

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dari penelitian ini adalah buah lempeni (*Ardisia elliptica Thunb.*) yang diperoleh dari daerah Lumajang, Jawa timur.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah buah lempeni (*Ardisia elliptica Thunb.*) yang diambil acak dari beberapa tanaman dan dipilih buah yang sudah siap panen untuk pembuatan simplisia.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama dalam penelitian ini adalah variasi dosis ekstrak buah lempeni.

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antidiare ekstrak etanol buah lempeni.

Variabel utama yang ketiga dalam penelitian ini adalah menggunakan metode proteksi *oleum ricini* pada hewan uji.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama berisi pengidentifikasi semua variabel yang diteliti langsung. Variabel utama yang akan diidentifikasi, antara lain adalah variabel bebas, variabel kendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk mempelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak buah lempeni (*Ardisia elliptica Thunb.*) dengan berbagai dosis.

Variabel kendali adalah variabel yang memengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditentukan kualifikasinya. Hasil yang didapatkan tidak tersebar dan penelitian dapat diulang oleh peneliti lain dan tepat. Penelitian ini variabel terkendalinya adalah kondisi fisik pada mencit antara lain, berat badan mencit, jenis kelamin, pakan yang diberikan, kondisi lingkungan, kondisi laboratorium dan peneliti sendiri.

Variabel tergantung merupakan inti permasalahan dalam penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini yaitu menurunnya frekuensi diare terhadap mencit putih tiap kelompok yang diberikan perlakuan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, buah lempeni adalah buah yang diperoleh dari daerah Lumajang, Jawa timur.

Kedua, dosis ekstrak buah lempeni adalah dosis yang diberikan kepada hewan uji. Dosis penelitian ditentukan dengan dilakukan orientasi dosis $\frac{1}{2}n$, $1n$, $2n$ dosis, sehingga dosis yang digunakan pada penelitian ini adalah dosis 200 mg/Kg BB, 300 mg/Kg BB, 600 mg/Kg BB mencit.

Ketiga, larutan penginduksi adalah larutan yang diberikan hewan uji yang diberikan untuk merangsang mukosa usus agar mengeluarkan isi usus lebih cepat. Induksi yang diberikan adalah *oleum ricini*.

Keempat, waktu mulai terjadinya diare (onset diare) merupakan parameter pengamatan dengan mencatat waktu mulainya diare pada saat mencit mengeluarkan feses dengan konsistensi cair untuk pertama kalinya.

Kelima, frekuensi diare adalah parameter pengamatan untuk mengetahui berapa kali hewan uji mengalami diare selama pengamatan berlangsung.

Keenam, Bobot feses adalah berat feses dengan konsistensi cair yang dikeluarkan oleh mencit selama pengamatan.

Ketujuh, lama terjadinya diare (durasi diare) adalah parameter yang digunakan untuk melihat berapa lama mencit mengalami diare.

Kedelapan, dosis efektif adalah dosis yang memiliki aktivitas antidiare terkecil yang tidak berbeda bermakna dengan kontrol positif atau berbeda bermakna dengan kontrol negatif.

C. Alat, Bahan, dan Hewan Uji

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah oven, blender, timbangan analitik, ayakan ukuran 40 mesh, bejana maserasi, *rotary evaporator*, *Mouisture balance* (OHAUS MB23), *Waterbath*, erlemeyer (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), Beaker glass (Pyrex), batang pengaduk, mortir dan stamper, kandang mencit, stopwatch, sonde oral, kain flannel, kertas label, spidol, rak dan tabung reaksi, wadah untuk hasil ekstraksi. Jar kaca, pipet tetes, kertas saring, Plat KLT, chamber.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah buah lempeni, minyak jarak (*Oleum ricini*), sediaan tablet loperamid HCl, pelarut

etanol 70%, Aquadest, CMC Na 0,5 %, n-heksan, toluene, aseton, etil asetat, CHCl_3 larutan HCl pekat, FeCl_3 1%, klorofom, asam formiat, dietilamin, methanol, pereaksi mayer-wagner, Asam klorida pekat, H_2SO_4 pekat, serbuk mg, amil alkohol, asam galat, kuersetin, pereaksi liberman-Burchard, Pereaksi sitroborat.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih (*Mus musculus*) yang dewasa dengan berat rata-rata 20 gram. Mencit yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 25 ekor mencit. Mencit dikelompokkan menjadi 5 kelompok perlakuan. Kelompok 1 sebagai kontrol negatif, kelompok 2 sebagai kontrol positif, kelompok 3,4,5 sebagai kelompok perlakuan.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan sampel buah lempeni

Sampel buah lempeni diambil dari daerah Lumajang, Jawa timur. Pengambilan buah lempeni dilakukan pada saat buah lempeni sudah matang dan siap panen, menerima sinar matahari dengan sempurna.

2. Determinasi tanaman lempeni

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman lempeni (*Ardisia elliptica* Thunb) dengan melakukan determinasi. Determinasi dilakukan di unit Laboratorium Universitas Setia Budi.

3. Penyiapan dan pengeringan bahan

Buah lempeni yang sudah diperoleh kemudian dikumpulkan dan dilakukan pencucian dengan air bersih untuk menghilangkan kotoran yang melekat dan cemaran. Buah yang sudah dicuci lalu ditiriskan, kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari dengan di tutup menggunakan kain hitam dan diangin-anginkan di udara yang terlindung dari sinar matahari langsung. Tujuan pengeringan adalah untuk mengurangi kadar air pada buah, sehingga mencegah terjadinya perubahan kimiawi dan enzimatik yang dapat menurunkan kualitas dan mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri. Simplisa kering disimpan di dalam sebuah wadah yang tertutup.

4. Pembuatan serbuk buah lempeni

Pembuatan serbuk buah lempeni dilakukan dengan cara diserbuk dengan mesin penyerbuk atau blender dan diayak dengan

ayakan 40 mesh sehingga diperoleh serbuk yang mempunyai derajat kehalusan relatif homogen. Simplisia yang sudah menjadi serbuk disimpan dalam wadah tertutup untuk selanjutnya dilakukan proses ekstraksi.

5. Penetapan susut pengeringan serbuk buah lempeni

Penetapan susut serbuk buah lempeni menggunakan *moisture balance*, masing-masing serbuk ditimbang sebanyak 2 gram diatas wadah alumunium, kemudian mengatur temperature pada suhu 105⁰ C lalu alat dinyalakan, tunggu sampai alat selesai menunjukkan nilai susut pengeringan. Penetapan susut pengeringan serbuk buah lempeni dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Syarat susut pengeringan tidak boleh lebih dari 10% untuk simplisia.

6. Pembuatan ekstrak etanol buah lempeni

Serbuk buah lempeni diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 70% sebagai pelarut. Sebanyak 500 gram serbuk simplisia buah lempeni dimasukkan ke dalam botol gelap lalu ditambahkan 5L etanol 70% lalu ditutup dengan kapas dan dilapisi alumunium foil. Rendam ekstrak kira-kira 6 jam pertama sambil sekali diaduk, kemudian biarkan selama 18 jam. Melakukan filtrasi untuk memisahkan maserat, lalu filtrat dipisahkan dengan ampas menggunakan kain flannel. Ampas ditambahkan dengan pelarut yang sebanyak setengah kali pelarut pertama kemudian rendam kembali ekstrak selama 6 jam pertama sambil sekali diaduk, kemudian biarkan selama 18 jam, saring filtrat kemudian dipekatkan. Pemekatan filtrat dilakukan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 40⁰C dan untuk memperoleh sediaan kental filtrate harus diuapkan dengan *waterbath* pada suhu 40-65⁰C sampai dihasilkan ekstrak kental.

7. Karakterisasi ekstrak etanol buah lempeni

Penetapan kadar air ekstrak etanol buah lempeni. Pengujian kadar air ekstrak buah lempeni dengan cara destilasi toluene. Toluene yang digunakan dijenuhkan terlebih dahulu dengan air, setelah dikocok dan didiamkan, kedua lapisan air dan toluene akan memisah. Untuk lapisan air nya dibuang. Sebanyak 5 gram ekstrak buah lempeni ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam labu alas bulat dan ditambahkan toluene 200 ml fase toluene. Alat dipasang dan dituang toluene yang telah dijenuhkan. Labu dipanaskan selama 15 menit, setelah toluene mulai mendidih penyulingan diatur 2 tetes/ detik selama

5 menit lalu 4 tetes/detik. Volume air dibaca setelah fase toluen dan fase air memisah.

8. Identifikasi bebas alkohol

Dilakukan dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambahkan dengan H_2SO_4 pekat dan CH_3COOH kemudian dipanaskan. Uji positif bebas alkohol jika tidak terbentuk bau ester yang khas dari alkohol.

9. Identifikasi kualitatif kandungan kimia ekstrak buah lempeni

Uji kualitatif kandungan kimia yang terkandung pada buah lempeni bertujuan untuk membuktikan kebenaran bahan atau zat yang terkandung.

9.1. Identifikasi flavonoid. 0,5 gram ekstrak etanol buah lempeni ditimbang lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk Mg, amil alkohol dan larutan HCl pekat. Adanya perubahan warna larutan amil alkohol mejadi warna merah bata menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Ichsani, 2021).

9.2. Identifikasi alkaloid 0,5 gram ekstrak etanol buah lempeni ditimbang, kemudian masukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan HCl 1% dan saring. Filtrat dibagi menjadi dua bagian dan diperiksa menggunakan beberapa tetes pereaksi mayer dan wagner. Reaksi positif alkaloid ditunjukkan dengan adanya endapan putih-kuning dengan pereaksi mayer dan teebentuk endapan coklat kemerahan pada penambahan pereaksi wagner (Najib, 2018)

9.3. Identifikasi tannin. 0,5 gram ekstrak etanol buah lempeni di masukkan ke dalam tabung reaksi tambahkan akuades, lalu dipanaskan. Saring ekstrak yang telah dipanaskan dan tambahkan beberapa tetes larutan $FeCl$ 0,1%. Hasil positif terdapat senyawa tanin jika terjadi perubahan warna menjadi hijau kecokelatan atau warna biru hitam (Najib,2018).

9.4. Identifikasi steroid. 0,5 gram ekstrak etanol buah lempeni ditambahkan 2-3 ml kloroform, lalu ditambahkan 10 tetes asam asetat anhidrat dikocok dan masukkan 1 ml H_2SO_4 pekat dengan hati-hati. Steroid positif ditunjukkan dengan terbentuk warna coklat kemerahan.

9.5. Identifikasi saponin. 0,5 gram ekstrak etanol buah lempeni dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan kurang lebih 2 ml air suling, kemudian tabung reaksi di kocok. Diamkan selama 30 detik. Tambahkan larutan asam klorida pekat. Positif terdapat senyawa

saponin jika pada tabung reaksi busa tetap stabil setelah dikocok dan ditambahkan asam klorida pekat (Najib, 2018).

10. Identifikasi senyawa ekstrak etanol buah lempeni menggunakan KLT

10.1 Flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan menotolkan ekstrak pada lempeng KLT. Fase diam yang digunakan adalah silica gel GF₂₅₄, menggunakan fase gerak CHCl₃ : Metanol (8:2). Identifikasi flavonoid menggunakan pembanding kuersetin. Senyawa flavonoid akan berflurosensi pada sinar UV 366 nm. Hasil positif menunjukkan flavonoid apabila terbentuk flurosensi berwarna hijau kuning dengan UV 366 nm setelah penyemprotan dengan menggunakan pereaksi sitroborat, setelah disemprot pereaksi KLT di oven pada suhu 110°C (Hanani, 2015).

10.2. Tanin. Identifikasi tanin dengan menggunakan fase diam silica gel GF₂₅₄, dan menggunakan fase gerak toluene : aseton : asam formiat (3 : 3 : 0,5) pada sinar UV 254 nm terdapat warna ungu gelap dan pada sinar UV 366 nm terdapat warna hijau. Identifikasi tanin dengan menggunakan pereaksi semprot FeCl₃ 1% menghasilkan warna hijau coklat kehitaman, setelah disemprot pereaksi KLT di oven pada suhu 110°C (Najib, 2018).

11. Pengujian aktivitas antidiare ekstrak etanol buah lempeni pada mencit putih

Pengujian aktivitas antidiare dari ekstrak etanol buah lempeni dengan menggunakan mencit putih yang telah dipuaskan terlebih dahulu selama 16-18 jam sebelum perlakuan. Pengujian aktivitas antidiare menggunakan 5 kelompok perlakuan. CMC-Na sebagai kontrol negatif, loperamid HCl sebagai kontrol positif, pemberian dosis 200mg/Kg BB mencit, 300mg/Kg BB mencit, 600mg/Kg BB mencit. Perlakuan uji pada 5 kelompok perlakuan diawali dengan pemberian oleum ricini sebanyak 0,5ml terhadap masing-masing mencit tiap kelompok perlakuan. Parameter uji yang diamati dalam penelitian ini adalah waktu awal terjadinya diare (onset diare), frekuensi diare, bobot feses dan lama terjadinya diare (durasi diare).

11.1. Parameter onset diare. Waktu mulai terjadinya diare (onset diare) merupakan parameter pengamatan dengan mencatat waktu mulai terjadinya diare dengan menggunakan *stopwatch* saat mencit putih mengeluarkan feses dengan konsistensi cair untuk pertama kalinya.

11.2. Parameter frekuensi diare. Frekuensi diare merupakan parameter untuk mengetahui berapa kali hewan uji mengalami diare selama pengamatan.

11.3. Parameter bobot feses. Bobot feses merupakan parameter untuk mengetahui berat feses cair yang dikeluarkan oleh mencit putih selama pengamatan.

11.4. Parameter durasi diare. Lama terjadinya diare (durasi diare) merupakan parameter yang digunakan untuk melihat berapa lama mencit mengalami diare.

12. Pembuatan larutan uji

12.1. Pembuatan suspensi CMC-Na 0,5 %. CMC 0,5 % b/v berarti bahwa ditimbang 500 mg Na-CMC, larutkan dengan 50 mL air panas, kemudian masukkan ke dalam labu takar 100 ml, lalu ditambahkan air suling hingga 100 mL.

12.2. Pembuatan suspensi loperamid. Mengambil 1 tablet loperamid yang mengandung 2 mg digerus sampai halus, lalu timbang Na-CMC 500mg ditambahkan aquadest hangat lalu digerus sampai terbentuk mucilago, setelah itu serbuk loperamid dimasukkan dalam mortir digerus sampai homogen, ditambahkan aquadest ad 100 mL.

12.3. Pembuatan suspensi ekstrak etanol buah lempeni. Ditimbang 2 gram ekstrak etanol buah lempeni dimasukkan dalam mortir, lalu ditimbang Na CMC 500mg ditambahkan aquadest hangat lalu digerus sampai terbentuk mucilago, setelah itu ekstrak etanol buah lempeni kental dimasukkan dalam mortir digerus sampai homogen, ditambahkan aquadest ad 100 mL.

13. Perhitungan dosis

13.1. Perhitungan dosis CMC 0,5%. Pemberian CMC 0,5% sebagai kontrol negatif pada mencit sebanyak 0,5 ml/ ekor mencit.

13.2. Perhitungan dosis loperamid. Penelitian ini obat yang digunakan untuk antidiare yang berlaku sebagai kontrol positif. Dosis lazim yang digunakan untuk manusia ke mencit 20 gram adalah 0,0026. Dosis loperamid untuk mencit adalah $2 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,0052 \text{ mg} / 20 \text{ g BB mencit}$.

13.3. Perhitungan dosis Ekstrak etanol buah lempeni. Dosis sediaan uji diberikan berdasarkan hasil orientasi dosis yang didapat yaitu 200mg/ Kg BB mencit, 300 mg / Kg BB mencit dan 600 mg / Kg BB mencit .

14. Pengelompokan dan perlakuan hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih (*Mus musculus*) yang berumur 2-3 bulan dengan berat rata-rata 20 gram. Hewan uji yang digunakan dibagi menjadi 5 kelompok menggunakan rumus federer sebagai berikut :

$$\text{Rumus Federer : } (n-1) (t-1) \geq 15$$

Keterangan : n : besar sampel tiap kelompok

t : Jumlah kelompok

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

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit yang diberikan perlakuan secara oral. 25 ekor mencit di adaptasi selama 1 minggu dan dipuaskan selama 16-18 jam sebelum perlakuan. Metode yang digunakan adalah metode proteksi terhadap *oleum ricini* yaitu mencit diberikan 0,5 ml *oleum ricini* secara oral dan didiamkan selama 1 jam, kemudian masing-masing kelompok diberikan perlakuan yaitu :

Kelompok I : Diberikan Na CMC 0,5 % sebagai kontrol negatif

Kelompok II : Diberikan loperamid HCl sebagai kontrol positif

Kelompok III : Perlakuan ekstrak etanol buah lempeni 200mg/KgBB mencit

Kelompok IV : Perlakuan ekstrak etanol buah lempeni 300mg /KgBB mencit

Kelompok V : Perlakuan ekstrak etanol buah lempeni 600mg/KgBB mencit

15. Parameter yang diamati

Waktu mulai terjadinya diare (onset diare) adalah dengan mencatat waktu mulainya diare dengan menggunakan *stopwatch* saat mencit mengeluarkan feses dengan konsistensi cair untuk pertama kalinya. Lama terjadinya diare (durasi diare) merupakan parameter yang digunakan untuk melihat berapa lama suatu mencit mengalami diare, dihitung dari awal terjadinya diare sampai waktu berakhirnya diare. Frekuensi diare merupakan parameter untuk mengetahui berapa kali hewan uji mengalami diare selama pengamatan. dan bobot feses

merupakan bobot feses cair yang dikeluarkan oleh mencit selama pengamatan.

E. Analisis Data

Data yang diperoleh meliputi empat data diantaranya data awal terjadinya diare(onset diare), bobot feses, frekuensi diare, dan lama terjadinya diare(durasi diare) pada saat perlakuan. Hasil uji aktivitas anti diare ekstrak buah lempeni yang diperoleh di analisis menggunakan uji *Statistical Product and Service Solution* (SPSS). Data hasil percobaan akan di kumpulkan dan dilakukan pengujian normalitas dan homogenitas apakah data terdistribusi normal atau tidak dan apakah data tersebut homogen atau tidak. Pengujian data uji normalitas menggunakan uji *Shapiro wilk*. Data yang terdistribusi normal dan homogen dilanjutkan di analisis dengan menggunakan uji *one way ANOVA*, namun jika data menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* menggunakan uji *tukey HSD* untuk mengetahui perbedaan antara satu dengan yang lainnya. Namun jika data tidak terdistribusi normal maka dilakukan menggunakan uji *Kruskal-Wallis Test* dan uji lanjutan *Mann-Whitney Test*.