

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tanaman mangga yang berasal dari Desa Watugajah, Kecamatan Gedangsari, Kota Yogyakarta.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun mangga (*Mangifera indica* L) yang berwarna hijau, segar, bebas dari debu, tidak terkontaminasi tanah, dan tidak terserang hama. Sampel ini diperoleh dari Desa Watugajah, Kecamatan Gedangsari, Kota Yogyakarta.

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama pada penelitian ini menggunakan daun mangga (*Mangifera indica* L). Variabel kedua menggunakan ekstrak variasi dosis daun mangga. Variabel ketiga menggunakan waktu latensi dan persen kesalahan. Variabel keempat menggunakan metode *radial arm maze*.

#### **2. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, daun mangga merupakan bagian tanaman yang berwarna hijau, segar, bebas dari debu, terhindar dari tanah, dan tidak terinfeksi hama. Sumber daun mangga ini diperoleh dari Desa Watugajah, Kecamatan Gedangsari, Kota Yogyakarta.

Kedua, serbuk simplisia merujuk pada serbuk yang telah disaring dengan ukuran mesh 60 sehingga memiliki ukuran serbuk yang seragam, kering, dan halus.

Ketiga, Ekstrak daun mangga (*Mangifera indica* L) diperoleh dengan melakukan ekstraksi pada daun mangga menggunakan metode maserasi dengan menggunakan etanol 70% sebagai pelarut. Proses selanjutnya melibatkan pemekatan ekstrak menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 58°C dengan kecepatan 60 rpm..

Keempat, dosis uji ekstrak daun mangga adalah variasi dosis ekstrak daun mangga yang diujikan pada penelitian ini, yaitu 105; 210; 420 mg/kgBB yang diberikan secara peroral (p.o).

Kelima, Kontrol positif penelitian ini adalah suplemen *Ginkgo biloba* dosis 9,75 mg/kgBB yang diberikan secara peroral.

Keenam, timbal (II) asetat adalah zat penginduksi yang berfungsi menurunkan daya ingat hewan uji melalui pembentukan radikal bebas

dengan dosis 14mg/KgBB mencit yang diberikan secara interperitonial(i.p.).

Ketujuh, Mencit adalah hewan uji yang dipakai pada penelitian ini. Karakteristiknya mencit yang berusia 6-8 minggu atau 2-3 bulan dengan berat badan antara 20-30 gram. Mencit ini diperoleh dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Universitas Setia Budi Surakarta, dalam keadaan sehat tanpa adanya penyakit.

Kedelapan, memori spasial yakni memori yang digunakan untuk mengingat dan mengenali bentuk, jarak, luas, arah dan kondisi lingkungan sekitar.

Kesembilan, radikal bebas merupakan senyawa yang memiliki potensi untuk mengurangi daya ingat dengan merusak sistem syaraf di otak..

Kesepuluh, antioksidan yaitu molekul penyumbang elektron pada radikal bebas.

Kesebelas, *radial arm maze* adalah suatu metode pengujian untuk mengetahui efek suatu sediaan uji memiliki aktivitas peningkatan daya ingat atau tidak.

Keduabelas, parameter utama yang diamati adalah angka kesalahan tipe B.

Ketigabelas, parameter kedua yang diamati adalah waktu mencit menemukan makanan, diukur berdasarkan durasi yang diperlukan oleh mencit untuk menemukan makanan pada salah satu lengan.

Keempatbelas, dosis efektif merujuk pada dosis terkecil yang memiliki parameter rata-rata AUC<sub>kum</sub> untuk angka kesalahan tipe B dan waktu menemukan makanan sebanding dengan kontrol positif, sementara secara signifikan berbeda dengan kontrol negatif dan menunjukkan penurunan angka kesalahan tipe B yang paling besar.

### **3. Klasifikasi variabel utama**

Variable utama terdiri dari identifikasi seluruh variabel pada penelitian ini, mencakup variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

**3.1 Variabel bebas.** Variabel bebas merujuk pada variabel yang telah direncanakan untuk diselidiki dalam penelitian dan memiliki pengaruh terhadap variabel tergantung. Dalam penelitian ini, variabel bebas adalah pemberian ekstrak daun mangga dengan variasi dosis.

**3.2 Variabel tergantung.** Variabel tergantung adalah variabel yang dapat dipengaruhi oleh variabel bebas. Pada penelitian ini,

variabel tergantung mencakup efek peningkatan daya ingat mencit, yang diukur dengan parameter waktu latensi dan angka kesalahan tipe B, menggunakan ekstrak daun mangga dan alat uji *Radial Arm Maze*.

**3.3 Variabel terkendali.** Variabel terkendali adalah variabel yang dapat memengaruhi variabel tergantung, dan untuk memastikan hasil penelitian dapat diandalkan dan direplikasi oleh peneliti lain, kualifikasi variabel terkendali perlu ditentukan. Dalam penelitian ini, variabel terkendali mencakup berat badan, jenis kelamin, umur, immobilitas mencit, lingkungan hidup, kondisi saat percobaan, laboratorium, dan peneliti itu sendiri.

### C. Alat, Bahan, dan Hewan Uji

#### 1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi erlenmeyer, botol maserasi, corong, seperangkat alat *rotary evaporator*, stopwatch, lumpang, spatula dan stamper, timbangan digital, pinset, spuit oral, timbangan hewan, *Eight-arm radial maze*, jaring kawat, tabung reaksi, blender, serta tempat hewan uji.

#### 2. Bahan

Penelitian ini menggunakan bahan sebagai berikut: daun mangga (*Mangifera indica*) yang di ambil Desa Watugajah, Kecamatan Gedangsari, Kota Yogyakarta.

#### 3. Hewan uji

Penelitian ini menggunakan hewan uji mencit putih (*Mus musculus*) yang berumur 6-8 minggu, dengan rentang usia antara 2 hingga 3 bulan dan berat badan 20 hingga 30 gram

### D. Jalannya Penelitian

#### 1. Determinasi tanaman

Proses identifikasi tanaman dilakukan dengan menggunakan tanaman utuh untuk memverifikasi keaslian sampel daun mangga (*Mangifera indica* L) dengan merujuk pada buku acuan, dan diverifikasi pula di Universitas Setia Budi, Surakarta.

#### 2. Pengambilan tanaman

Pengambilan daun mangga dilakukan di Desa Watugajah, Kecamatan Gedangsari, Kota Yogyakarta. Sampel yang digunakan adalah daun segar mangga yang kemudian dicuci dan diiris kecil-kecil untuk selanjutnya dikeringkan.

### 3. Pengeringan tanaman

Daun mangga yang telah bersih dan telah diiris kecil-kecil, dikeringkan pada suhu 50°C dengan oven.

### 4. Pembuatan serbuk

Proses pembuatan serbuk bertujuan untuk meningkatkan ukuran partikel bahan yang akan berinteraksi dengan larutan penyari, sehingga proses penyarian dapat berlangsung secara efisien. Setelah daun mangga mengering, dilakukan penghancuran menggunakan mesin penggiling, dan selanjutnya disaring menggunakan ayakan nomor 60.

Serbuk daun mangga yang telah dipanen seberat 7-8 kg dibersihkan dari kontaminan atau kotoran dengan menggunakan air mengalir. Setelah itu, daun mangga diiris, kemudian dikeringkan pada suhu 50°C hingga mencapai tingkat kekeringan yang diinginkan. Suhu pengeringan biasanya berada dalam rentang 40-60°C, kadar air kurang dari 10% adalah hasil optimal yang diharapkan. Pembuatan serbuk melibatkan tahapan blending dan penyaringan dengan menggunakan ayakan nomor 60 untuk mencapai tingkat kehalusan yang diinginkan. Tempat penyimpanan Serbuk ini harus kering dan tertutup rapat.

### 5. Susut pengeringan serbuk daun mangga (*mangifera indica* L)

Alat *moisture balance* digunakan untuk pengeringan serbuk. Pertama, dimasukkan 2 gram serbuk kemudian alat dioperasikan dan diamati hingga mencapai berat konstan dalam bentuk persentase. Hasil dinyatakan memenuhi syarat jika didapatkan persentase <10%. Proses ini direplikasi sebanyak 3 kali (Depkes, 2008).

### 6. Pembuatan ekstrak

Proses pembuatan ekstrak daun mangga dimulai dengan menempatkan 500 gram serbuk daun mangga dalam wadah berwarna gelap. Selanjutnya, ditambahkan etanol 70% sebanyak 3750 mL ke dalam wadah tersebut. Wadah dikocok, ditutup rapat, dan disimpan dalam ruangan yang terhindar dari sinar matahari. Selama 24 jam pertama, wadah sesekali dikocok. Setelah melewati periode tersebut, maserasi diamkan selama 24 jam. Maserat kemudian disaring menggunakan kain flanel, menghasilkan ekstrak. Ampas dari proses tersebut dicuci dengan menggunakan pelarut sebanyak 1250 mL. Hasil maserasi dilanjutkan dengan remaseri dilakukan pada pengerjaan yang sama sebelumnya kemudian didapatkan filtrat dari hasil remaserasi. Filtrat yang diperoleh dari proses sebelumnya dikumpulkan secara keseluruhan. Kemudian, filtrat tersebut diuapkan menggunakan *rotary*

*evaporator* dengan suhu sekitar 58°C hingga mendapatkan ekstrak yang kental.

## **7. Penetapan kadar air ekstrak daun mangga**

Penentuan kadar air dalam ekstrak daun mangga dilakukan melalui destilasi toluen. Toluena yang telah dijenuhkan dengan air dikocok dan dibiarkan hingga terjadi pemisahan antara lapisan air dan toluena. Lapisan air dibuang, dan penentuan kadar air pada ekstrak daun mangga menggunakan alat sterling-bidwell. Dalam proses ini, 10 gram ekstrak daun mangga ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu kering, lalu ditambahkan 100 mL toluen jenuh. Labu dipanaskan dengan hati-hati menggunakan api bunsen, dan pemanasan dihentikan ketika air pada penampung tidak menetes lagi (kurang dari 1 jam). Volume air yang terpisah setelah air dan toluen memisah sempurna dibaca, dan proses ini diulang hingga 3 kali replikasi.

## **8. Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun mangga (*Mangifera Indica L*)**

**8.1 Identifikasi flavonoid.** Untuk menilai kandungan flavonoid, 0,5 gram ekstrak daun mangga dilarutkan dalam 5 mL larutan etanol. Dari larutan sampel yang diambil sebanyak 2 mL, dicampur dengan 0,1 gram serbuk Mg, dan kemudian disatukan dengan 10 tetes HCl pekat. Proses pengocokan dilakukan secara perlahan. Terbentuknya warna merah atau jingga pada campuran tersebut menandakan keberadaan flavonoid. Sebaliknya, jika muncul warna kuning jingga, itu mengindikasikan adanya flavon, khalkol, dan auron (Djarot *et al*, 2020). Ekstrak dimasukkan ke dalam beaker glass dan dicampurkan dengan air panas. Setelah itu, campuran disaring dan filtratnya dialirkan ke dalam tabung reaksi yang berisi butiran logam Mg, 1 mL larutan HCl 2N, dan 5 mL amil alkohol. Proses pengocokan dilakukan secara intensif. Pada saat itu, warna merah, kuning, atau jingga yang muncul pada lapisan amil alkohol menandakan keberadaan flavonoid (Djamil dan Anelia, 2009).

**8.2 Identifikasi alkaloid.** Identifikasi alkaloid dilakukan melalui dua metode. Pada metode pertama, sejumlah 500 mg sampel ekstrak ditimbang dan dicampur dengan 1 mL HCl 2 N serta 9 mL air. Campuran dipanaskan selama 2 menit, didinginkan, disaring, dan pada filtratnya ditambahkan 2 tetes bouchardat. Keberadaan alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat hingga hitam. Pada metode kedua, ekstrak seberat 500 mg sampel juga ditimbang,

dicampur dengan 1 mL HCl 2 N dan 9 mL air, dipanaskan selama 2 menit, didinginkan, dan disaring. Filtratnya diambil, kemudian ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer. Adanya alkaloid ditunjukkan oleh terbentuknya endapan putih atau kuning. (Rumagit *et al.*, 2020).

**8.3 Identifikasi triterpenoid.** Menggunakan metode Lieberman – Burchard (LB) yaitu 2 mg ekstrak kering dilarutkan dalam anhidrida asetat, dipanaskan sampai mendidih, didinginkan dan kemudian 1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat ditambahkan pada tabung reaksi, terbentuk warna merah atau ungu menunjukkan kandungan triterpenoid (Saha *et al.*, 2011).

## 9. Penyiapan hewan uji

Penyiapan hewan uji melibatkan 25 eksemplar yang terbagi ke dalam lima kelompok. Kelompok pertama bertindak sebagai kelompok kontrol negatif dan diberikan CMC-Na 1%, sedangkan kelompok kedua berfungsi sebagai kontrol positif dan menerima *ginkgo biloba*. Kelompok ketiga, keempat, dan kelima merupakan kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak daun mangga dengan dosis berturut-turut sebesar 105 mg/kgBB, 210 mg/kgBB, dan 420 mg/kgBB.

## 10. Uji aktivitas peningkatan daya ingat

**10.1 Tahap adaptasi.** Tahap ini bertujuan agar hewan percobaan dapat beradaptasi dan tidak merasa bingung, aneh, gelisah ketika masuk ke dalam *maze radial* delapan lengan. Pengujian dilakukan terhadap semua kelompok uji dengan masing – masing hewan uji diberi waktu adaptasi didalam *maze* selama kurang lebih 10 menit selama 5 hari berturut. Pada masing - masing ujung lengan *maze* diberi umpan berupa pelet makanan mencit dalam kondisi ruangan pada ujung *maze* tetap dibiarkan terbuka agar mencit mudah untuk melihat makanan tersebut.

**10.2 Tahap induksi/pre test.** Tahap pre test bertujuan untuk mengetahui efek penurunan daya ingat terhadap plumbum asetat. Pemberian sediaan induksi dilakukan selama 5 hari terhadap 5 kelompok hewan uji didalam *maze radial* 8 lengan selama 10 menit. Perlakuan dihentikan ketika sudah mencapai batas waktu 10 menit.

**10.3 Tahap perlakuan/post test.** Tahap post test bertujuan untuk mengetahui apakah ada peningkatan daya ingat hewan uji sesudah diberikan zat radikal bebas dan diberikan pengobatan. Pada tahap ini pemberian penginduksi diberhentikan dan diganti dengan kontrol positif *ginkgo biloba*, dosis ekstrak daun mangga, Pengujian daya ingat

dilakukan menggunakan metode *maze* radial delapan lengan dilakukan selama 10 menit dengan lama percobaan 10 – 12 hari. Skema pengujian dapat dilihat pada **gambar 7**.

### 11. Parameter angka kesalahan tipe B

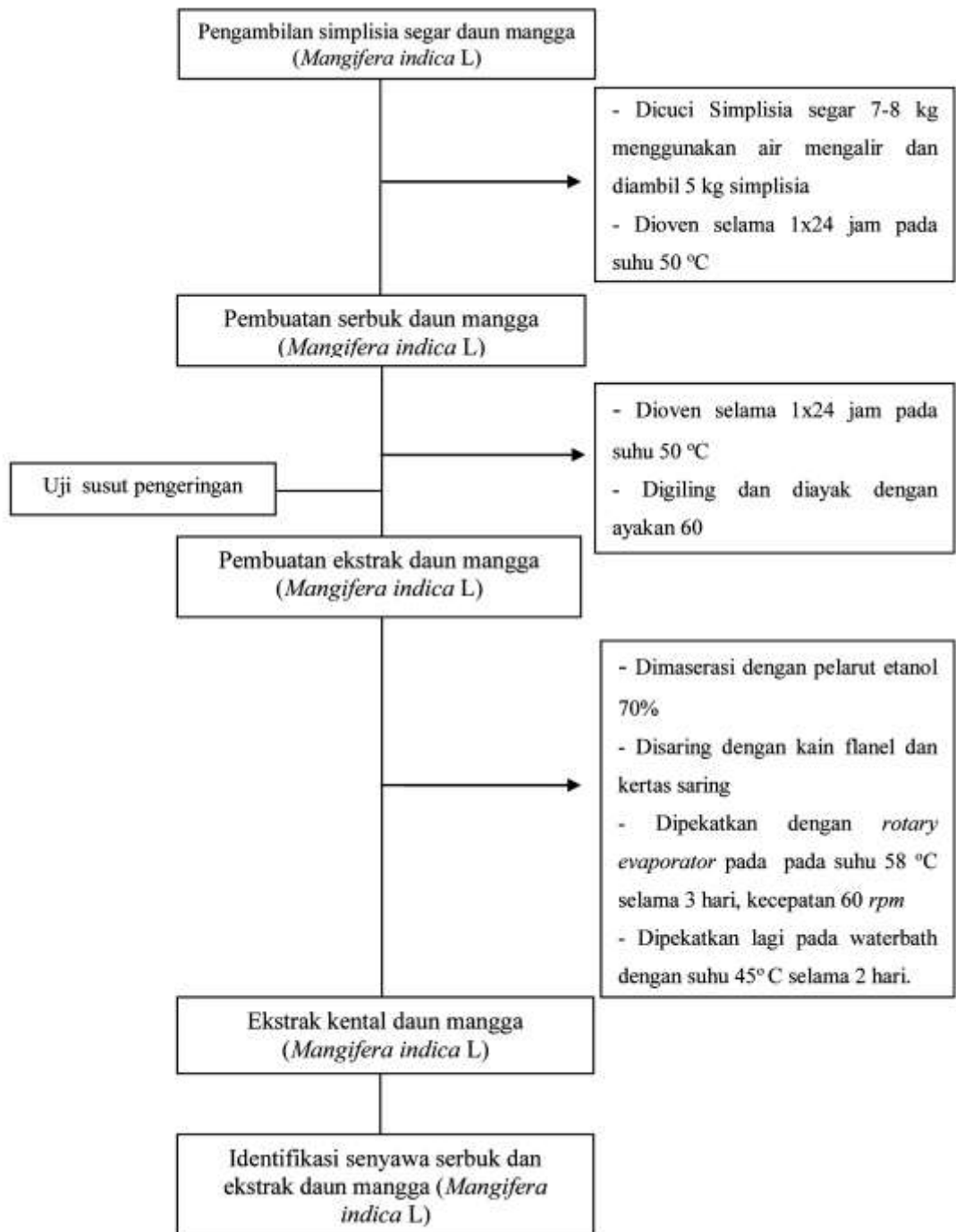
Parameter peningkatan daya ingat diukur berdasarkan jumlah lengan yang dimasuki dan kesalahan pilihan selama 10 menit pada metode *Maze Radial* 8 Lengan. Kesalahan, yang disebut sebagai kesalahan tipe B, terjadi jika tikus memasuki lengan *Maze Radial* 8 Lengan lebih dari separuh panjang lengan tetapi tidak memakan umpan yang telah disediakan (Hamidi, 2009). Perhitungan % daya ingat dapat dihitung dengan cara:

$$\text{Angka kesalahan tipe B} = \frac{\text{memasuki lebih dari setengah lengan pada maze radial delapan lengan tetapi tidak memakan umpan}}{\text{jumlah lengan yang dimasuki}} \times 100 \%$$

### 12. Analisa data

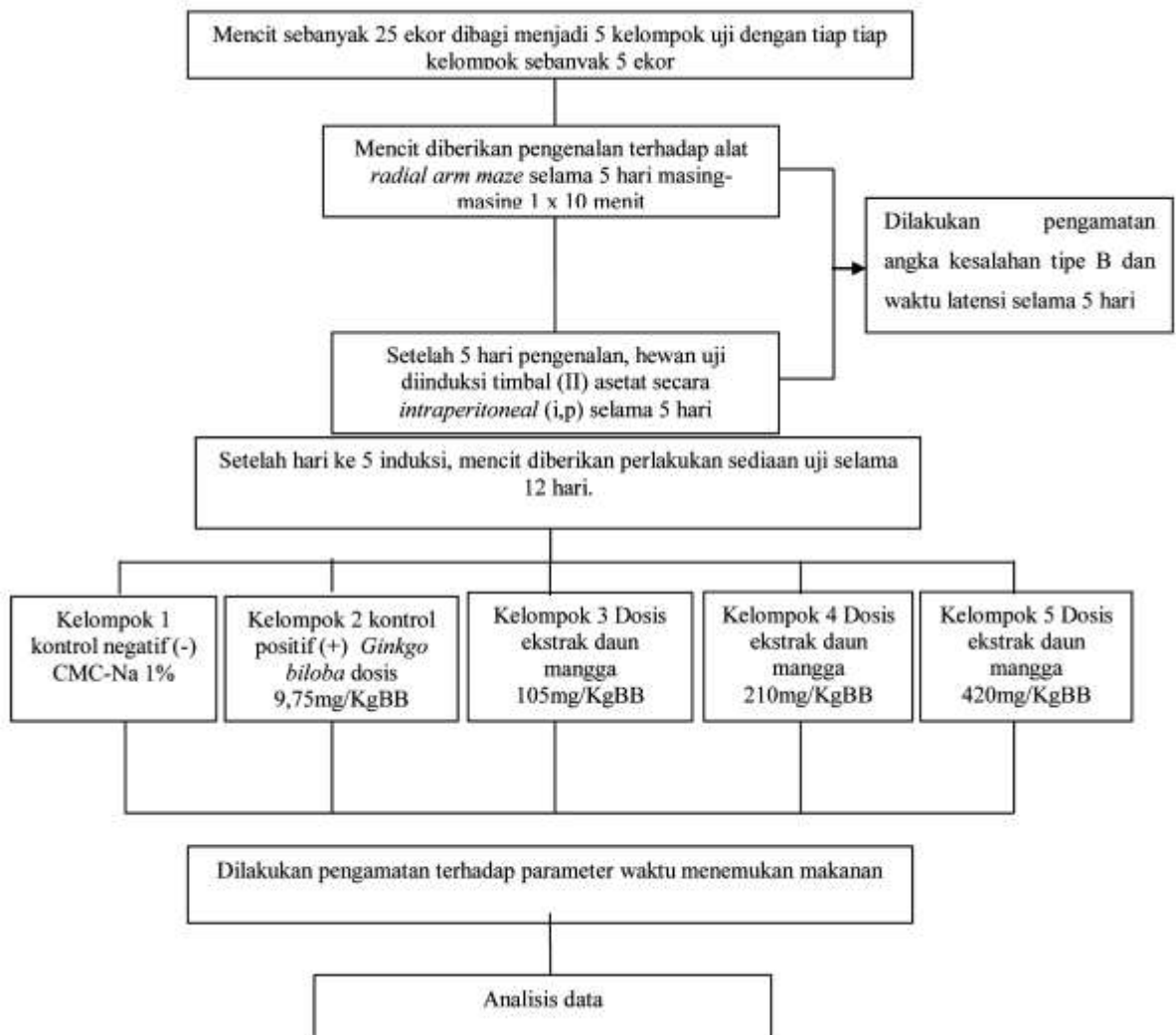
Data yang diperoleh, seperti waktu latensi dan persentase kesalahan B, dianalisis secara statistik dengan menerapkan uji Kolmogorov-Smirnov untuk menilai normalitas data. Selanjutnya, uji Levene digunakan untuk mengevaluasi homogenitas data. Jika data memenuhi syarat normalitas dan homogenitas, dilanjutkan dengan penerapan uji Anova satu arah. *One-Way Anova* digunakan untuk menilai apakah terdapat perbedaan yang signifikan dalam data. Jika hasil menunjukkan adanya perbedaan, analisis lanjutan dilakukan dengan uji *post-hoc tukey* untuk mengidentifikasi perbedaan yang signifikan secara spesifik. Jika data tidak memiliki distribusi normal, alternatifnya mencakup uji *kruskal-wallis*, uji *mann-whitney*, atau uji *wilcoxon*.

### E. Jalannya Penelitian



Gambar 5. Skema bahan alam





Gambar 6. Skema penelitian