

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi Sampel

Populasi merupakan keseluruhan dari suatu objek yang dijadikan sebagai dasar penelitian. Populasi dalam penelitian ini yaitu daun bayam duri (*Amaranthus spinosus* L.) yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel adalah bagian dari populasi yang diteliti. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun bayam duri. Daun bayam duri yang digunakan dalam keadaan segar, daun bagian ke-4 sampai ke-5 dari pucuk, dipilih daun yang berwarna hijau, tidak terkena hama, memiliki umur cukup panen dan bebas dari penyakit yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pada penelitian ini yaitu ekstrak etanol daun bayam duri. Variabel utama kedua pada penelitian ini yaitu efek antidiare ekstrak etanol daun bayam duri terhadap tikus putih jantan. Variabel ketiga yaitu aktivitas antidiare dari daun bayam duri terhadap tikus putih jantan dengan metode transit intestinal.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel meliputi variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol. Variabel bebas merupakan variabel yang sengaja direncanakan sebelumnya memiliki pengaruh yang signifikan terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ekstrak etanol daun bayam duri.

Variabel tergantung merupakan variabel akibat dari variabel utama, variabel tergantung pada penelitian ini adalah efek antidiare ekstrak etanol daun bayam duri terhadap tikus putih jantan dengan parameter yang diamati berupa rasio jarak tempuh marker (norit) terhadap panjang usus keseluruhan.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung dan merupakan variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti. Sehingga hasil yang diperoleh tidak menyebar dan dapat diulang pada penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam

penelitian ini yaitu berat badan tikus, peneliti, kondisi fisik hewan uji, keadaan tikus, kondisi lingkungan.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, tumbuhan daun bayam duri (*Amaranthus spinosus* L.) adalah jenis tumbuhan bayam yang didapatkan dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun bayam duri adalah hasil pengeringan daun yang telah dicuci bersih dan dikeringkan kemudian dihaluskan menggunakan mesin penggiling dan diayak menggunakan ayakan nomor 40 mesh.

Ketiga, ekstrak etanol daun bayam duri adalah ekstrak yang diperoleh dengan cara mengekstraksi serbuk daun bayam duri dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% lalu diuapkan menggunakan *rotary evaporation* untuk didapatkan ekstrak kental.

Keempat, hewan uji adalah hewan tikus yang dipelihara secara khusus dengan tujuan untuk penelitian atau pengujian di laboratorium, hewan uji diinduksi *oleum ricini* sehingga mengalami diare.

Kelima, diare adalah perubahan konsistensi feses menjadi lembek ataupun berlendir pada hewan uji tikus.

Keenam, peningkatan waktu transit usus adalah meningkatnya waktu yang diperlukan makanan untuk melewati saluran pencernaan dari awal hingga akhir sehingga feses bergerak melalui usus dengan pergerakan yang cepat dan menyebabkan seringnya mengalami buang air besar.

Ketujuh, metode transit intestinal adalah metode yang digunakan dalam pengujian antidiare dengan cara menghitung rasio jarak usus yang ditempuh oleh marker (norit) terhadap panjang usus keseluruhan.

Kedelapan, dosis efektif adalah konsentrasi dosis terkecil untuk hewan uji tikus yang dapat memberikan efek antidiare sebanding dengan kelompok kontrol positif yaitu loperamid HCL.

C. Alat, Bahan, dan Hewan Uji

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian dalam pembuatan ekstrak, simplisia kering serta ekstrak meliputi pisau, wadah penampung, neraca analitik, gelas bekkor, batang pengaduk, *rotary evaporation*, oven. Alat yang digunakan untuk perlakuan hewan uji coba meliputi jarum oral (*sonde*), spuit, kandang tikus, kapas,

seperangkat alat bedah, pisau, meteran pita, alat pelindung diri (*handscoon* dan masker).

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan peneliti berupa daun bayam duri (*Amaranthus spinosus* L.) yang masih segar diperoleh dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Bahan yang digunakan berupa pelarut etanol 96%, aquadest, Loperamid HCL 2 mg sebagai kontrol positif, dan CMC-Na sebagai kontrol negatif, *oleum ricini* sebagai pengiduksi dan norit sebagai marker.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan yaitu tikus putih jantan galur wistar, dengan umur 2-3 bulan dan berat badan rata-rata 150-200 g sebanyak 30 ekor. Pengelompokkan hewan uji dilakukan acak dengan masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor. Hewan uji diaklimatisasi selama 1 minggu bertujuan untuk mengadaptasikan hewan uji, selama aklimatisasi hewan uji tetap diberikan pakan normal. Tikus dipuaskan kurang lebih 18 jam sebelum percobaan, namun minum tetap diberikan dengan tujuan menyamakan keadaan tikus, mencegah pengaruh dari makanan yang dikonsumsi sehingga tidak mengganggu proses absorpsi (Manek *et al.*, 2020).

D. Jalannya Penelitian

1. Karakteristik Tumbuhan

1.1 Determinasi tumbuhan. Tahap awal yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu determinasi tumbuhan, dilakukannya determinasi ini bertujuan untuk menetapkan kebenaran tumbuhan bayam duri (*Amaranthus spinosus* L.) dengan morfologi atau karakteristik dari tumbuhan tersebut. Determinasi dilakukan di Laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

1.2 Pengambilan bahan. Daun bayam duri diperoleh dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Daun bayam duri didapatkan dari pohon bayam duri yang dicabut saat dalam keadaan segar dan siap panen, daun bayam yang dipilih yang bebas dari penyakit serta kondisi usia panen 3-4 minggu.

1.3 Pengeringan bahan. Daun bayam duri segar di sortasi basah kemudian dicuci menggunakan air mengalir dengan tujuan agar tidak ada kotoran yang masih melekat pada daun. Kering anginkan

daun sebelum dilakukan pengovenan agar mengurangi jumlah air setelah proses pencucian. Pengeringan dilakukan menggunakan oven pada suhu 40-50°C. Proses pengeringan dilakukan hingga daun bayam duri kering, ditandai dengan daun yang mudah diremah.

1.4 Pembuatan serbuk. Pembuatan serbuk dilakukan pada daun bayam duri yang telah kering kemudian dilanjutkan dengan proses penggilingan atau dihaluskan dan diayak menggunakan ayakan nomor 40 mesh sehingga didapatkan serbuk daun bayam duri.

2. Identifikasi Serbuk Daun Bayam Duri

2.1 Pemeriksaan organoleptis serbuk. Pemeriksaan organoleptis serbuk dilakukan dengan tujuan mengetahui sifat fisik dan kualitas serbuk dilihat dari segi bentuk, warna, bau, dan rasa.

2.2 Penetapan susut pengeringan serbuk. Pengukuran susut kering serbuk daun bayam duri menggunakan alat keseimbangan kelembaban (*moisture balance*). Ditimbang serbuk 2 gram dan ditempatkan dalam wadah aluminium foil yang tersedia. Lalu tunggu sampai berat akhir konstan, alat akan berhenti bekerja secara otomatis hingga angka ditampilkan (dalam %). Persyaratan susut kering yaitu 10% atau kurang (BPOM, 2005).

2.3 Penetapan kadar air serbuk. Penentuan kadar air dilakukan dengan maksud untuk menentukan batas atas atau kisaran kadar air dari bahan.

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume air}}{\text{Bobot bahan uji}} \times 100\%$$

3. Pembuatan Ekstrak Daun Bayam Duri

Ekstraksi yang digunakan yaitu dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Sebanyak 1000 g serbuk daun bayam duri dimasukkan ke dalam maserator lalu ditambahkan 10 bagian pelarut (1:10), yaitu (1000 g simplisia : 10 L etanol 96%). Serbuk direndam selama 6 jam pertama sambil diaduk sesekali kemudian diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara filtrasi, proses penyarian diulangi sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Maserat yang diperoleh diuapkan menggunakan evaporator untuk menghilangkan pelarut yang tersisa hingga diperoleh ekstrak kental (Kemenkes RI, 2017).

$$\% \text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak yang didapat}}{\text{bobot simplisia yang diekstrak}} \times 100\%$$

4. Identifikasi Ekstrak Daun Bayam Duri

4.1 Pemeriksaan organoleptis ekstrak. Pemeriksaan organoleptis ekstrak dilakukan dengan tujuan mengetahui sifat fisik dan kualitas serbuk dilihat dari segi bentuk, warna, bau, dan rasa.

4.2 Penetapan susut pengeringan ekstrak daun bayam duri. Penetapan susut pengeringan pada ekstrak daun bayam duri menggunakan metode gravimetri. Ekstrak ditimbang dengan seksama sebanyak 1-2 g lalu dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal tertutup yang telah dipanaskan sebelumnya pada suhu penetapan dan ditara. Bahan diratakan di dalam botol timbang dengan cara menggoyangkan botol, sampai lapisan setebal lebih kurang 5 hingga 10 mm, masukkan ke dalam ruang pengering, buka tutupnya, keringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Biarkan botol dalam keadaan tertutup saat sebelum pengeringan agar mendingin dalam desikator hingga suhu ruang (Kemenkes RI, 2017).

4.3 Penetapan kadar air ekstrak daun bayam duri. Penetapan kadar air pada ekstrak daun bayam duri dengan metode destilasi, menggunakan toluene yang telah dijenuhkan terlebih dahulu dengan air kemudian ditimbang kurang lebih 5 g ekstrak dan masukkan dalam labu alas bulat dan ditambahkan toluene yang telah dijenuhkan. Dipanaskan selama 15 menit setelah toluene mulai mendidih dilakukan penyulingan dan diatur 2 tetes/detik, lalu 4 tetes/detik. Air yang tersuling dilanjutkan dengan pemanasan selama 5 menit, biarkan tabung penerima hingga keadaan dingin atau mencapai suhu kamar. Volume air dibaca sesudah toluene dan air memisah sempurna (Kemenkes RI, 2017).

4.4 Uji bebas etanol ekstrak daun bayam duri. Uji bebas etanol dilakukan dengan menggunakan metode esterifikasi yaitu ekstrak ditambahkan H₂SO₄ pekat dan CH₃COOH lalu dipanaskan. Ekstrak dikatakan bebas etanol bila tidak ada bau ester yang khas dari etanol (Tivani *et al.*, 2021).

4.5 Identifikasi kandungan senyawa kimia daun bayam duri. Tujuan dari pengujian ini adalah untuk mengidentifikasi kandungan ekstrak etanol daun bayam. Identifikasi senyawa kimia bertujuan untuk menetapkan keberadaan senyawa kimia dalam ekstrak etanol daun bayam duri. Identifikasi senyawa ekstrak etanol daun bayam duri berupa flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, dan steroid.

4.5.1 Identifikasi flavonoid. Ekstrak daun bayam duri ditambahkan serbuk logam Mg, 1 mL HCL pekat, dan 1 mL amil alcohol untuk identifikasi. Hasil positif ditunjukkan dengan munculnya warna merah atau kuning pada lapisan amil alkohol. (Sanjayasari, 2011).

4.5.2 Identifikasi tanin. Ekstrak daun bayam duri ditimbang hingga 0,1 gr lalu ditambahkan 2 mL FeCl₃, kemudian dikocok. Perubahan warna larutan menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Halimu *et al.*, 2017).

4.5.3 Identifikasi saponin. Ekstrak sebanyak 0,5 gram ditambahkan 10 mL aquadest, kemudian tambahkan 1 tetes HCL 2N lalu di kocok dengan kuat selama 10 detik. Hasil positif ditunjukkan dengan munculnya buih stabil selama tidak kurang dari 10 menit (Surbakti, 2018).

4.5.4 Identifikasi alkaloid. Ekstrak sebanyak 0,5 gram ditambahkan 2 mL kloroform, 10 mL ammonia dan 10 tetes H₂SO₄. Kocok campuran dan biarkan membentuk 2 lapisan. Lapisan H₂SO₄ yang terbentuk dibagi menjadi 3 di tabung reaksi. Ketiga larutan di uji dengan pereaksi Mayer, Dragendorff, dan Wagner. Hasil positif pereaksi Mayer ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih, hasil positif pada pereaksi Dragendorff ditunjukkan dengan terbentuknya endapan merah jingga, dan hasil positif pereaksi Wagner berubahnya warna larutan menjadi coklat (Surbakti, 2018).

4.5.5 Identifikasi steroid/terpenoid. Ditimbang ekstrak sebanyak 0,1 g lalu ditambahkan 2 mL n-heksana dan dikocok. Tambahkan pereaksi Lieberman-Buchard ke lapisan n-heksana. Perubahan warna menjadi biru kehijauan menunjukkan adanya steroid dan terbentuknya warna merah, jingga atau ungu menandakan adanya terpenoid (Makalalang *et al.*, 2010).

5. Pengujian Antidiare

5.1 Penentuan dosis uji

5.1.1 Dosis ekstrak. Dosis uji ditentukan berdasarkan orientasi pada hewan uji terhadap parameter panjang lintasan norit pada usus tikus. Dosis orientasi yang digunakan yaitu 200mg/ 200 g bb tikus, 300 mg/200g bb tikus, 600 mg/200 g bb tikus. Dosis tersebut merujuk pada dosis uji hasil penelitian aktivitas antidiare oleh Nugraha (2018), infusa daun bayam duri dengan dosis 0,0195 g; 0,039 g; 0,078 g (g/20g bb mencit). Kontrol positif yang digunakan yaitu loperamid HCL 0,036

mg/ 200g bb tikus dan kontrol negatif CMC-Na 1% terhadap kelompok hewan perlakuan yang masing-masing terdiri dari 2 hewan uji.

Ekstrak etanol daun bayam duri diberikan secara oral dengan konsentrasi 15%. Volume normal lambung tikus yaitu 3-5 mL, jika volume ekstrak yang diberikan melebihi volume lambung tikus, maka akan menyebabkan dilatasi lambung secara akut sehingga dapat menyebabkan robeknya saluran cerna (Manek, 2020).

5.1.2 Dosis loperamid. Dosis loperamid pada manusia 70 kg. Kemudian dikonversi ke tikus berat badan 200 g nilai konversi 0,018. Dosis Loperamid 2 mg maka dosis ke tikus $2 \times 0,018$ diperoleh 0,036 mg/200 g BB tikus. Volume pemberian 1,8 mL/200 g BB tikus.

5.2 Pembuatan Larutan Uji

5.2.1 Pembuatan Larutan CMC-Na 1%. Larutan dibuat dengan ditimbang CMC-Na 1 g lalu ditaburkan diatas aquadest panas tunggu hingga CMC-Na mengembang, lalu dimasukkan dalam mortir dan digerus hingga homogen dan ditambahkan aquadest ad 100 mL.

5.2.2 Pembuatan suspensi loperamid HCL. Suspensi dibuat dengan menggerus 1 tablet loperamid HCL lalu disuspensikan dalam larutan CMC-Na lalu digerus dan dicampur hingga homogen.

5.2.3 Pembuatan suspensi ekstrak daun bayam duri. Suspensi ekstrak dibuat dengan konsentrasi 15%. Ekstrak sebanyak 15.000 mg disuspensikan dalam larutan CMC-Na, campur hingga homogen.

5.2.4 Pembuatan suspensi norit. CMC-Na 100 mg ditaburkan diatas air panas selama 15 menit, dan digerus sampai homogen. Norit sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam mortir kemudian digerus homogen lalu tambah aquadest hingga 100 mL.

5.3 Pengelompokan hewan uji. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian yaitu 30 ekor tikus jantan dengan berat badan rata-rata 150-200 g. Tikus di beri makan yang sama, dan dipelihara dalam kandang. Tikus diadaptasi selama seminggu agar beradaptasi dengan kondisi eksperimental dan mengelola kesehatan mereka.

Tikus dibagi menjadi 6 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Penentuan jumlah hewan uji ditentukan berdasarkan rumus Federer, hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 17. Hasil setiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus dan mendapatkan perlakuan sebagai berikut :

Kelompok I : Kontrol normal. Tidak diberikan perlakuan.

Kelompok II : Kontrol negatif. CMC-Na 1%

Kelompok III : Kontrol positif. Loperamid HCL 0,036 mg/200g BB tikus

Kelompok IV : Dosis I diberi EDBD 200 mg/200 g BB tikus.

Kelompok V : Dosis II diberi EDBD 300 mg/200 g BB tikus.

Kelompok VI : Dosis III diberi EDBD 600 mg/200 g BB tikus.

Ket : EDBD = Ekstrak Daun Bayam Duri

5.4 Prosedur uji antidiare. Tikus putih jantan dalam kondisi sehat dengan berat badan 150 – 200 g, diadaptasi selama 1 minggu. Dikelompokkan menjadi 6 kelompok perlakuan (5 hewan per kelompok) dan ditimbang satu per satu. Hewan uji dipuasakan makan selama 18 jam sebelum percobaan dimulai, namun minum masih tetap diberikan.

Kelompok I tidak diberikan perlakuan apapun sebagai kontrol normal, kelompok II diberi CMC-Na 1% sebagai kontrol negatif, kelompok III sebagai kontrol positif diberi loperamid HCL dosis 0,036 mg/200 g BB tikus sebagai pembanding, kelompok IV, V, VI diberi perlakuan Ekstrak Daun Bayam Duri (EDBD) dengan dosis 200 mg/200 g BB tikus, 300 mg/200 g BB tikus, 600 mg/200 g BB tikus.

Semua kelompok kecuali kelompok kontrol normal diberi *oleum ricini* untuk memberikan efek diare pada tikus secara oral setelah satu jam pemberian kemudian diberi perlakuan. Kelompok II (kontrol negatif) diberi CMC-Na 1%, kelompok III (kontrol positif) diberi Loperamid HCL. Kelompok IV, V, VI diberi ekstrak etanol daun bayam duri dengan dosis 200 mg/200 g bb tikus, 300 mg/200 g BB tikus, 600 mg/200 g BB tikus dengan konsentrasi 15%.

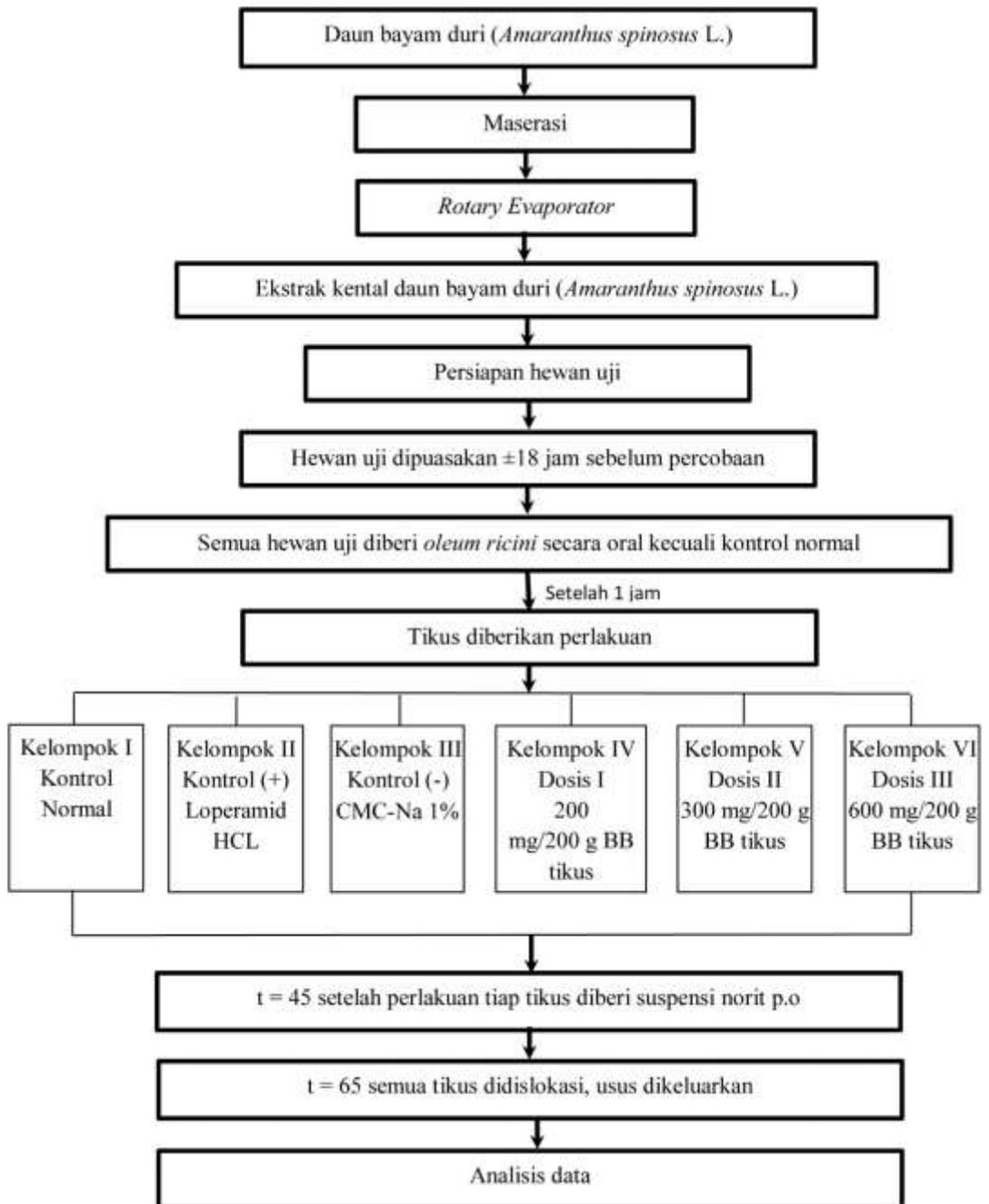
Setelah t=45 menit, tikus diberikan norit secara oral sebagai parameter uji. Norit diberikan sebagai marker karena norit berwarna hitam sehingga dapat digunakan sebagai tanda pada usus (Sari, 2019). Pada t=65 menit, tikus dikorbankan secara dislokasi tulang leher. Bedah rongga perut tikus, lalu usus dikeluarkan secara hati-hati. Ukur panjang usus yang dilalui marker mulai dari *pylorus* hingga ujung akhir (yang berwarna hitam) dengan menggunakan meteran pita. Dihitung masing-masing rasio transit usus dan persentase penghambatannya. Jika rasio yang dihasilkan semakin kecil maka efek antidiare yang dihasilkan semakin baik dengan cara memperlambat motilitas usus (Wahid *et al.*, 2018). Rasio transit intestinal dihitung dengan cara membagi panjang usus yang dilalui marker dengan panjang usus keseluruhan, hasil dapat dilihat pada lampiran 16. Persentase penghambatan dihitung dengan cara (rasio kontrol negatif - rasio

kelompok uji)/rasio kontrol negatif, hasil perhitungan dapat dilihat pada halaman 87.

E. Analisis Hasil

Dari hasil pengujian yang diperoleh dari penelitian pengamatan terhadap 6 kelompok perlakuan terhadap tikus putih jantan dari data metode transit intestinal yang dianalisa secara statistik menggunakan perangkat lunak *SPSS for Windows* menggunakan uji normalitas dan homogenitas data terlebih dahulu. Data yang telah didistribusi normal dan variasi antar sampel homogen, dianalisa dengan metode *One Way Anova* (Anova Satu Arah) dengan taraf kepercayaan 95% dan apabila menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dilanjutkan uji Post Hoc Tukey.

F. Skema Penelitian



Gambar 4. Skema Penelitian