

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah seluruh subjek survei. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih hijau dari Balai Penelitian dan Pengembangan Jamu dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) di Tawangmangu Kabupaten Karanganyar dan pengambilan bahan di tetangga rumah yang berada di Desa Sobontoro. Daun sirih hijau (*Piper betle* Linn) akan digunakan sampel dalam penelitian ini. Pada bulan Maret diperoleh daun sirih hijau segar, dan warna daun masih hijau mengkilat.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel pertama pada penelitian ini merupakan sirup ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn)

Variabel utama yang kedua pada penelitian ini merupakan tikus jantan galur wistar.

Variabel utama yang ketiga pada penelitian ini merupakan selisih kadar SGOT dan SGPT.

2. Klasifikasi variabel utama

2.1. Variabel bebas. Dalam penelitian ini, variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah untuk mengetahui pengaruh variabel-variabel tersebut. Proporsi propilen glikol merupakan variabel bebas dalam penelitian ini.

2.2. Variabel terikat. Dalam penelitian ini, dimana titik pusat permasalahan ini merupakan pilihan pada penelitian ini . Kadar SGOT dan SGPT tikus jantan galur wistar setelah induksi parasetamol merupakan variabel terikat dalam penelitian ini.

2.3. Variabel terkendali. Variabel kendali dalam penelitian yaitu mempengaruhi variabel terikat karena ditentukan kadarnya supaya hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat direplikasi oleh penelitian lain. Dalam penelitian ini yang menjadi variabel kontrol adalah fisik hewan uji meliputi berat badan, jenis kelamin, lingkungan, keadaan laboratorium, peralatan yang digunakan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun sirih hijau yaitu famili dari piperaceae yang berwarna hijau mengkilap.

Kedua, Serbuk daun sirih hijau yang diperoleh bagian daun sirih hijau yang telah dicuci bersih, dioven dengan suhu 60°C sampai kering selanjutnya dihaluskan lalu diayak menggunakan ayakan mesh nomor 40.

Ketiga, Ekstrak daun sirih hijau yaitu ekstrak kental didapatkan dari maserasi serbuk daun sirih hijau menggunakan pelarut etanol 70%. Lalu diuapkan pada vacuum rotary evaporator sampai didapat ekstrak kental daun sirih.

Keempat, Sirup ekstrak daun sirih hijau adalah sirup yang terbuat dari ekstrak daun sirih hijau, sukrosa, propilenglikol, metil paraben, esen apel untuk menutupi rasa yang pahit, akuades setelah itu diracik sesuai dengan formulasi yang ditetapkan.

Kelima, hewan uji dalam penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar berumur 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 gram.

Keenam, parasetamol yaitu obat dalam dosis 0,18 g/200g BB tikus dapat menyebabkan kerusakan hati.

Ketujuh, kadar SGOT dan SGPT digunakan sebagai parameter uji dalam penelitian ini. Serum tikus putih jantan Wistar dikumpulkan dan kadar SGPT dan SGOT diukur menggunakan fotometer di laboratorium Universitas Setia Budi.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan penelitian ini yaitu alat penyerbuk yaitu pisau, saringan no 40, dan timbangan analitik, oven. Proses ekstraksi alat yang digunakan yaitu alat maserasi dengan lengkap, lampu pembakar, tabung reaksi dan lain-lain, masker, sarung tangan, pipet, batang pengaduk, corong, kain flanel, gunting, vial, kapas, beakerglass, gelas ukur, mortir, stamper, penara botol, botol 60 mL. Proses induksi pada tikus alat yang digunakan adalah kandang tikus, timbangan, jarum oral, pipa kapiler, alat sentrifuge. Proses menghitung kadar SGOT dan SGPT menggunakan alat mikropipet, fotometer.

2. Bahan

Bahan yang digunakan penelitian yaitu untuk pembuatan ekstrak daun sirih hijau yaitu alkohol 70%, unruk menginduksi tikus bahan yang digunakan adalah parasetamol, Natrium Carboxy Methyl Mellulosa (Na-CMC), untuk menghitung kadar SGOT dan SGPT bahan yang digunakan adalah plat KLT Silica gel GF₂₄₅, akuades, reagen

SGOT dan SGPT, untuk pembuatan formula sirup bahan yang digunakan adalah sukrosa, propilenglikol, metil paraben, esens apel.

Tikus wistar jantan pada berat badan 150-200 gram pada umur 2-3 bulan digunakan pada penelitian ini. Mereka sehat dan telah berpuasa sebelum pengobatan.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Bahan

Penelitian ini mengidentifikasi keberadaan daun sirih hijau dan mencocokkan morfologinya dengan literatur untuk mencocokkan karakteristik makroskopis dan mikroskopisnya, khususnya bagaimana mencocokkan karakteristik morfologinya dalam literatur yang dibuktikan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu.

2. Pengambilan bahan

Daun sirih hijau di gunakan pada penelitian ini yaitu dalam keadaan tidak rusak, segar, daun masih berwarna hijau dan mengkilap yang di ambil diambil di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu.

3. Pengeringan bahan

Daun sirih digunakan dalam penelitian harus dicuci dengan air mengalir atau bak mandi bertingkat untuk menghilangkan kotoran pada daun sirih. Kemudian cincang secara horizontal dan jemur di bawah terik matahari sampai daun sirih kering. Tujuannya adalah untuk mengurangi kadar air untuk mencegah pembusukan mikroba. Tahap yang terakhir adalah sortasi kering untuk memisahkan kotoran yang masih melekat pada daun sirih hijau (Rivai, 2014).

4. Ekstraksi sampel

Daun sirih hijau yang akan diekstraksi disiapkan sebanyak 800 gram menggunakan metode maserasi dengan etanol 70% sebanyak 8 liter dengan perbandingan 1:10. Maserasi yang pertama dilakukan perendaman 10 bagian (8 liter) serbuk yang kering direndam dalam pelarut etanol 70%, kemudian 7,5 liter selama 3 hari sesekali digojok, setelah itu didapatkan hasil pemisahan yaitu filtrat 1 dilakukan dengan cara disaring dengan menggunakan kertas saring. kemudian residu dilakukan remaserasi dengan menggunakan etanol 70% sebanyak 5 bagian (4 liter) dengan menggunakan tahapan yang sama, maserasi selama 2 hari. kemudian dipisahkan kembali yaitu filtrat 2 dengan cara menyaring dengan kertas saring. Kemudian filtrat 1 dan filtrat 2

digabungkan, kemudian dipekatkan menggunakan *vacum rotary evaporator* dengan suhu 40°C hingga didapatkan sampai kental (Kemenkes, 2013).

5. Identifikasi kandungan kimia

5.1. Identifikasi alkaloid. Ekstrak sebanyak 1 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambah dengan larutan Mayer sehingga terbentuk endapan menggumpal berwarna kuning atau putih dan ditambah dengan larutan Dragondrof terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam yang berarti menunjukkan adanya alkaloid (Robinson, 1995)

5.2. Identifikasi saponin. Mengukur air panas sebanyak 10 ml dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan ekstrak simplisia daun sirih hijau sebanyak 0,5 gram lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1–10 cm. Pada penambahan HCl 2N buih tidak hilang (Depkes RI, 1977).

5.3. Identifikasi tanin. Mengukur air panas sebanyak 10 ml dimasukkan tabung reaksi lalu ditambahkan 2 mg ekstrak simplisia daun sirih hijau dan di didihkan selama 15 menit kemudian disaring. Pereaksi FeCl_3 ditambahkan filtrat yang dihasilkan, hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan (Robinson, 1995).

5.4. Identifikasi flavonoid. Ekstrak simplisia daun sirih hijau ditimbang 2 miligram ditambah 5 ml aquadest kemudian dipanaskan 1 menit, disaring dan diambil filtratnya. Filtrat yang diperoleh ditambah 1 gram serbuk Mg, asam klorida pekat 1 ml dan amil alkohol 2 ml. Campuran ini dikocok dengan kuat, kemudian dibiarkan memisah. Reaksi yang positif ditunjukkan dengan warna merah atau kuning atau jingga pada amil alkohol (Depkes RI, 1977). Skema uji kadar flavonoid dapat dilihat pada Gambar 7.

6. Pembuatan larutan uji

6.1. Suspensi CMC Na 0,5%. Larutan CMC Na 0,5% adalah 0,5 g dalam 100 ml air suling. Ditimbang 0,5 g larutan CMC Na, dimasukkan ke dalam mortar berisi akuades panas, digiling setelah mengembang, dan ditambahkan aquades sampai merata (Katzung, 2001).

6.2. Larutan parasetamol. Menurut Wilmana (2007), dosis parasetamol pada manusia berkisar antara 10 gram hingga 15 gram. Dosis racun adalah 10 gram, yang sesuai dengan dosis parasetamol

pada tikus yang tercantum dalam tabel faktor konversi dari 70 kg berat badan menjadi 200 gram dalam tubuh tikus. Bobot badan tikus, yaitu 2,16 mg/200 gram bobot badan tikus. Untuk membuat CMC Na, timbang 0,5 gram CMC Na, masukkan ke dalam mortar yang telah diisi air suling panas, tambahkan 6 g parasetamol setelah pemuain, giling hingga merata, dan tambahkan sisa akuades (Hadinata, 2016).

6.3. Larutan curcuma. Dosis yang digunakan yaitu 20 mg/kg BB, dan dosis curcuma 200 g pada tikus dengan berat badan 70 kg pada tabel konversi manusia adalah 2,16 mg/200 gram BB. Cara pembuatannya adalah dengan menimbang 0,5 gram CMC Na, masukkan didalam mortir sudah terisi akuades, tunggu hingga mengembang, kemudian ditambahkan 100 mg curcuma, digiling hingga merata, kemudian ditambahkan sisa air sebanyak 100 mL (Esperanza, 2020).

7. Penentuan dosis

7.1. Dosis parasetamol. Pada penelitian ini dosis parasetamol menggunakan 10 gram konversi pada tikus pada tabel faktor konversi 0,018, dan dosis tikus $10 \text{ gram} \times 0,018 = 0,18 \text{ g}/200\text{g BB}$ tikus (Hadinata, 2016).

7.2. Dosis curcuma. curcuma diminum satu hingga dua tablet 20mg/70kgBB tiga kali sehari. Tabel konversi untuk orang 70 kg menjadi tikus 200 g adalah 0,018, jadi dosis tikus adalah $0,018 \times 120 = 2,16 \text{ mg}/200\text{g BB}$ tikus (Esperanza, 2020).

7.3. Dosis sediaan sirup daun sirih hijau. Menurut Sekar (2017) dalam variasi formula bahan tambahan propilenglikol antara formula I 16,5 mL, Formula II 18 mL, Formula III 19,5 mL dapat digunakan sebagai acuan dalam memilih salah satu formula yang tepat bagi sediaan sirup daun sirih hijau agar dapat diterima di masyarakat. Hal ini juga sebagai parameter yang kita lihat menentukan keamanan dan keefektifan sebuah sediaan, dimana yang di harapkan dari salah satu formula tersebut dapat diambil yang terbaik. Pada penelitian yang dilakukan oleh Hidayati dkk (2019) pada optimasi formula ekstrak sirup etanol daun sukun dengan co-solvent propilenglikol dapat menghasilkan sirup ekstrak daun sukun dengan pH dan nilai hedonik yang optimum, sehingga semakin meningkat konsentrasi propilenglikol yang diberikan semakin meningkatkan kelarutan senyawa ekstrak dalam sediaan sirup.

8. Pembuatan formulasi sediaan sirup

Penelitian ini dilaksanakan dengan pembuatan sediaan sirup daun sirih hijau dengan kadar propilenglikol yang berbeda pada F1, F2, F3 dan kontrol negatif pada formula yaitu bahan tambahan tanpa ekstrak daun sirih hijau. Data penimbangan bahan pada tabel 1.

Tabel 1. Rancangan Formula sirup daun sirih hijau

Komponen	Satuan	Formula 1	Formula 2	Formula 3
1. Ekstrak Daun Sirih Hijau	g/kg BB	6	6	6
2. Sukrosa	g	38,4	38,4	38,4
3. Propilenglikol	g	16,5	18	19,5
4. Metil Paraben	g	0,25	0,25	0,25
5. Essens Apel	g	5	5	5
6. Akuades (ad)	mL	60	60	60

Ekstrak daun sirih hijau dibuat dengan menggunakan 1 kg dan metode maserasi etanol 70% sebanyak 10 liter dengan perbandingan 1:10. Setelah diperoleh hasil pemisahan yaitu filtrat 1, disaring menggunakan kertas sari, dan residu dimaserasi menggunakan 25 bagian etanol 70 persen (7,5 liter) dengan langkah yang sama, maserasi selama 2 hari. Filtrat 2 kemudian dipisahkan dengan menyaringnya dengan kertas sari. Filtrat 1 dan 2 kemudian gabung dan pekatkan pada suhu 40°C dengan vacum rotary evaporator untuk mendapatkan ekstrak kental.

Sediaan sirup ini memiliki 3 formula berbeda yang dikonsentrasikan pada propilenglikol yaitu pada formula 1 : 16,5 g , formula 2 : 18 g, formula 3 : 19, 5 g. Ekstrak daun sirih hijau dimasukan kedalam mortir. Propelinglikol yang telah di timbang dimasukan bersamaan dengan metil paraben dalam wadah yang sudah sediakan, kemudian pengadukan disertai pemanasan supaya terjadinya larutan homogen. Sukrosa dilarutkan pada gelas piala secara dipanaskan dengan ditambahkan akuades, setelah itu disaring menggunakan kain kassa. Larutan gula di campur dengan ekstrak kental daun sirih dan diaduk sampai merata, kemudian ditambahkan esens dan hingga akuades hingga mencapai batas yang sudah ditentukan yaitu 60 mL. Sediaan sirup dimasukan ke dalam botol coklat dan uji fisik.

9. Uji Stabilitas Fisik

Uji stabilitas fisik, cara pengujian dan pengamatan adalah dengan menempatkan dan meninggalkan sediaan sirup dengan suhu kamar selama 28 hari. hari ke 0, 7, 14, 21, dan 28, pengujian observasi sebagai berikut:

9.1. Uji Organoleptis. Pengujian ini dilakukan dengan mengamati tekstur, bau, rasa, dan warna (Charter, 1997).

9.2. Uji Homogenitas. Sediaan sirup yang telah disiapkan masukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditaruh di bawah lampu terang dan diamati apakah homogenitas campuran dari bahan-bahan formula dalam sediaan tersebut (Charter, 1997). Sediaan sirup yang homogen ialah yang tidak memiliki endapan dan gumpalan dalam larutan (Lachman, 1994).

9.3. Uji PH. Uji ini cara mengukur dengan pH meter. Untuk mengukur pH sirup, alat tersebut dikalibrasi, kemudian dicelupkan ke dalam buffer pH 7, kemudian dibilas dengan akuades. Cara menggunakan alat tersebut ialah dicelupkan ke dalam sampel sirup dan didiamkan beberapa waktu, kemudian hasilnya terlihat pada angka yang muncul di layar (Murrumihadi *et al.*, 2011). Nilai pH pada sediaan sirup ialah berkisar 4-7 (Depkes RI, 1995).

9.4. Uji Viskositas. Uji ini menggunakan alat yaitu viskometer rion dengan memasukkan sampel ke dalam viskometer sampai spindel terendam. Kemudian viskometer dijalankan dan akan terbaca viskositas dari sediaan sirup tersebut. Syarat viskositas sediaan sirup pada rentang 0,37-3,9 dpa's (Luanggrumitchai *et al.*, 2007).

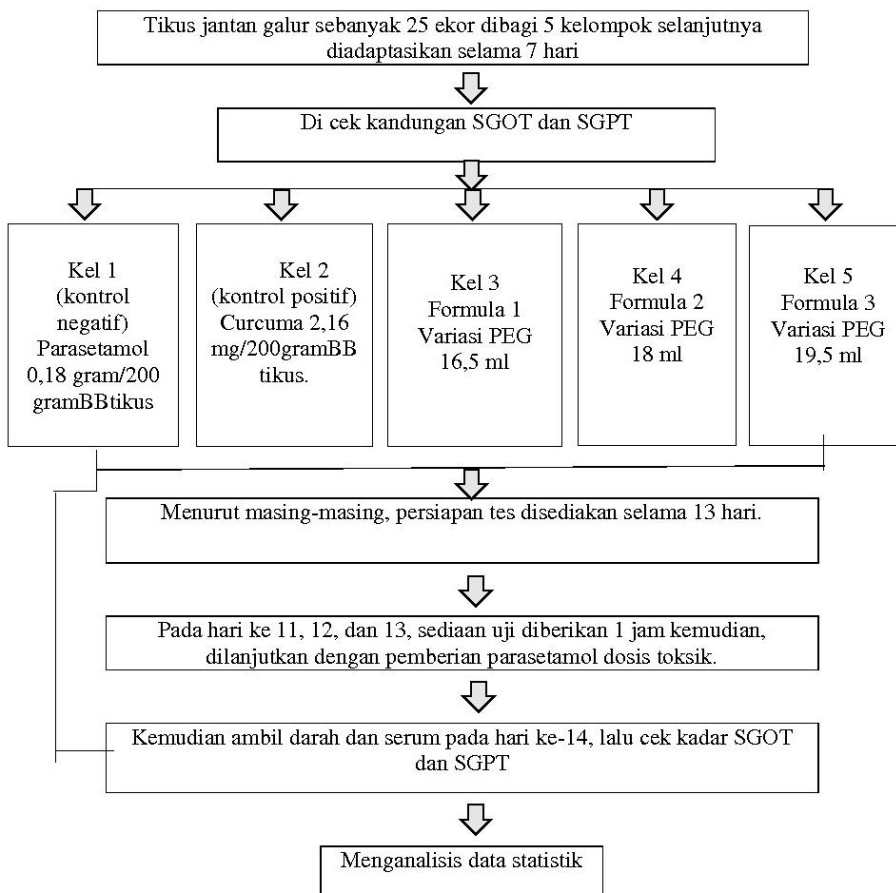
9.5. Volume Terpindahkan. Kalibrasi botol 60 mL, kemudian masukkan sirup yang sudah jadi pada botol 60 mL sampai tanda yang sudah dibatasi. Tuangkan sirup yang telah dituang ke dalam botol 60 mL kembali ke dalam gelas ukur untuk menentukan volume yang dipindahkan dan nilai ukur yang telah dikalibrasi (zainuddin, 2018). Sediaan sirup yang memenuhi persyaratan uji volume yang dapat dipindahkan, dengan kisaran 100% yang ditentukan di label dan kurang dari 95% (95%-100%) (Depkes RI, 1995).

10. Pengelompokan hewan uji

Sebelum melakukan percobaan dengan tikus sebaiknya beradaptasi dengan lingkungan baru selama 1 minggu kemudian dipindahkan, suhu di dalam kandang juga diperhatikan karena mempengaruhi penelitian. Timbang dan sesuaikan dosis sebelum perlakuan. Menurut kelompok uji, ada 5 kelompok dengan 5 hewan di setiap kelompok.

Kelompok I (K1) : Kontrol negatif. Tikus diberi parasetamol 0,18 gram/200gramBB tikus padada hari ke 11, 12, dan 13

- Kelompok (K2) : Kontrol positif curcuma 2,16 mg/200gBB diberikan kepada tikus + induksi Parasetamol 0,018 gram/200 gram BB.
- Kelompok III (K3) : Sirup ekstrak daun sirih hijau formula 1 dengan PEG 16,5 mL. dan induksi Parasetamol 0,018 gram/200 gram BB.
- Kelompok IV (K4) : Sirup ekstrak daun sirih hijau formula 2 dengan PEG 18 mL dan induksi Parasetamol 0,018 gram/200 gram BB.
- Kelompok V (K5) : Sirup ekstrak daun sirih hijau formula 3 dengan PEG 19,5 mL dan induksi Parasetamol 0,018 gram/200 gram BB.



Gambar 3. Skema perlakuan hewan uji

11. Penetapan enzim SGOT dan SGPT

Gunakan pipa kapiler untuk mengumpulkan ± 2 mL darah di vena mata, selanjutnya disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit (endapkan dan pisahkan sel darah dari serum). Ambil 1 mL dan 2

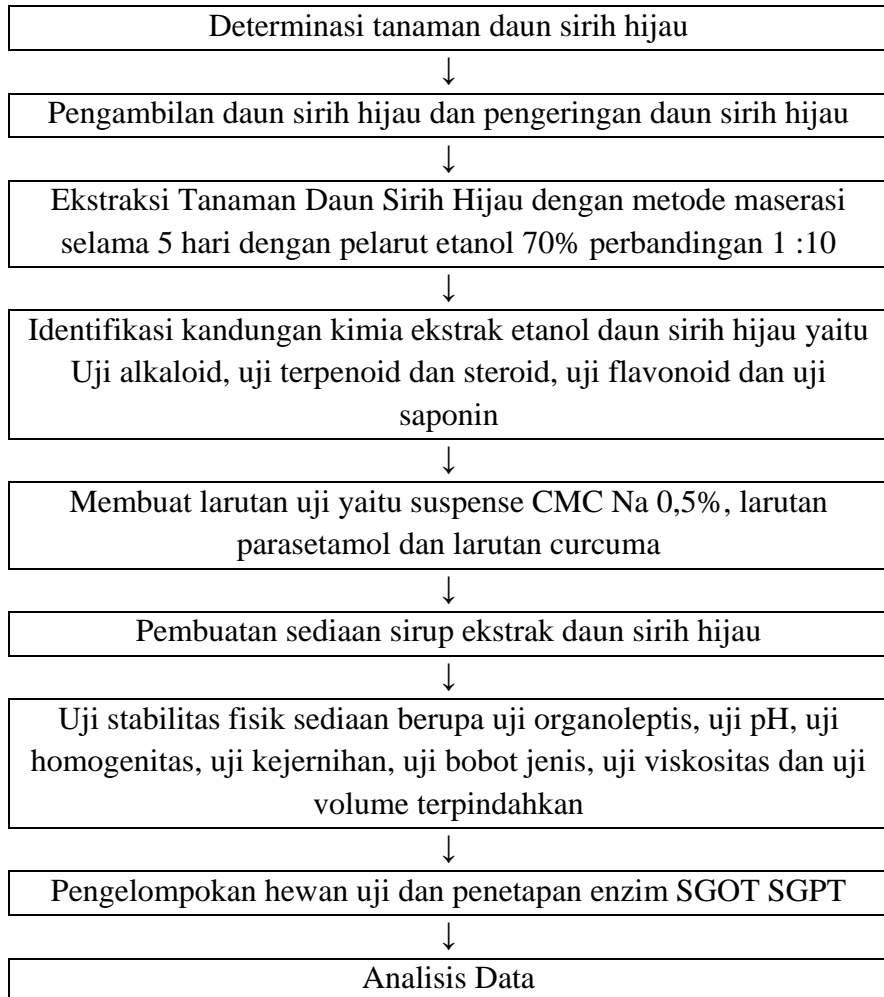
mL reagen untuk menentukan kandungan SGOT dan SGPT, kemudian gunakan fotometer untuk membaca pada suhu 37°C. Pertama di cek kadar SGOT dan SGPT kemudian pada kelompok perlakuan hewan uji K1 diberi makan dan minum saja. Pada kelompok perlakuan hewan uji K2 diberikan kontrol positif yaitu larutan Kurkuma dan diinduksi dengan larutan Parasetamol. Kelompok perlakuan hewan uji K3 diinduksi Parasetamol + pemberian formula 1, sedangkan kelompok perlakuan K4 diinduksi Parasetamol + pemberian formula 2 dan kelompok perlakuan hewan uji K5 diinduksi Parasetamol + pemberian formula 3. Kemudian hari ke 14 diambil darah dan serum untuk dilakukan cek kandungan SGOT dan SGPT.

E. Analisis Data

Data yang dihasilkan dari penelitian dianalisis menggunakan metode analisis variasi (ANOVA) dengan tingkat kepercayaan 95%. Pada pengujian Anova dilakukan pengujian Deskriptif dengan hasil statistic *mean*, standar deviasi, angka terendah dan tertinggi serta standar eror. Kemudian dilanjutkan dengan tes *Homogeneity* untuk menguji berlaku tidaknya asumsi Anova. Jika probabilitasnya $> 0,05$ maka H_0 (varians sama) diterima, dan sebaliknya jika probabilitasnya $< 0,05$ berarti H_0 ditolak.

Kemudian dilakukan uji Anova dengan kriteria jika $F_{hitung} < F_{tabel}$ maka H_0 diterima serta jika nilai signifikansi/probabilitas $> 0,05$ maka H_0 diterima. Hal ini disimpulkan bahwa terdapat pengaruh perbedaan konsentrasi propilenglikol terhadap aktivitas hepatoprotektor. Selanjutnya dilakukan uji *Pos Hoc Tukey* yang berguna untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda dan kelompok mana yang tidak berbeda.

F. Skema penelitian



Gambar 4. Skema penelitian