. Larutan positif pada pereaksi Wagner dengan berubahnya warna larutan menjadi coklat. Larutan positif pada pereaksi Mayer maka terbentuk endapan putih. Kemudian pada pereaksi Dragendorff terbentuk endapan merah jingga, menunjukkan adanya alkaloid (Surbakti, 2018).

7.2 Flavonoid. Identifikasi kandungan flavonoid yaitu sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah serbuk Mg dan 10 tetes HCL pekat kemudian 1 ml amil alkohol dikocok kuat serta dibiarkan memisah. Flavonoid yang positif menghasilkan warna kuning, merah, atau jingga yang terdapat pada lapisan amil alkohol (Lidinilla, 2014).

7.3 Terpenoid. Identifikasi kandungan terpenoid dengan memasukkan ekstrak sebanyak 0,5 gram ditambahkan 2 ml kloroform serta 3 ml larutan H_2SO_4 pekat. Positif mengandung terpenoid ditunjukkan dengan berwarna coklat kemerahan pada tabung reaksi (Jazilah dkk., 2014).

7.4 Steroid. Identifikasi kandungan steroid dengan memasukkan ekstrak daun binahong sebanyak 0,5 gram ditambah asam asetat anhidrat 2 ml dan 2 ml H_2SO_4 pekat. Sampel dikatakan positif jika menunjukkan warna violet menjadi hijau/biru (Jazilah dkk., 2014).

7.5 Saponin. Identifikasi kandungan saponin dengan memasukkan sebanyak 0,5 gram ekstrak lalu menambahkan 5 mL aquadest, kemudian ditambahkan 1 tetes HCL 2N dan dikocok dengan kuat selama 10 detik. Apabila muncul buih yang stabil maka positif mengandung saponin (Surbakti, 2018).

8. Uji KLT

8.1 Flavonoid. Sampel ditimbang 20 mg dilarutkan dengan etanol 1 ml. Kemudian ditotolkan pada silika gel 60 GF 254. Elusi dengan fase gerak etil asetat : air : asam format (5:1:1) sampai batas. Pengujian KLT flavonoid ini menggunakan baku rutin dengan pereaksi semprot sitroborat (Farmakope Herbal Indonesia, 2017).

Sampel ditimbang 20 mg dilarutkan dengan etanol 1 ml. Ditotolkan pada silika gel 60 GF 254. Elusi dengan fase gerak n-Butanol : asam asetat : air (4:1:5) sampai batas. Pengujian KLT

flavonoid ini menggunakan baku kuersetin dengan pereaksi semprot AlCl_3 (Nugu, 2018).

8.2 Alkaloid. Sampel ditimbang 20 mg dilarutkan dengan etanol 1 ml. Kemudian ditotolkan pada silika gel 60 GF 254. Elusi dengan fase gerak metanol : kloroform (1:9) sampai batas (Gritter, 1991). Pengujian KLT alkaloid ini menggunakan baku piperin dengan pereaksi semprot anisaldehyd- H_2SO_4 .

9. Uji bebas etanol ekstrak daun binahong

Pengujian bebas etanol ekstrak daun binahong dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak daun binahong benar-benar terbebas dari alkohol dilakukan dengan cara memasukkan sejumlah ekstrak ke dalam tabung reaksi, lalu menambahkan CH_3COOH serta H_2SO_4 (p) kemudian dipanaskan. Hasil dikatakan negatif apabila tidak terciumnya bau ester yang khas (Praepandi, 2006).

10. Pengelompokan perlakuan hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit putih jantan dengan berat rata-rata 20-30 gram, sebanyak 25 ekor dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit putih jantan dan diberikan perlakuan sebagai berikut:

Kelompok I Na-CMC 0,5% sebagai kelompok kontrol negatif.

Kelompok II Kafein 100 mg/kgBB mencit sebagai kelompok kontrol positif.

Kelompok III Ekstrak daun binahong 10,92 mg/ 20 g BB mencit.

Kelompok IV Ekstrak daun binahong 21,84 mg/ 20 g BB mencit.

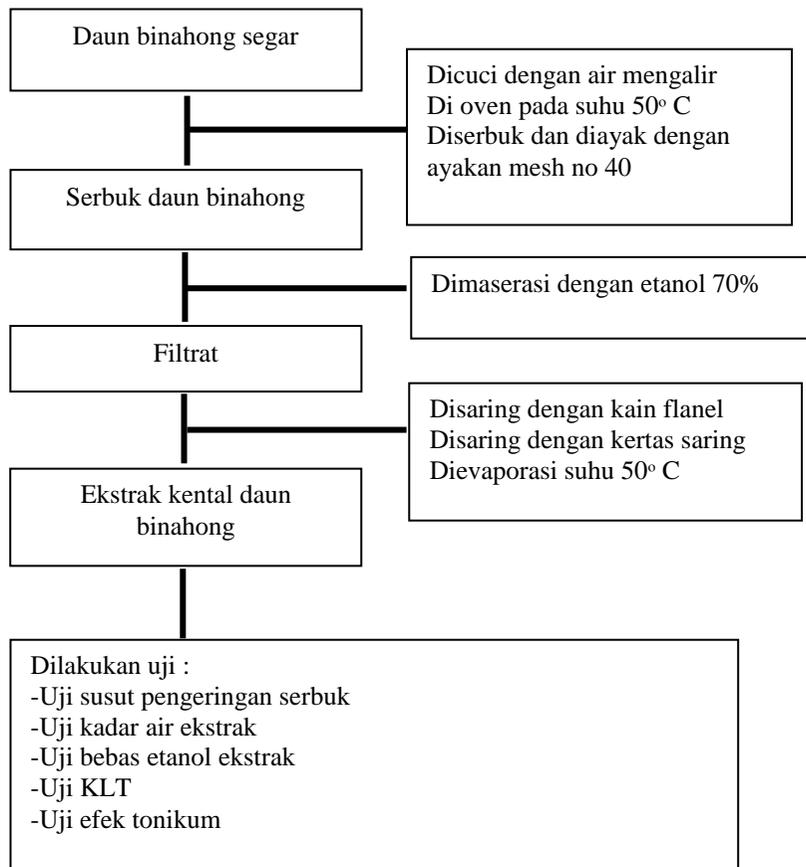
Kelompok V Ekstrak daun binahong 32,76 mg/20 g BB mencit.

11. Prosedur uji efek tonikum

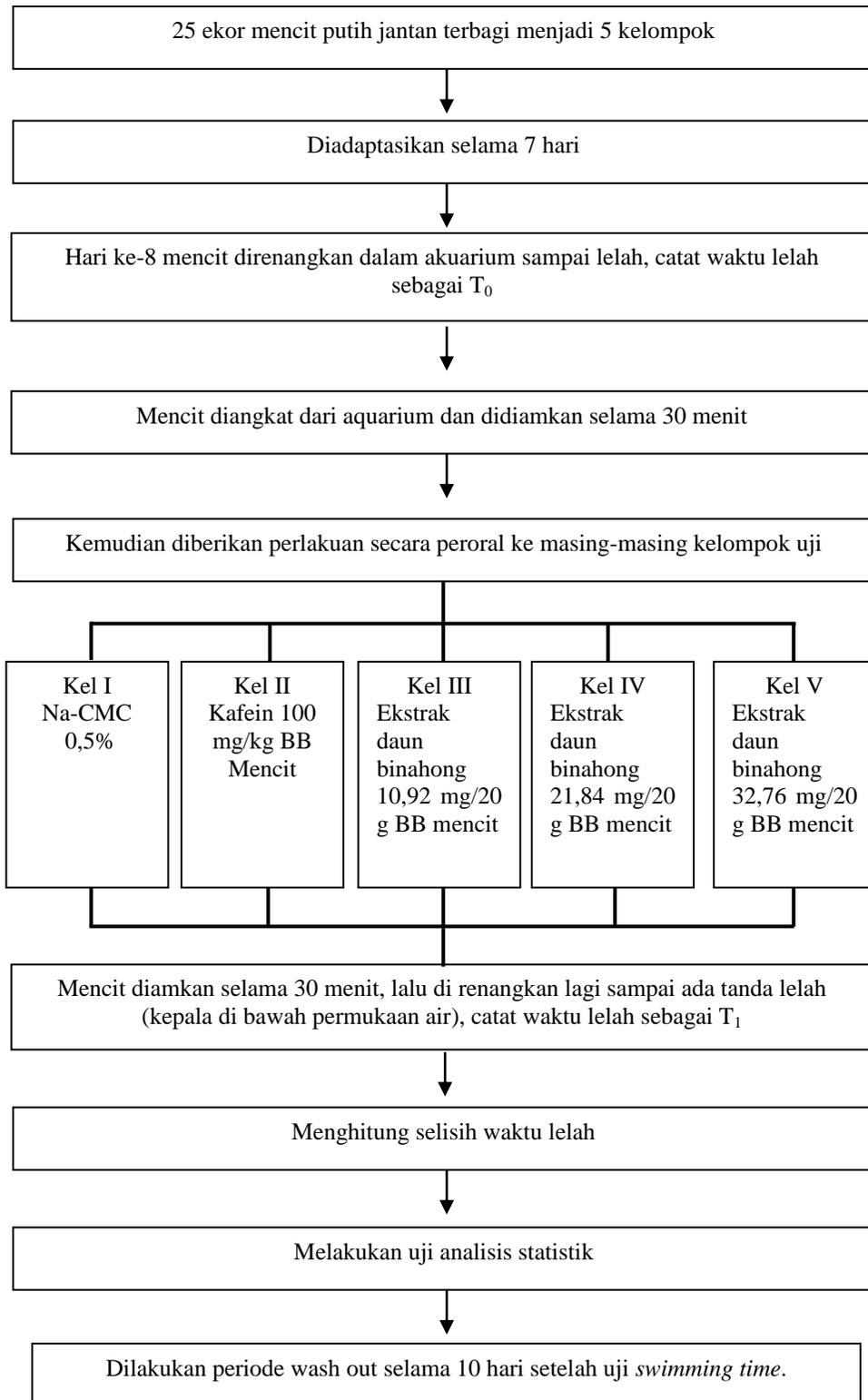
Pengujian dengan metode *Natatory Exhaustion*, yaitu sebelum pemberian sediaan uji, mencit direnangkan terlebih dahulu. Setelah itu, waktu renang dihitung sejak mencit sudah mulai direnangkan hingga menunjukkan tanda-tanda kelelahan. Jika sudah terlihat tanda kelelahan, maka mencit diangkat dan dicatat waktu lelahnya. Mencit didiamkan selama 30 menit, lalu diberikan sediaan oral dan didiamkan kembali selama 30 menit. Kemudian, hewan uji kembali direnangkan dan dicatat waktu kelelahannya. Tanda kelelahan yang terlihat yaitu mencit tidak menggerakkan kakinya untuk berenang, tubuh mencit tegak lurus dengan permukaan air, ekornya tidak bergerak, dan kepala mencit di bawah permukaan air selama lebih dari tujuh detik.

Pengujian dengan metode uji gelantung, yaitu sebelum pemberian perlakuan, mencit dipuaskan terlebih dahulu selama 8 jam senantiasa diberi air. Saat sebelum pemberian sediaan, mencit di gelantungkan terlebih dahulu. Terhitung mulai dari mencit diletakkan pada kawat gelantung sampai terjatuh, kemudian didiamkan selama 30 menit, sehabis itu diberi sediaan kontrol negatif Na CM 0,5%, kontrol positif kafein dan dosis perlakuan ekstrak I, II, dan III. Lalu didiamkan kembali selama 30 menit, setelah itu hewan uji di gelantungkan pada kawat gelantung yang di pasang secara horizontal dengan tinggi 20 cm di atas permukaan meja secara horizontal. Parameter kelelahan adalah lama waktu mencit bergelantung pada kawat hingga terjatuh. Efek tonikum ialah terjalin peningkatan energi tahan gelantung yang diperoleh dari selisih waktu gelantung mencit sebelum diberikan perlakuan dan setelah diberikan perlakuan.

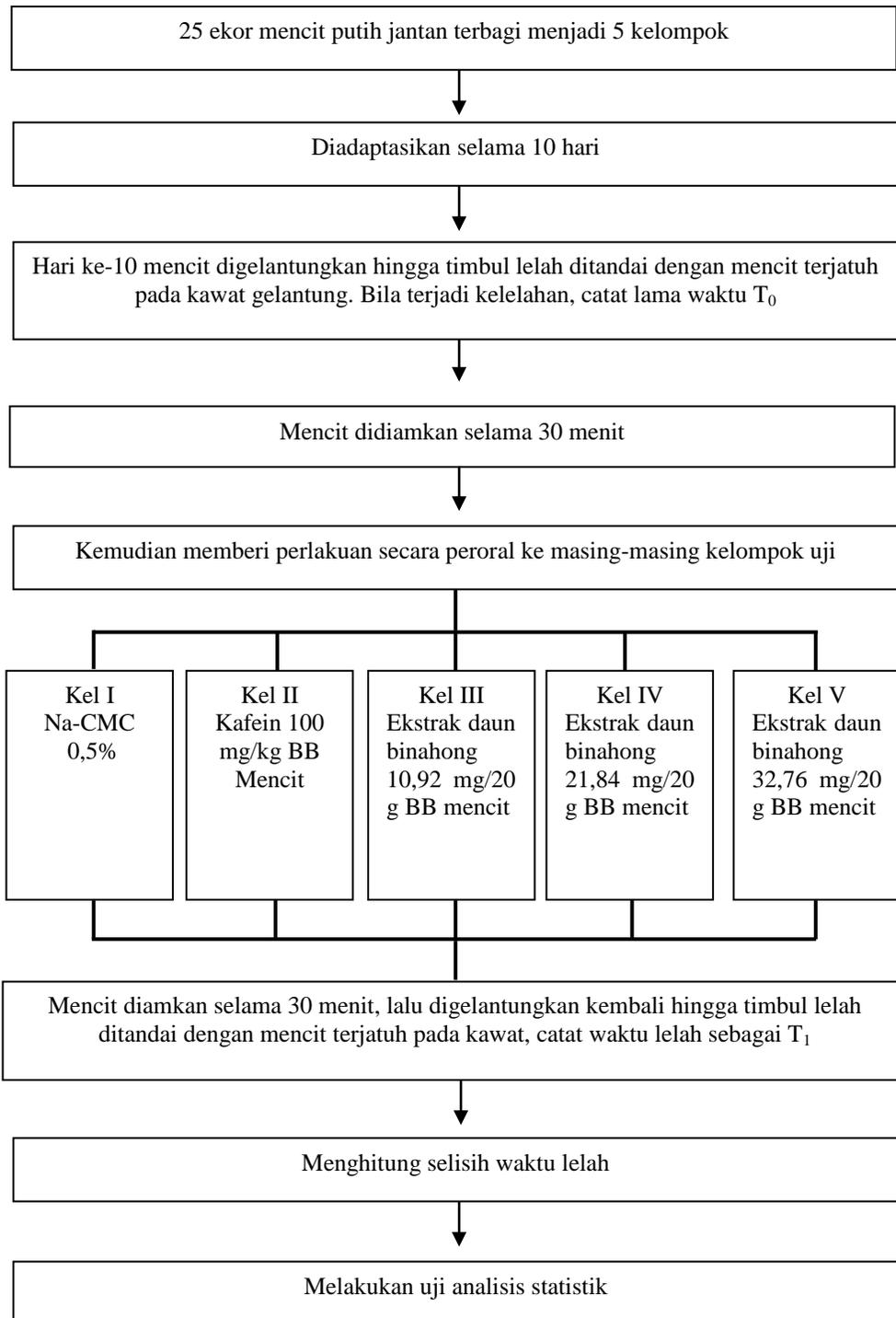
E. Skema Penelitian



Gambar 5. Skema pembuatan ekstrak etanol daun binahong



Gambar 6. Skema kerja penelitian metode *natory exhaustion*



Gambar 7. Skema kerja penelitian metode uji gelantung

F. Analisis Data

Data yang akan dianalisis dalam penelitian ini berupa *swimming time* dan tubuh mencit jantan (*Mus musculus*) bergelantung. Di mana peneliti menggunakan software SPSS 25.0 dalam analisis datanya. Data hasil pengukuran dianalisis dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk Test* berguna agar dapat memahami data yang didapat terdistribusi normal atau tidak. Data yang memiliki kenormalan distribusi tersebut dilakukan uji homogenitas. Setelah memenuhi syarat maka analisis data dilanjutkan uji analysis of variance yaitu metode *One way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *Tukey HSD*. Namun, jika data tidak terdistribusi normal maka dilakukan menggunakan uji *Kruskal-Wallis Test* dan uji lanjutan *Mann-Whitney Test*.