

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini menggunakan daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*) yang diperoleh dari dataran rendah Kecamatan Balerejo, Kabupaten Madiun, Jawa Timur dengan ketinggian 65 mdpl, dan Kecamatan Jatiroto, Kabupaten Wonogiri, Jawa Tengah dengan ketinggian 535 mdpl, serta dataran tinggi Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah dengan ketinggian 1500 mdpl.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*) dari daerah Madiun, Wonogiri, dan Karanganyar yang masih segar, tidak rusak, dan bebas dari penyakit.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama dari penelitian ini adalah ekstrak etanol daun nangka dari daerah Madiun, Wonogiri, dan Karanganyar diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antidiare ekstrak etanol daun nangka.

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

2. Klasifikasi variabel utama

Pada suatu penelitian, variabel utama diklasifikasikan menjadi variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang direncanakan oleh peneliti, untuk diketahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*) dari daerah Madiun, Wonogiri, dan Karanganyar.

Variabel tergantung adalah variabel yang diukur dan diamati untuk mengetahui pengaruh yang ditimbulkan dari variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah menurunnya frekuensi

feses terhadap mencit jantan galur swiss Webster tiap kelompok perlakuan.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu ditentukan kualifikasinya. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah kondisi fisik mencit, antara lain berat badan, jenis kelamin, pakan yang diberikan, dan kondisi lingkungan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*) adalah daun yang sudah dipanen dari daerah Madiun, Wonogiri, dan Karanganyar dengan keadaan masih segar diproses dengan sortasi basah, dicuci dan dipilah sesuai kriteria, kemudian ditiriskan dan dikeringkan dengan meletakkan daun nangka ditempat terbuka lalu ditutup dengan kain agar tidak terpapar matahari langsung, kemudian daun disortasi kering dan dihaluskan memakai blender, setelah itu diayak.

Kedua, tempat tumbuh adalah tempat bertumbuhnya tanaman nangka dari tiga tempat tumbuh dari dataran rendah, dataran medium, dan dataran tinggi.

Ketiga, ekstrak etanol daun nangka adalah ekstrak etanol daun nangka yang diperoleh dari ekstraksi metode maserasi dengan pelarut etanol 70% sebagai pelarut dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan ekstrak kental.

Keempat, mencit jantan adalah mencit galur swiss Webster, dengan berat 20-30 gram dan memiliki usia 2-3 bulan.

Kelima, onset diare adalah parameter yang digunakan untuk mengetahui awal terjadinya hewan uji mengalami diare.

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

Ketujuh, bobot feses adalah parameter untuk mengetahui berapa bobot feses hewan uji.

Kedelapan, lama terjadinya diare adalah parameter yang digunakan untuk mengetahui berapa lama hewan uji mengalami diare.

C. Bahan, Alat, dan Hewan Uji

1. Alat

Alat yang digunakan untuk membuat ekstrak daun nangka adalah oven, blender, ayakan ukuran 40 mesh, dan neraca analitik.

Dalam proses maserasi menggunakan seperangkat alat maserasi, seperangkat pompa vacuum dan vacuum evaporator. Alat yang digunakan dalam uji aktivitas antidiare adalah spuit injeksi, mortir, stemper, jarum oral, timbangan hewan uji, kertas saring, kertas kassa, *stopwatch*, botol.

2. Bahan

Daun nangka dari daerah Madiun, Wonogiri, dan Karanganyar yang masih segar, etanol 70%, loperamid HCl, aquades, FeCl₃, *oleum ricini*, asam klorida. CMC-Na 0,5%, larutan HCl pekat, pereaksi Mayer-Wagner, H₂SO₄ pekat, serbuk mg, CH₃COOH, kloroform, anhidra asetat.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan galur swiss Webster berumur 2-3 bulan dengan berat badan 20-40 gram. Mencit yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 24 ekor mencit. Mencit dikelompokkan menjadi 6 kelompok perlakuan yaitu kontrol normal, kontrol negatif, kontrol positif, kelompok perlakuan ekstrak daerah Madiun, kelompok perlakuan ekstrak daerah Wonogiri, dan kelompok perlakuan ekstrak daerah Karanganyar.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman daun nangka bertujuan untuk mengetahui identitas dari tanaman yang belum diketahui, dengan cara mengamati 21 morfologi daun nangka dengan mendeskripsikan secara detail. Determinasi tanaman dilakukan di B2P2TOOT Tawangmangu.

2. Pengambilan bahan

Daun nangka diambil dari beberapa tempat tumbuh dari daerah dataran rendah Kecamatan Balerejo, Kabupaten Madiun, Jawa Timur, dan Kecamatan Jatiroto, Kabupaten Wonogiri, Jawa Tengah serta dataran tinggi Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Daun yang diambil adalah daun yang masih segar dan tidak rusak. Daun nangka dicuci dengan air mengalir sampai bersih agar tidak ada kotoran atau benda asing yang menempel pada daun nangka.

3. Pembuatan serbuk simplisia

Proses awal pembuatan ekstrak adalah pembuatan serbuk simplisia. Ini dibuat dari simplisia utuh atau potongan simplisia yang

sudah dikeringkan, proses pembuatan serbuk yang dilakukan dengan suatu alat tanpa menyebabkan suatu kerusakan atau kehilangan kandungan kimia yang dibutuhkan. Serbuk simplisia diayak menggunakan ayakan nomor pengayak no 40 mesh hingga diperoleh simplisia halus (Kemenkes RI, 2017).

4. Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak daun nangka dipisahkan dengan cara maserasi dengan menggunakan etanol 70% sebagai bahan larut. Serbuk simplisia daun nangka sebanyak 500 gram dimasukkan ke dalam botol gelap, kemudian ditambahkan etanol 70% sebanyak 5 L, kemudian ditutup dengan kapas dan ditutup dengan alumunium foil. Rendam konsentrat terlebih dahulu selama kurang lebih 6 jam, aduk sesekali, lalu diamkan selama 18 jam.

Melakukan filtrasi untuk memisahkan maserat, lalu filtrat dipisahkan dengan ampas menggunakan kain flannel. Ampas ditambahkan setengah kali pelarut pertama. Setelah itu, ekstrak direndam selama enam jam pertama sambil diaduk sesekali. Kemudian biarkan selama delapan belas jam, saring filtrat kemudian dipekatkan. Pemekatan filtrat dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dan untuk memperoleh sediaan kental filtrat harus diuapkan dengan *waterbath* pada suhu 40-65°C sampai dihasilkan ekstrak kental. Kemudian ekstrak kental daun nangka dilakukan uji bebas etanol dan siap digunakan untuk penelitian selanjutnya (Kemenkes RI, 2017). Rendemen ekstrak dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ rendemen} : \frac{\text{bobot ekstrak kental}}{\text{bobot serbuk simplisia}} \times 100\% \quad (1)$$

5. Susut pengeringan ekstrak etanol daun nangka

Susut pengeringan ekstrak menggunakan teknik gravimetri. Timbang 1 gram sampel, masukkan ke dalam wadah yang telah di tara. Keringkan pada suhu 105°C selama 5 jam, dan ukur. Kemudian, keringkan dan timbang selama 1 jam hingga perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut menjadi sekitar 0,25% (Kemenkes RI, 2017).

6. Uji bebas alkohol ekstrak etanol daun nangka

Identifikasi bebas alkohol dilakukan melalui uji esterifikas yaitu ekstrak ditambahkan H₂SO₄ pekat dan CH₃COOH kemudian dipanaskan. Uji positif bebas alkohol apabila tidak terbentuk bau ester dari alkohol.

7. Identifikasi kualitatif kandungan kimia ekstrak etanol daun nangka

Uji kualitatif kandungan kimia yang terkandung pada daun nangka bertujuan untuk membuktikan kebenaran bahan atau zat yang terkandung.

7.1 Identifikasi flavonoid. Sampel ekstrak sebanyak 0,1 gram dilarutkan dalam etanol panas, kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium dan 5 tetes HCl pekat. Positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna jingga.

7.2 Identifikasi tanin. Sampel ekstrak sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan beberapa tetes larutan FeCl_3 . Hasil positif tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru kehitaman.

7.3 Identifikasi saponin. Sampel ekstrak sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 10 mL air panas dikocok kurang lebih 1 menit. Saponin positif jika terbentuk busa yang stabil tidak kurang dari 10 menit setinggi 1 sampai 10 cm dan dengan penambahan 1 tetes HCl 2 N buih tidak hilang (Mien *et al.*, 2015).

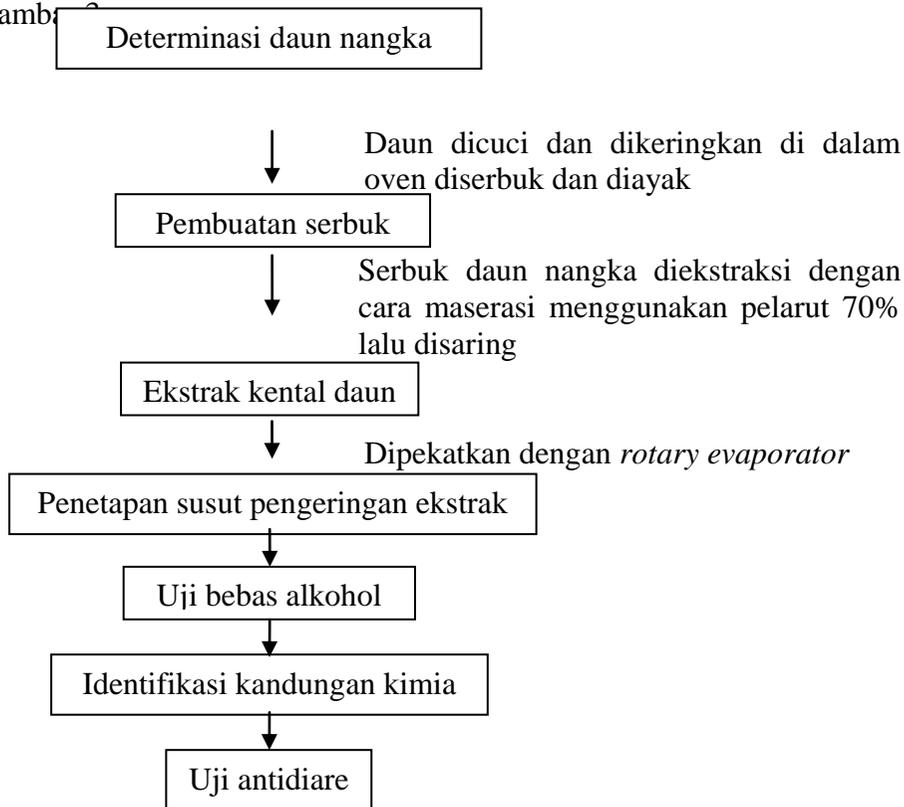
7.4 Identifikasi Alkaloid. Sampel ekstrak sebanyak 0,1 gram dilarutkan dalam 10 ml CHCl_3 (kloroform) dan 4 tetes NH_4OH kemudian disaring dan filtratnya dimasukkan kedalam tabung reaksi. Ekstrak CHCl_3 dalam tabung reaksi kemudian dikocok dengan ditambah 10 tetes H_2SO_4 2 M, sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan asam yang berada di atas dipisahkan ke dalam tabung reaksi lain dan ditambahkan pereaksi Meyer sehingga menghasilkan endapan warna putih, sedangkan penambahan pereaksi Dregendorff akan menghasilkan endapan warna merah jingga.

7.5 Identifikasi Fenol. Sampel ekstrak sebanyak 0,1 gram diekstraksi dengan 20 ml metanol 70%. Larutan yang dihasilkan diambil sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 5%. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau atau hijau kebiruan.

7.6 Identifikasi Triterpenoid dan Steroid. Sampel ekstrak sebanyak 0,1 gram dilarutkan dengan metanol dan kemudian di uapkan diatas *waterbath*. Fitrat digerus kemudian dilarutkan dengan 2 ml kloroform dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 tetes anhidrida asetat, kemudian larutan ditetesi dengan H_2SO_4 pekat \pm 3 tetes melalui dinding tabung reaksi. Jika hasil yang didapat berupa

cincin kecoklatan atau violet pada batas dua pelarut, hal ini menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan adanya warna hijau menunjukkan adanya steroid.

Skema pembuatan ekstrak etanol daun nangka dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanol daun nangka

8. Perhitungan dosis

8.1 Perhitungan dosis CMC-Na 0,5%. Pemberian CMC 0,5% sebagai kontrol negatif pada mencit sebanyak 0.5 ml/20 gBB mencit.

8.2 Perhitungan dosis loperamid HCl. Pemberian loperamid sebagai kontrol positif. Konversi dosis pada manusia ke mencit 20 gram adalah 0,0026. Dosis loperamid untuk mencit $2 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,0052 \text{ mg/KgBB}$ mencit.

8.3 Perhitungan dosis ekstrak etanol daun nangka. Dosis sediaan uji yang akan diberikan pada kelompok perlakuan dengan variasi dosis yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ekstrak etanol daun nangka dari beberapa tempat tumbuh sebesar 500 mg/KgBB mencit yang diperoleh dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Santoso dan Fibri (2018).

9. Dosis

Rancangan dosis dibuat pada masing-masing kelompok perlakuan kontrol positif dengan loperamid HCl dosis 0,0052 mg/KgBB mencit, kontrol negatif dengan CMC-Na dosis 0,5 ml/KgBB mencit, kelompok daerah Madiun dengan dosis 500 mg/KgBB mencit, kelompok daerah Wonogiri dengan dosis 500 mg/KgBB mencit, kelompok daerah Karanganyar dengan dosis 500 mg/KgBB mencit.

10. Pembuatan larutan uji dan penginduksi

10.1 Pembuatan CMC-Na 0,5% (b/v). Larutan CMC-Na 0,5% dibuat dengan menimbang CMC-Na sebanyak 500 mg kedalam 10 ml aquades panas, ditutup dan dibiarkan selama kurang lebih 30 menit hingga diperoleh massa yang homogen dan diencerkan dengan aquades hingga volume 100 ml.

10.2 Pembuatan suspensi loperamid HCl. Tablet Loperamid HCl 2 mg. Tablet digerus sampai halus, lalu timbang CMC-Na 500 mg ditambahkan aquades hangat lalu digerus, setelah itu serbuk loperamid dimasukkan dalam mortir digerus sampai homogen, ditambahkan aquadest ad 100 mL.

10.3 Pembuatan suspensi ekstrak etanol daun nangka. Timbang 5000 mg ekstrak etanol daun nangka dimasukkan dalam mortir, lalu ditimbang CMC-Na 0,5% ditambahkan aquadest hangat lalu digerus sampai terbentuk mucilage, setelah itu ekstrak etanol daun nangka dimasukkan dalam mortir digerus sampai homogen, ditambahkan aquadest ad 100 mL.

Tabel 1. Dosis yang digunakan

Kelompok	Perlakuan	Dosis
Kontrol normal	Tanpa perlakuan	-
Kontrol positif	<i>Oleum ricini</i> + loperamide HCl	0,0052 mg/KgBB mencit
Kontrol negatif	<i>Oleum ricini</i> + CMC-Na	0,5 ml/KgBB mencit
Kelompok daerah Madiun	<i>Oleum ricini</i> + Ekstrak daun nangka	500 mg/KgBB mencit
Kelompok daerah Wonogiri	<i>Oleum ricini</i> + Ekstrak daun nangka	500 mg/KgBB mencit
Kelompok daerah Karanganyar	<i>Oleum ricini</i> + Ekstrak daun nangka	500 mg/KgBB mencit

11. Parameter yang diamati

Parameter yang diamati frekuensi buang air besar (BAB) yang lebih sering, perubahan tekstur feses yang lebih encer. Onset diare, mencatat waktu mulainya diare setelah pemberian *oleum ricini*. Frekuensi diare, menghitung berapa kali jumlah hewan uji mengalami

diare setiap 30 menit selama 6 jam pengamatan. Bobot feses ditimbang (satuan gram) setiap 30 menit selama 6 jam setelah perlakuan. Lama terjadinya diare mencatat selisih waktu terakhir mengalami diare dengan waktu awal mengalami diare (menit).

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan mencit jantan galur swiss Webster yang berumur 2-3 bulan. Hewan uji dibagi menjadi 6 kelompok menggunakan rumus federer sebagai berikut :

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

$$(n-1) (6-1) \geq 15$$

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

$$5n - 5 \geq 15$$

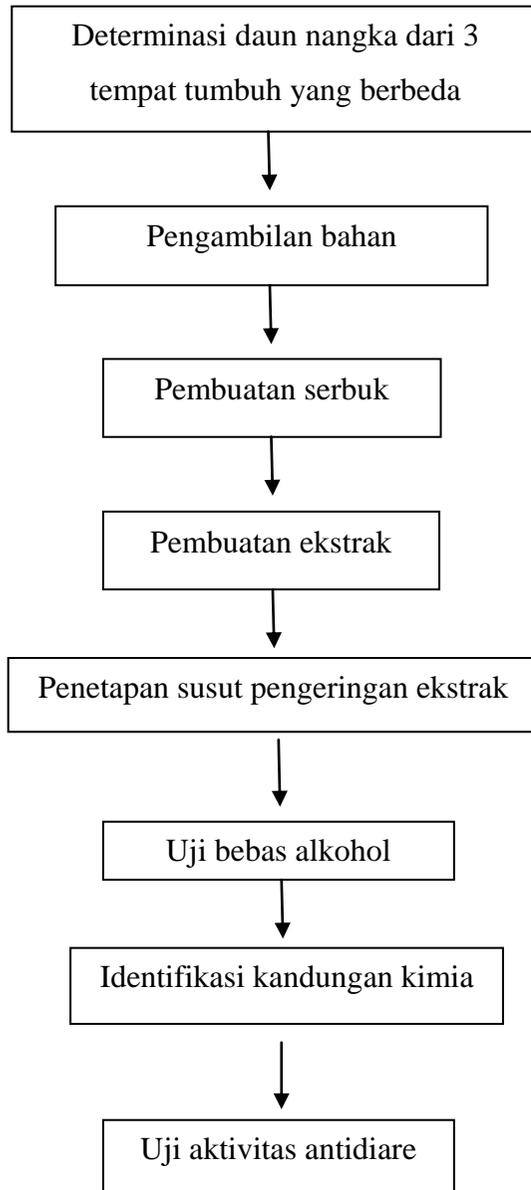
$$5n \geq 15 + 5$$

$$5n \geq 20$$

$$n = 4$$

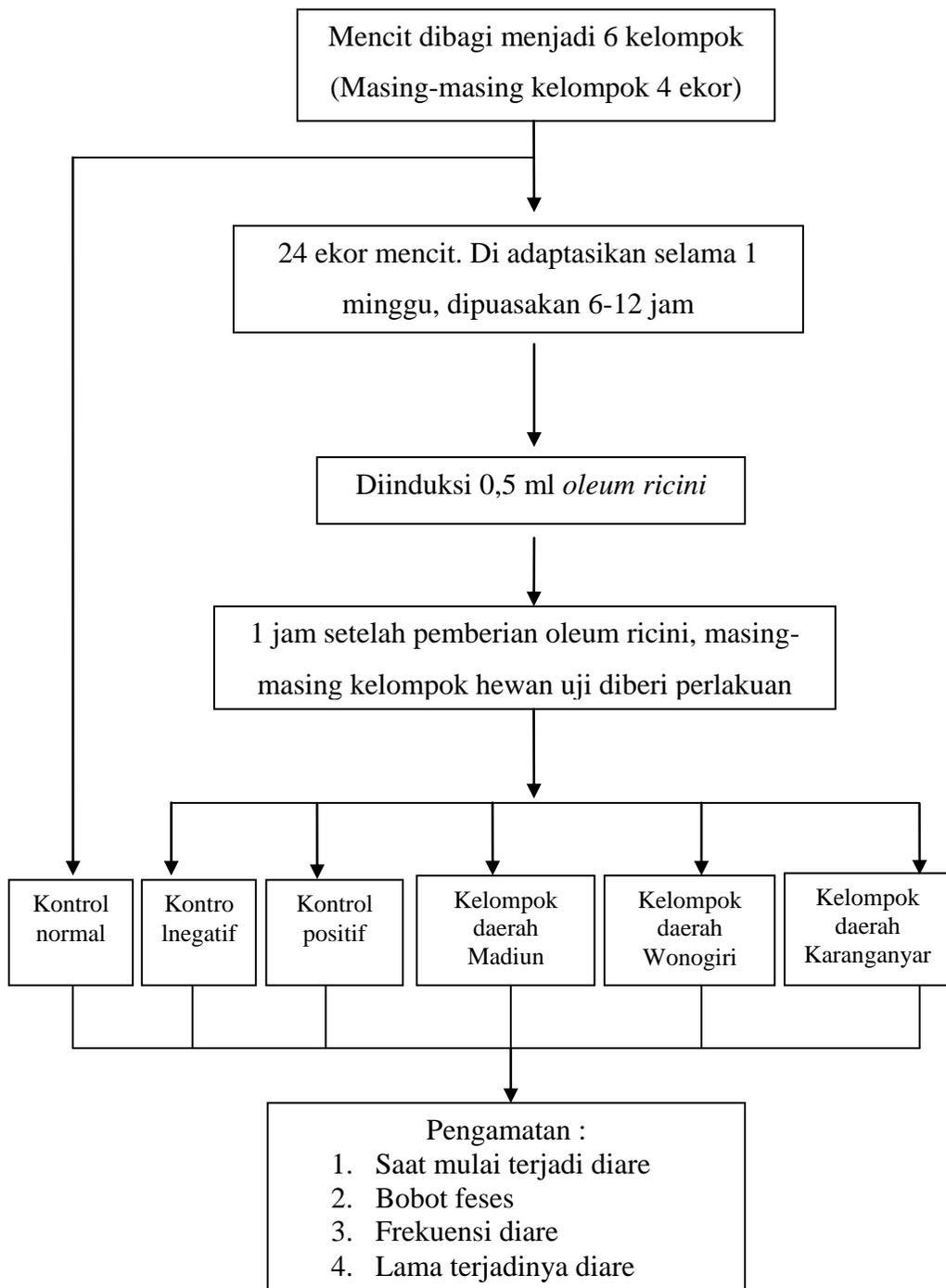
E. Skema Penelitian

1. Pembuatan ekstrak



Gambar4. Skema pembuatan ekstrak

2. Pengamatan perlakuan uji



Gambar5. Skema jalannya penelitian

F. Analisis Hasil

Analisis hasil pengamatan dianalisis menggunakan uji *Statistical Product and Service Solution* (SPSS). Data dikumpulkan dan dilakukan pengujian normalitas menggunakan uji *Saphiro-wilk*. Setelah memenuhi syarat dianalisis secara statistik dengan metode *One-way ANOVA*, jika data menunjukkan perbedaan yang signifikan dilanjutkan menggunakan uji *Post Hoc* dengan metode *Least Significant Different* (LSD)