BAB III
METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini yaitu tanaman seledri (*Apium graveolens* L.) yang berasal dari daerah Sumberlawang, Sragen, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu seledri (*Apium graveolens* L.), yang sudah siap panen berumur >3 bulan dari masa penanaman(Syahwandi, 2020), yaitu tanaman yang memiliki daun yang berwarna hijau tua dan berbatang besar.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens* L.). Variabel kedua pada penelitian ini adalah efek tonikum pada mencit jantan.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variable yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk mempelajari pengaruhnya terhadap variable tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol seledri dari berbagai variasi dosis yang diberikan pada mencit putih jantan (*Mus musculus*)**.**

Variabel tergantung merupakan akibat dari variabel utama. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah efek tonikum ekstrak seledri dengan metode *rotarod* pada mencit jantan setelah diberi perlakuan.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, seingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kuantitasnya supaya diperoleh hasil yang tepat. Pada penelitian ini yang termasuk variabel terkendali yaitu kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, usia, jenis kelamin, dan lingkungan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, sampel adalah seledri yang diambil dengan kondisi yang masih segar berwarna hijau, lengkap dari bagian daun, pangkal, dan batang, dari daerah Sumberlawang, Sragen, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk seledri adalah serbuk yang didapatkan dari pencucian seledri lalu disortasi basah, kemudian dilakukan perajangan dan pengeringan pada sinar matahari kemudian disortasi kering, lalu diserbuk dengan blender dan diayak dengan ayakan no. 40, sehingga didapatkan serbuk halus.

Ketiga, ekstrak etanol seledri adalah hasil dari penyarian serbuk seledri menggunakan cairan penyari berupa etanol 96% dilakukan dengan cara maserasi. Setelah itu hasil dari penyarian dipekatan menggunakan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental.

Keempat, hewan uji yang digunakan adalah mencit putih jantan berumur 2-3 bulan dengan berat badan 20-40 gram.

Kelima, *metode rotarod* adalah salah satu metode tonikum dengan cara meletakan hewan uji di atas alat rotarod lalu dilihat selisih waktu sebelum dan sesudah diberi perlakuan.

Keenam, kontrol positif yang digunakan adalah kafein, karena memiliki aktivitas stimulant yang meningkat kewaspadaan dan mengurangi kelelahan.

Ketujuh, waktu lelah adalah interval dari waktu memasukan hewan uji diatas alat rotarod hingga timbul kelelahan, waktu dimana mencit sudah terjatuh dari alat rotarod.

Kedelapan, efek tonikum adalah efek yang menambah stamina untuk memulihkan tenaga dalam waktu singkat..

Kesembilan , dosis efektif adalah dosis terkecil yang mampu memberikan efek tonikum sebanding dengan kontrol positif.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu simplisia seledri (*Apium graveolens* L.), etanol 96%, kafein, Na-CMC, aquadest

2. Alat

Alat yang digunakan yaitu kertas saring, batang pengaduk, pipet tetes, cawan penguap, gelas ukur (pyrex), beker glass (pyrrex), blender (philips), spuit oral, timbangan analtik, waterbath, stopwatch, kain flanel, alat rotarod, kandang mencit, tabung reaksi, botol maserasi. alat *evaporator*.

3. Hewan uji

Hewan uji yang diguanakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan (*Mus musculus*) , berumur 2-3 bulan dengan bert badan 20-40 gram

D. Cara Penelitian

1. Pengumpulan Bahan

Sampel diperoleh dari wilayah Kabupaten Sragen, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan berupa seledri yang berwarna hijau segar yang dipanen >3 bulan dari masa penanamannya.

2. Determinasi Tanaman

Tahap awal yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi terhadap sampel kebenaraan sampel yang akan digunakan yaitu seledri. Determinasi dilakukan di Universitas Setia Budi Surakarta.

3. Pembuatan Serbuk Simplisia

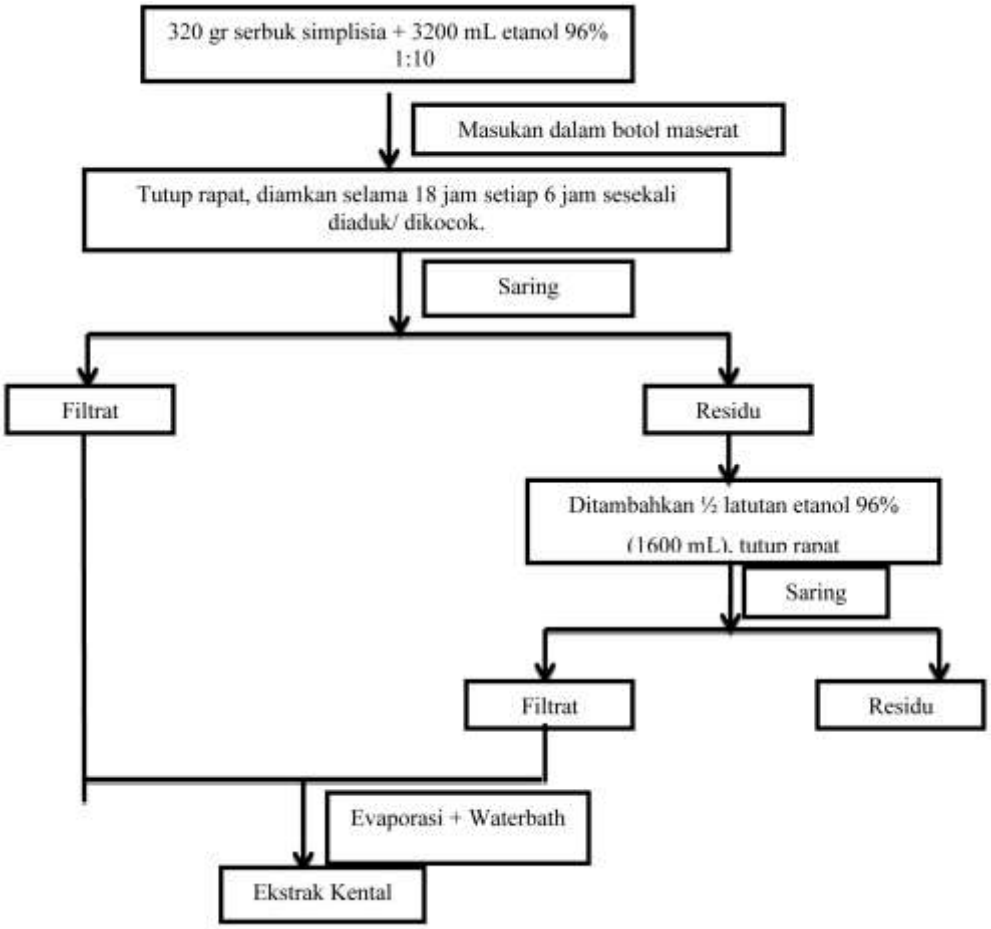
Sebanyak 5kg seledri dibersihkan dari kotoran dan dicuci bersih, dipotong-potong dan dijemur terlindung sinar matahari langsung hingga menghitam. Daun yang telah kering dioven untuk menghilangkan sisa kadar air dalam suhu 45 ºC selama 3 jam. Seledri dibuat serbuk dengan diblender dan diayak nomor 40.

4. Pembuatan Ekstrak

Metode ekstraksi yang digunakan yaitu metode maserasi menurut , memasukan satu bagian serbuk kering simplisia seledri kedalam maserator. Tambahakan 10 bagian pelarut dengan perbandingan (1:10). Rendam selama 18 jam sambil sesekali diaduk/dikocok pada 6 jam pertama, kedua, dan ketiga. Pisahkan maserat dengan cara sentrifungasi, dekantasi, atau filtrasi. Ulangi proses penyarian sekurang- kurangnya satu kali dengan jenis pekarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama (Kemenkes RI, 2017). Filtrat yang diperoleh kemudian di *evaporasi* menggunakan alat evaporator dan diuapkan diatas waterbath pada suhu 65 ºC sampai diperoleh ekstrak kentalnya. Hasil ekstrak yang diperoleh kemudian ditimbang untuk dicari presentasi rendemnnya dengan rumus

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

Alur pembuatan ekstrak dapat dilihat pada gambar 3. Dibawah ini :



Gambar 4. Skema Pembuatan Ekstrak

5. Identifikasi kandungan senyawa pada seledri

Pada proses identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kebenaran kandungan senyawa pada seledri meliputi senyawa flavonoid, tanin, saponin dan alkaloid.

5.1 Identifikasi Flavonoid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 2 mL aquadest, lalu ditambahkan 0,5 gram serbuk magnesium dan beberapa tetes HCL pekat. Terbentuknya warna orange sampai merah (jingga) menunjukan adanya flavonoid (Rahminiwati *et al.*, 2024)

5.2 Identifikasi Tanin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukan kedalam tabung reaksi, ditambahkan dengan FeCl3 0,1%. Terbentuknya warna biru-hitam, hijau atau biru-hijau dan endapan menunjukan adanya tanin (Rahminiwati *et al.*, 2024)

5.3 Identifikasi Saponin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan 20 mL aquadest, kemudian dikocok, terbentuknya busa yang stabil selama beberapa menit menunjukan adanya saponin (Rahminiwati *et al.*, 2024)

5.4 Identifikasi Alkaloid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan 1ml asam klorida 2N dan 9ml aquadest, dipanaskan selama 2 menit, didinginkan dan disaring filtrat yang diperoleh. Ambil 3 tabung rekasi, kemudian masukan filtrat sebanyak 0,5ml pada maisng-masing tabung, tabung pertama ditambahkan, tabung pereaksi 2 tetes pereaksi buchardat, dan tabung kedua ditambahkan 2 tetes pereaksi dragendorff. Alkaloid positif apabila terjadi endapan atau keruh pada tabung tersebut (Shalsyabillah & Kartika, 2023).

6. Pembuatan larutan Na-CMC

Pembuatan larutan CMC Na 0,5% dilakukan dengan cara menimbang CMC Na 0,5 gram, lalu ditambahkan 50 mL akuadest ditunggu hingga mengembang, lalu digerus ad homogen. Dituang digelas ukur 100 mL lalu ditambahkan dengan akuadest sebanyak 100 mL aduk ad homogen.

7. Pembutan suspensi ekstrak seledri dengan konsentrasi 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, 800 mg/kgBB.

Suspensi seledri 200 mg/kgBB dibuat dengan menimbang ekstrak seledri sebanyak 100 mg kemudian disuspensikan dengan Na.CMC 0,5% sebanyak 10 mL, Untuk 400 mg/kgBB dibuat dengan menimbang ekstrak seledri sebanyak 200 mg kemudian disuspensikan dengan Na.CMC 0,5% sebanyak 10 mL, dan untuk 800 mg/kgBB dibuat dengan menimbang ekstrak seledri sebanyak 400 mg kemudian disuspensikan dengan Na.CMC 0,5% sebnayak 10 mL.

8. Pengujian efek tonikum

Prosedur pengujian efek tonikum pada mencit jantan, dengan mengelompokan sesuai dengan kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 5 mencit yang diadaptasi dengan lingkungan selama 1 minggu dan dipuasakan terlebih dahulu 8 jam sebelum pemberian perlakuan

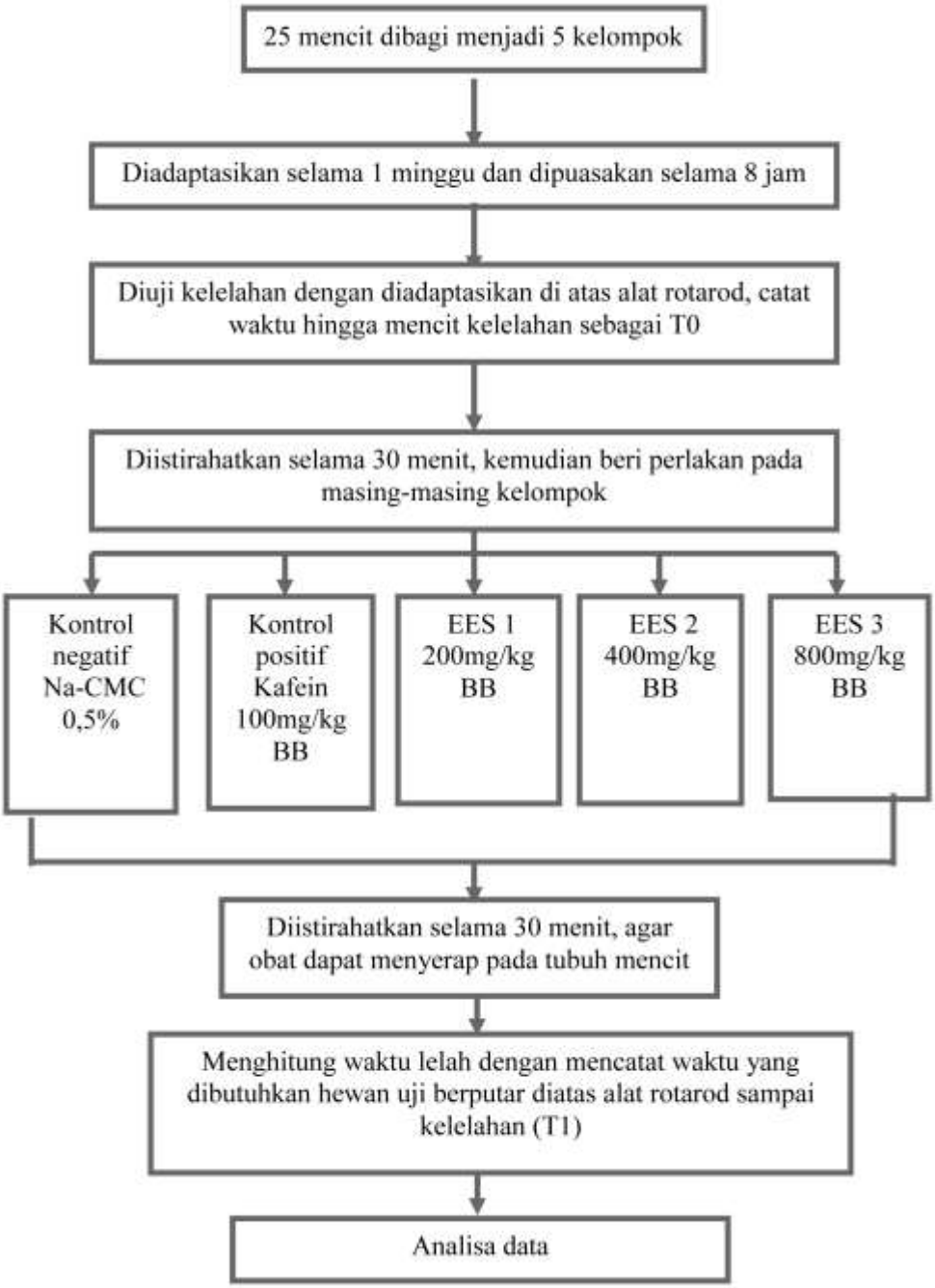
a. Kelompok kontrol negatif, digunakan 5 ekor mencit yang diberikan Na-CMC 0,5% secara oral
b. Kelompok kontrol positif, digunakan 5 ekor mencit yang diberikan kafein 100mg/kgBB secara oral

c. Kelompok EES 1, digunakan 5 ekor mencit yang diberikan larutan ekstrak seledri 200mg/kgBB secara oral
d. Kelompok EES 2, digunakan 5 ekor mencit yang diberikan larutan ekstrak seledri 400mg/kgBB secara oral
e. Kelompok EES 3, digunakan 5 ekor mencit yang diberikan larutan ekstrak seledri 800mg/kgBB secara oral

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode *rotarod* yaitu metode yang digunakan untuk mengetahui efek obat yang bekerja pada koordinat gerak, terutama penurunan kontrol saraf pusat. Uji ini dilakukan terhadap mencit dengan menggunakan alat rotarod yang berputar. Semua kelompok mencit diadaptasikan dengan alat rotarod sampai merasa kelelahan dihitung sebagai (T0). Setelah itu masing-masing kelompok diistirahatkan selama 30 menit, kemudian masing-masing kelompok akan diberikan perlakuan yang berbeda-beda.

Setelah diberikan perlakuan masing-masing mencit distirahatkan selama 30 menit hingga obat diabsorpsi tubuh mencit. Kemudian diuji dialat rotarod lalu dicatat waktu yang digunakan mencit bertahan diatas alat rotarod (T1), disini dihitung waktu lelah yaitu waktu yang dibutuhkan mencit hingga lelah ditandai dengan jatuhnya dari atas alat rotarod. Kemudian dilakukan analisis data.

E. Alur Kerja Penelitian



Gambar 5. Skema Alur Kerja Penelitian

F. Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini adalah berupa waktu lelah yang diperoleh dari selisih waktu lelah hewan uji setelah dan sebelum perlakuan dari masing-masing kelompok. Metode analisis yang digunakan utuk uji statistik dengan menggunakan program SPSS 17.0. Dianalisi dengan *Kolmogorov-Sminorv Test*. Jika data terdistribusi normal (signifikan > 0,05) analisis data dilanjutkan dengan *One Way Anova* dengan taraf kepercayaan 95% menggunakan output program SPSS, untuk mengetahui perbedaan yang nyata antara perlakuaan.

Jika hasil uji *One Way Anova* dan uji *Lavene Statistik* menunjukan hasil normal (signifikan > 0,05), selanjutnya dilakukan uji *Tukey* untuk melihat waktu lelah atau efek tonikum yang paling baik diantara kelompok perlakuan dan perbedaan antara masing-masing kelompok. Namun jika hasilnya tidak normal, maka digunakan uji non parametik mengguakan *Kruskal Walis Test* dan uji lanjutan *Mann-Whiteny Test.*