

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah seluruh objek penelitian atau yang akan diteliti. Salak pondoh yang diperoleh dari petani di Imorejo, Kec Turi, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta dijadikan sebagai populasi dalam penelitian ini.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi. Penelitian ini menggunakan kulit salak pondoh dari buah salak segar, matang diperoleh dari petani di Imorejo, Kec Turi, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta sebagai sampel.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol kulit salak pondoh yang telah dimaserasi dengan pelarut etanol 70% dan diujikan secara oral pada tikus putih.

Variabel kedua adalah besaran kisaran dosis LD₅₀ dan gejala toksik pada tikus putih galur wistar.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama memuat identifikasi semua variabel yang diteliti langsung dan dapat diklasifikasikan kedalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah ekstrak etanol kulit salak pondoh pada berbagai dosis uji toksisitas akut pada tikus putih jantan galur Wistar.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek toksisitas akut dari ekstrak etanol kulit salak pondoh dalam berbagai variasi dosis terhadap hewan uji dengan melihat gejala-gejala toksik atau efek toksik, serta nilai LD₅₀.

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel tergantung selain variabel bebas, sehingga perlu ditetapkan kualitasnya agar hasil yang diperoleh dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkendali yang digunakan dalam penelitian ini adalah berat badan, lingkungan, jenis kelamin, usia, kondisi fisik dan perlakuan peneliti.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, buah salak pondoh matang dan segar, terbebas dari hama diperoleh dari petani di Imorejo, Kec Turi, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.

Kedua, buah salak segar digunakan untuk membuat serbuk kulit salak pondoh kemudian dioven pada suhu 50°C. Kulit salak kering diblender hingga didapatkan serbuk dan diayak memakai ayakan mesh 40.

Ketiga, ekstrak kental etanol dari kulit buah salak pondoh merupakan hasil ekstraksi maserasi menggunakan dengan pelarut organik etanol 70% menggunakan *rotary evaporation* hingga didapatkan hasil ekstrak kental.

Keempat, dosis ekstrak etanol 70% kulit salak, metode *fixed dose* yaitu 5, 50, 300, 2000 mg/kgBB. Dosis yang telah ditentukan diberikan pada tikus putih.

Kelima, 25 ekor tikus jantan dewasa digunakan sebagai hewan uji. berusia 2-3 bulan, dengan berat badan antara 150-200 gram. dimana setiap kelompok terdiri dari 5 hewan uji.

Keenam, nilai LD₅₀ (Lethal dose tengah 50) adalah jumlah bahan atau dosis yang diberikan dapat menyebabkan kematian 50% terhadap tikus putih jantan.

Ketujuh, pengamatan perubahan perilaku, berat badan, organ tikus serta kematian pada tikus putih jantan.

Kedelapan, pada akhir pengujian dilakukan pengamatan terhadap organ target tikus putih jantan meliputi usus, hati, lambung, limfa, paru-paru, ginjal dan jantung. Melihat bagaimana pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit salak pondoh terhadap organ hewan uji dilakukan pemeriksaan makropatologi secara kasat mata.

Kesembilan, hitung persentase indeks organ dengan cara membandingkan berat organ dengan berat badan yang telah dihitung.

C. Alat Bahan dan Hewan Uji

1. Alat

Pada penelitian ini alat-alat yang digunakan adalah pisau, blender, oven, ayakan mesh 40, *Sterling-Bidwell* (alat destilasi untuk pengujian kadar air), alat penentuan susut pengeringan (*moisture balance*). Bejana maserasi berwarna coklat botol penampung ekstraksi, beaker glass, stirring rod, chamber, corong pisah, kain saring, kertas

saring, *vacum rotary evaporator*, neraca analitik, tempat minum dan makan tikus, sonde lambung, lempeng KLT (Kromatografi Lapis Tipis), pipa kapiler, chamber, sarung tangan, alat bedah gunting, pinset, mortir dan stamfer, botol 100 ml sebagai wadah pembuatan suspensi.

2. Bahan

Bahan- bahan yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini meliputi kulit salak pondoh yang masih segar dan matang, tidak berbau busuk atau terbebas dari hama diperoleh dari petani di Imorejo, Kec Turi, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta, etanol 70%, Na CMC 0,5%, xylen, aquadest, pereaksi Lieberman-Buchard, Sitroborat, Dragendorf, n-heksan, etil asetat, metanol, n-butanol, as asetat glacial, kloroform, FeCl_3 5 %.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah Tikus putih galur jantan galur wistar, berat antara 150-200 gram, dewasa, sehat, tidak bunting, dan belum pernah beranak.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengumpulan dan pemilihan bahan

Salak pondoh segar yang telah matang, terbebas hama, diperoleh dari petani di Imorejo, Kecamatan Turi, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta dijadikan sebagai sampel dalam penelitian ini..

2. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman merupakan identifikasi tanaman khususnya buah salak pondoh merupakan langkah awal dalam penelitian ini. Penentuan tanaman yang akan digunakan merupakan langkah penting yang perlu dilakukan agar tidak terjadi kekeliruan dalam penggunaan bahan dan pencampuran bahan dengan tanaman lainnya yang dapat mengganggu kemurniannya. Determinasi tanaman salak pondoh dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

3. Pengeringan bahan

Salak dicuci bersih dengan air mengalir hingga tanah dan kerikil maupun bahan asing lainnya yang menempel benar-benar hilang dari salak. Setelah salak bersih, dikupas dan diambil kulitnya, dipotong kecil-kecil, dikeringkan di dalam oven pada suhu 50°C selama 3 hari hingga diperoleh kulit salak yang kering. Tujuan pengeringan kulit salak adalah untuk menghilangkan kadar air dalam kulit salak. Pemilihan penggunaan oven untuk pengeringan kulit salak karena lebih

menguntungkan, terjadinya penurunan kadar air dalam jumlah banyak dalam waktu yang singkat.

4. Pembuatan serbuk

Kulit salak yang telah kering ditimbang, setelah ditimbang kulit salak diblender, kemudian diayak menggunakan ayakan mesh 40. Serbuk ditimbang untuk pembuatan ekstrak kulit salak dimasukkan dalam tempat yang kering.

5. Penetapan susut pengeringan serbuk

Pada perlakuan penetapan susut pengeringan dengan menggunakan alat *moisture balance*, suhu diatur secara manual pada 105°C selama waktu yang diperlukan hingga kering. Serbuk 2 gram diratakan pada neraca dan ditunggu hingga suara alat berbunyi yang menandakan bahwa hasil analisis telah terekam, ada tiga kali percobaan penyusutan pengeringan yang berbeda. Persyaratan menetapkan bahwa penyusutan pengeringan tidak boleh melebihi 10% (Depkes RI., 200).

6. Penetapan kadar air

Penentuan kadar air serbuk kulit salak diukur dengan memanaskan labu *Sterling-Bidwell*. 20 gram serbuk kulit buah salak secara hati-hati selama 15 menit sampai tidak ada lagi tetesan air. Serbuk ditimbang dan dimasukkan kedalam labu alas bulat, kemudian menambahkan xylen jenuh sebanyak 100 ml. Baca volume air pada tabung berskala. Selanjutnya perhitungan volume kadar air dalam satuan persen dengan rumus berikut:

$$\text{Kadar air (\%)} : \frac{\text{volume terbaca}}{\text{Berat bahan}} \times 100\%$$

7. Pembuatan ekstrak etanol kulit salak pondoh

Pembuatan ekstrak etanol kulit salak menggunakan metode maserasi atau dingin digunakan untuk menghasilkan ekstrak etanol kulit salak. ditimbang sebanyak 400 gram ditempatkan dalam bejana, dan dimaserasi menggunakan 2500 ml etanol 70 % hingga seluruh bahan terendam, dibiarkan dalam waktu 5 hari dengan sering-sering diaduk. Sesudah 5 hari ampas diperas dan ditambahkan etanol 70% 1500 ml. Botol maserasi ditutup, ditempat sejuk terlindung cahaya selama 2 tanpa adanya pengadukan. Filtrat total kemudian digabungkan dengan filtrat pertama dan kedua dan dilakukan penyaringan. Filtrat dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk menguapkan filtrat hingga memperoleh ekstrak setengah kental dan dilanjutkan dengan waterbath dengan suhu 50°C hingga memperoleh ekstrak kental.

Timbang bobot ekstrak kental yang diperoleh, hitung rendemennya (Depkes RI, 1986).

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\%$$

8. Penetapan susut pengeringan ekstrak

Penetapan susut pengeringan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Penetapan susut pengeringan pada suhu 105°C. Ekstrak kulit salak diratakan sebanyak 2 gram pada neraca. Setelah menunggu sampai suara alat berbunyi yang menandakan bahwa hasil analisis telah terekam. Persyaratan menetapkan bahwa penyusutan pengeringan tidak boleh melebihi 10% (Depkes RI., 2000).

9. Identifikasi senyawa kimia ekstrak kulit salak

Untuk mengisolasi senyawa digunakan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis). KLT yang digunakan terbuat dari silika gel GF 254 ukuran 20 x 20 cm. Garis atas dan bawah lempeng terpisah 1 cm. Plat KLT pertama kali diaktifkan dengan pemanasan oven selama 30 menit hingga 105°C sebelum digunakan. Ekstrak kental kulit buah salak pondoh dilarutkan dalam etanol, ditotolkan menggunakan tabung kapiler, diangin-anginkan hingga kering, dimasukkan ke dalam bejana berisi fase gerak jenuh, dilusi hingga terlihat tandanya, diambil menggunakan pinset, dikeringkan dan dilihat pada sinar ultraviolet pada 254 dan 366 nm. Pelat diujani dengan reagen dengan cara disemprotkan, udara yang disirkulasikan melaluinya dan terlihat dalam cahaya yang terlihat (Sastrohadmijojo, 2007).

9.1 Identifikasi senyawa Flavonoid

Fase diam : Silika gel GF₂₅₄
 Fase gerak : asasetat glacial: n-butanol: air (1:4:5)
 Baku pembanding : Kuersetin
 Pereaksi semprot : Sitroborat (Marliana, 2005).

9.2 Identifikasi senyawa Saponin

Fase diam : Silika gel GF₂₅₄
 Fase gerak : Kloroform: metanol: air (13:7 :2)
 Baku pembanding : Sapogenin
 Pereaksi semprot : Lieberman Bourchard

9.3 Identifikasi senyawa Tanin

Fase diam : Silika gel GF₂₅₄
 Fase gerak : metanol : air (6:4)
 Baku pembanding : Asam Galat
 Pereaksi semprot : FeCl₃ 5% (Banu dan Nagarajan, 2014)

9.4 Identifikasi senyawa Alkaloid

Fase diam	: Silika gel GF ₂₅₄
Fase gerak	: n-heksan: Etil asetat (7:3)
Baku pembanding	: Piperin
Pereaksi semprot	: Dragendorf (Warner dan 1996).

10. Pemilihan hewan uji

Hewan uji untuk penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar dengan berat antara 150-200 gram.

11. Pembuatan larutan kontrol negatif

Pembuatan larutan Na CMC 0,5 % dengan cara timbang 0,5 gram serbuk kulit salak pondoh . Air petama-tama dipanaskan dalam penangas air dan kemudian dilarutkan untuk membuat larutan Na CMC 0,5%.

12. Perlakuan hewan uji

Dosis uji toksisitas akut

- Kelompok 1 : Kontrol negatif, diberi Na CMC 0,5 %
- Kelompok 2 : ekstrak etanol kulit salak pondoh dosis 5 mg/kgBB,
- Kelompok 3 : ekstrak etanol kulit salak pondoh dosis 50 mg/kgBB
- Kelompok 4 : ekstrak etanol kulit salak pondoh dosis 300 mg/kgBB
- Kelompok 5 : ekstrak etanol kulit salak pondoh dosis 2000 mg/kgBB

Setiap tikus ditimbang dan diberi tanda pengenal, setelah itu tikus diadaptasikan dengan laboratorium selama 7 hari. Tikus hanya boleh diberikan air minum dan dipuaskan dari makan selama 18 jam. Sediaan uji yang telah disiapkan dapat diberikan kepada hewan uji segera setelah 18 jam. Setelah 4 jam pakan dapat diberikan. Pengamatan dilakukan setidaknya 30 menit pertama setelah diberi sediaan suspensi ekstrak kulit salak, kemudian pengamatan dilakukan hingga 24 jam, setelah itu sehari sekali hingga 14 hari (BPOM RI, 2014)

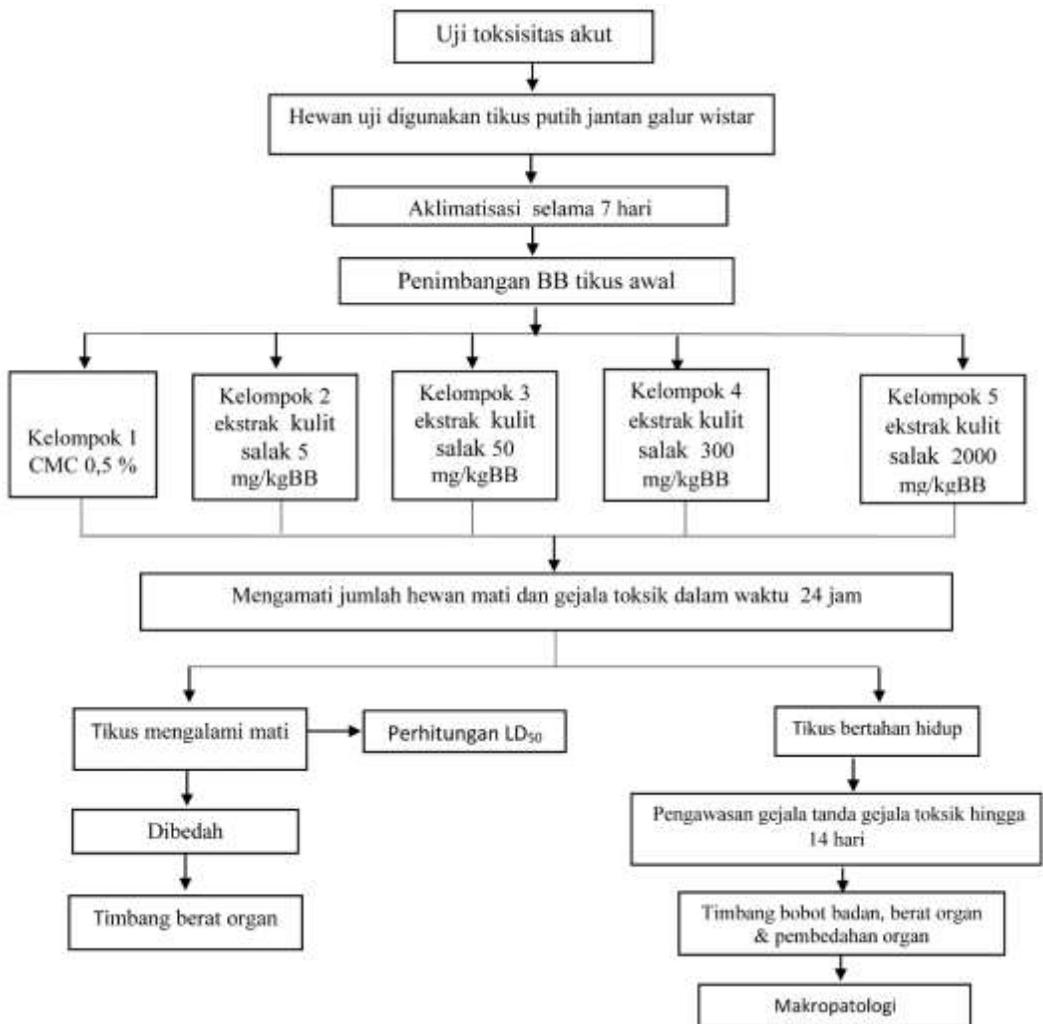
Setelah pemberian sediaan uji, gejala toksik diamati selama 24 jam dengan berbagai rangsangan pada uji toksisitas akut. Jika hewan uji tidak mati selama pengujian, pengamatan dilanjutkan sekali sehari selama 14 hari (BPOM RI, 2014).

13. Pengamatan gejala-gejala toksik

Tabel 2. Hubungan antara gejala keracunan dengan organ tubuh dan sistem saraf (Harmita & Radji 2005).

Sistem	Tanda gejala toksik
Syaraf otonom	Eksoftalmos (bola mata yang menonjol), Hidung meler, air liur keluar terus, diare, sering buang air kencing, dan piloereksi
Perilaku	Duduk dengan kepala menunduk dan menatap kosong kedepan depresi berat, kaki menggaruk-garuk, terengah-enggah, mudah terganggu, ketakutan, kebingungan, aktivitas aneh, atau kurang tenang atau gelisah
Perasa/sensori	Kepekaan rasa, righting, refleks lokal pada kaki belakang, kepekaan terhadap suara dan sentuhan, nistagmus, fonasi
Saraf otot	Peningkatan atau penurunan aktivitas, gemetar, kejang, ekor membengkok kedepan, kaki belakang lemah, refleks buruk, ophisthotonus, dan kematian adalah gejalanya
Pembuluh darah jantung,	Detak jantung naik turun
Pernapasan/respiratori	Gangguan pernapasan
mata/ocular	Midrais, lakrimasi, ptosis, nistagmus, refleks cahaya pupil
Gastrointestinal/gastrourinari	Pengeluaran air liur terus menerus, diare, tinja dan urin berdarah, konstipasi, buang air besar dan pengeluaran urine yang tidak terkendali
Kulit	Alopecia, piloereksi, gemetar seperti anjing, badan basah dan bengkak

E. Alur penelitian



Gambar 3. Kerangka penelitian

F. Analisis Data

Data diolah menggunakan SPSS. Data hasil analisis diperoleh dari uji toksisitas akut adalah LD₅₀. Data diperoleh dari hasil pengamatan indeks organ dianalisis menggunakan uji *kolmogrov-Smirnov* untuk melihat distribusi kelompok. homogenitas varian uji dengan *Levene*. Jika data tidak terdistribusi normal, lanjutkan ke analisa ANOVA pada data tersebut. Jika perbedaan ditemukan lanjutkan ke pengujian *Post-hoc*.