

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah daun putri malu yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Februari tahun 2019

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun putri malu secara acak, tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda dan tidak rusak.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun putri malu hasil maserasi dengan pelarut etanol yang diuji daya antikonvulsannya terhadap tikus yang diinduksi dengan INH

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama memuat identifikasi semua variabel yang diteliti langsung. Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis ekstrak etanol daun putri malu.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah melihat parameter onset dan kejadian kejang klonik, frekuensi klonik, onset tonik, durasi tonik, kejadian kejang tonik, dan jumlah kematian dengan dosis yang berbeda-beda. Variabel tergantung merupakan variabel akibat dari variabel utama, variabel tergantung

dalam penelitian ini adalah selisih parameter uji yang dilakukan pada hewan uji sesudah dan sebelum diberi perlakuan.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali pada penelitian ini adalah metode ekstraksi daun putri malu, kondisi fisik hewan uji meliputi berat badan tikus, galur, jenis kelamin, kondisi percobaan, laboratorium, zat penginduksi, dan peneliti.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun putri malu adalah seluruh daun pada tanaman putri malu yang segar, berwarna hijau, tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda dan tidak rusak yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk adalah simplisia kering daun putri malu yang dihaluskan dengan penggiling dan diayak dengan pengayak ukuran mesh 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun putri malu adalah cairan hasil dari penarikan sari daun putri malu dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol, kemudian diuapkan dengan evaporator pada suhu 40 °C.

Keempat, hewan uji yang dipakai adalah mencit jantan dengan berat badan 25 - 30 gram.

Kelima, fenobarbital adalah serbuk obat yang diperoleh dari Laboratorium Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta, Solo, Jawa Tengah sebagai kontrol positif.

Keenam, *isoniazid* (INH) adalah bahan penginduksi konvulsi yang dapat mengganggu sintesis GABA. Secara spesifik, menghambat asam glutamat dekarboksilase dengan menghambat piridoksal 5 pospat, yang merupakan pengaktivasi bagi enzim asam glutamat dekarboksilase. Penurunan jumlah GABA tersebut menyebabkan terjadinya kejang. Diberikan secara intraperitoneal (i.p) dengan dosis 300 mg/KgBB.

Ketujuh, konvulsi adalah kondisi medis saat otot tubuh mengalami fluktuasi konstraksi dan peregangan dengan sangat cepat sehingga menyebabkan gerakan yang tidak terkendali.

Kedelapan, antikonvulsan adalah obat yang digunakan untuk mengembalikan kestabilan rangsangan sel saraf sehingga dapat mencegah atau mengatasi kejang.

Kesembilan, kejang tonik adalah jenis kejang yang melibatkan seluruh tubuh, pada hewan uji ditandai dengan *ventroflexion* yang diikuti oleh perpanjangan secara keseluruhan kaki depan dan kaki belakang hewan tersebut.

Kesepuluh, Kejang klonik adalah episode kejang otot yang melibatkan tungkai depan dengan atau tanpa kehilangan refleks meluruskan.

Kesebelas, Onset tonik adalah penampilan dari kondisi pertama dari kejadian munculnya kejang tonik.

Keduabelas, Durasi tonik adalah lamanya waktu kejang tonik yang terjadi.

C. Bahan, Alat, dan Hewan Uji

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah peralatan maserasi, kandang tikus, alat-alat gelas, timbangan, alat suntik oral, alat suntuk injeksi, ayakan mesh 40, oven, lemari es, blender, dan *stopwatch*.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan adalah serbuk kering daun putri malu dan untuk ekstraksi menggunakan etanol. Bahan pembanding yang digunakan adalah tablet fenobarbital, dan sebagai kontrol negatif adalah CMC Na 0,5% yang diperoleh dari laboratorium farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta. Bahan yang digunakan untuk membuat mencit menjadi kejang adalah PTZ yang didapat dari Sigma co.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam percobaan ini adalah mencit jantan galur Swiss dengan bobot 25 – 30 gram yang berumur 5-6 minggu yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Universitas Setia Budi, Surakarta. Kondisi

fisik hewan sehat dan tidak tampak cacat secara anatomi. Mencit dipelihara dalam kandang, tiap kandang berisi 5 ekor mencit, dan diberi makan pellet serta diberi minum secukupnya.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi daun putri malu

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi tanaman untuk menetapkan kebenaran sampel tanaman berkaitan dengan ciri-ciri mikroskopis dan makroskopis, serta ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman terhadap pustaka yang dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel putri malu dilakukan pada daun yang masih segar dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Daun putri malu kemudian dicuci dengan air untuk membersihkan kotoran dan debu yang menempel pada daun lalu ditiriskan dan dikeringkan dibawah sinar matahari dengan ditutupi kain hitam dan dioven pada suhu 40°C.

3. Pembuatan serbuk daun putri malu

Daun putri malu yang sudah dicuci dengan air untuk membersihkan kotoran atau bahan asing yang menempel pada daun, setelah itu dilakukan pengeringan. Pengeringan dilakukan dengan cara di oven pada suhu 50°C hingga kering yang bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama (Voight 1994). Daun yang sudah kering selanjutnya dibuat serbuk, diayak dengan ayakan nomor mesh 40, lalu dilakukan perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah.

4. Penetapan kadar air serbuk

Serbuk simplisia sebanyak 20 gram ditimbang dan dimasukkan kedalam labu destilasi dan ditambahkan 100 ml xylen jenuh air, kemudian memasang alat *Sterling-Bidwell*, lalu dipanaskan dengan hati-hati. Pemanasan dihentikan bila

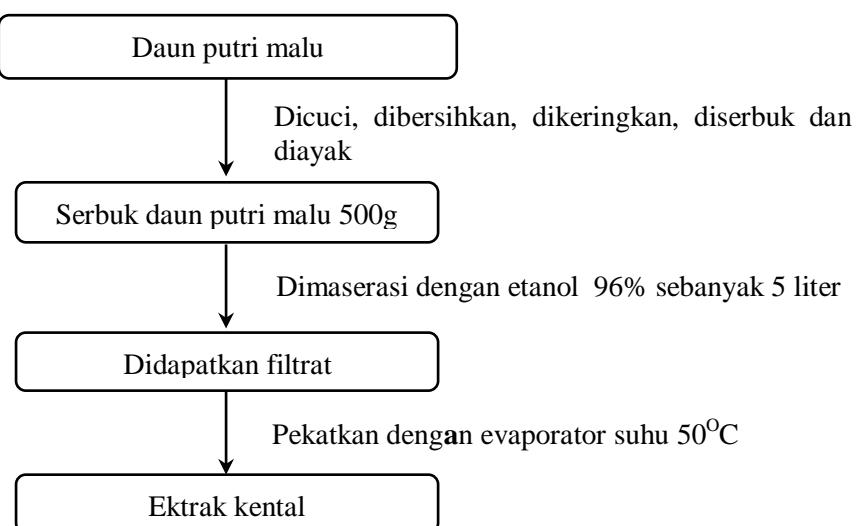
pada tetesan sudah tidak ada air yang menetes lagi, kemudian diukur kadar air menggunakan alat *Sterling-Bidwell* dengan melihat volume pada skala alat. Pembacaan volume air setelah air dan xylen memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b (Yenrina 2015).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume terbaca}}{\text{Berat bahan}} \times 100\%$$

5. Pembuatan ekstrak etanol daun putri malu

Sebanyak 500 gram serbuk kering daun putri malu diekstrasi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 bagian pelarut. Dimasukkan satu bagian serbuk kering kedalam botol maserasi, ditambahkan 7,5 bagian pelarut. Botol maserasi disimpan dalam suhu ruangan dan dihindarkan dari sinar matahari secara langsung dan digojog secara konstan setiap 3 kali sehari. Setelah 5 hari hasil randemen disaring dengan menggunakan kain flannel dan kertas saring. Hasil saringan dicuci kembali dengan etanol 96% sebanyak 2,5 bagian pelarut. Ekstrak cair yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental, kemudian dihitung persen rendemen (Depkes 2008). Skema pembuatan ekstrak dapat dilihat pada gambar 8.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang didapat}}{\text{Bobot serbuk simp lisia yang diekstraksi}}$$



Gambar 8. Skema pembuatan ekstrak etanol 96% serbuk daun putri malu

6. Identifikasi senyawa kandungan kimia ekstrak daun putri malu

Identifikasi kandungan senyawa kimiawi yang terdapat didalam sampel dilakukan dengan menggunakan pereaksi warna secara metode tabung. Identifikasi senyawa meliputi senyawa flavonoid, tanin, dan alkaloid.

6.1 Identifikasi flavonoid. Sejumlah tertentu ekstrak dilembabkan dengan 100 ml air panas kemudian di didihkan selama 5 menit, disaring dan diambil filtratnya 5 ml dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan serbuk magnesium secukupnya, 1 ml asam klorida dan 2 ml amil alkohol, dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Terbentuknya warna merah/kuning/jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan positif flavonoid (Sarker 2006).

6.2 Identifikasi tanin. Pemeriksaan tanin dilakukan dengan cara serbuk dan ekstrak daun putri malu sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 100 ml air panas, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambah dengan 3 tetes pereaksi FeCl_3 1%. Tanin positif apabila berbentuk warna biru kehitaman pada reaksi dengan FeCl_3 (Depkes 1995).

6.3 Identifikasi alkaloid. Sebanyak 1 gram sampel dimasukan dalam tabung reaksi dan ditambah dengan 5 tetes amonia pekat. Setelah itu, disaring kemudian ditambah 2 ml asam sulfat 2N dan dikocok hingga memberi lapisan atas dan bawah. Larutan dibagi menjadi 3 bagian, pada tabung pertama ditambahkan 1 tetes larutan Mayer, adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih keruh, jika pada tabung kedua ditambah 1 tetes pereaksi *Dragendorf* dan terbentuknya endapan coklat sampai hitam menandakan adanya alkaloid (Harborne 1987).

6.4 Identifikasi saponin. Sebanyak 2 ml ekstrak ditambahkan 10 ml aquadest panas dalam tabung reaksi, digojog selama 15 menit, kemudian ditambahkan beberapa tetes HCL 2N. Hasil positif jika terbentuk busa yang stabil (Depkes 1989).

7. Pembuatan larutan uji

7.1 Larutan suspensi CMC Na 0,5%. CMC Na konsentrasi 0,5% adalah larutan yang digunakan sebagai kontrol negatif, dibuat dengan cara menimbang

serbuk CMC Na sebanyak 500 mg kemudian dimasukkan ke dalam cawan penguap dan ditambah sedikit aquadest. Selanjutnya dipanaskan sampai mengembang kemudian dimasukkan ke dalam mortir dan menggerusnya dan menambahkan sedikit demi sedikit aquadest hingga 100 ml, diaduk hingga homogen.

7.2 Larutan fenobarbital. Suspensi Fenobarbital 0,1 ml, kemudian digerus ditambahkan suspensi Na CMC 0,5% sedikit demi sedikit sampai terbentuk suspensi yang homogen. Masukan dalam labu ukur 10 ml, cukupkan sampai garis batas.

7.3 Larutan uji ekstrak daun putri malu. Banyaknya ekstrak daun putri malu yang akan digunakan, dihitung berdasarkan berat mencit dari masing-masing mencit, kemudian ditambahkan dalam suspensi CMC Na 0,5% yang sudah dikembangkan sebanyak 2 ml dan diaduk hingga homogen.

7.4 Larutan Nacl fisiologis 0,9%. Nacl digunakan untuk melarutkan induksi isoniazid. NaCl fisiologis 0,9% dibuat dengan cara melarutkan 0,9 gram NaCl dalam 100 ml aquadest diaduk sampe larut.

8. Penentuan dosis

8.1 Dosis fenobarbital. Dosis fenobarbital yang akan diberikan pada hewan uji ditentukan dengan mengkonversi dosis sekali minum pada manusia dewasa dan mengubahnya menjadi dosis mencit dengan menggunakan faktor konversi. Dosis fenobarbital untuk orang dewasa 300 mg (DepKes RI 1979).

(Faktor konversi manusia 70 Kg ke mencit 20 g = 0,0026)

8.2 Dosis sediaan uji. Dosis yang diberikan pada mencit mengacu pada penelitian Anggraeni dan Saiful (2011). Dibuat tiga variasi perbandingan dosis kombinasi ekstrak etanol daun putri malu yaitu dosis 100; 200; 400 mg/kgBB mencit

8.3 Dosis INH. Isoniazid (INH) adalah bahan penginduksi konvulsi yang diberikan secara sub kutan untuk menghambat asam glutamate dekarboksilase dengan menghambat piridoksal 5 pospat, yang merupakan pengaktivasi bagi enzim asam glutamat dekarboksilase. Penurunan jumlah GABA tersebut

menyebabkan terjadinya kejang. Diberikan dengan dosis 300 mg/KgBB. (Vogel 2002).

9. Perlakuan hewan uji

Percobaan ini dilakukan dengan menggunakan hewan uji mencit jantan dengan bobot 20-25 gram yang telah diadaptasikan selama 1 minggu. Kemudian dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing terdiri dari 5 mencit dan ditimbang untuk menghitung volume pemberian. Masing-masing dikandangkan sesuai kelompok untuk menghindari kesalahan perlakuan. Semua mencit ditimbang untuk menghitung dosis pemberian. Kelompok mencit diberi perlakuan sebagai berikut :

Kelompok I : Sebagai kontrol negatif (suspensi CMC Na 0,5%).

Kelompok II : Diberi suspensi ekstrak putri malu secara peroral dengan dosis 100 mg/KgBB.

Kelompok III : Diberi suspensi ekstrak putri malu secara peroral dengan dosis 200 mg/KgBB.

Kelompok IV : Diberi suspensi ekstrak putri malu secara peroral dengan dosis 400 mg/KgBB.

Kelompok V : Diberi suspensi fenobarbital secara peroral dengan dosis 100 mg/KgBB

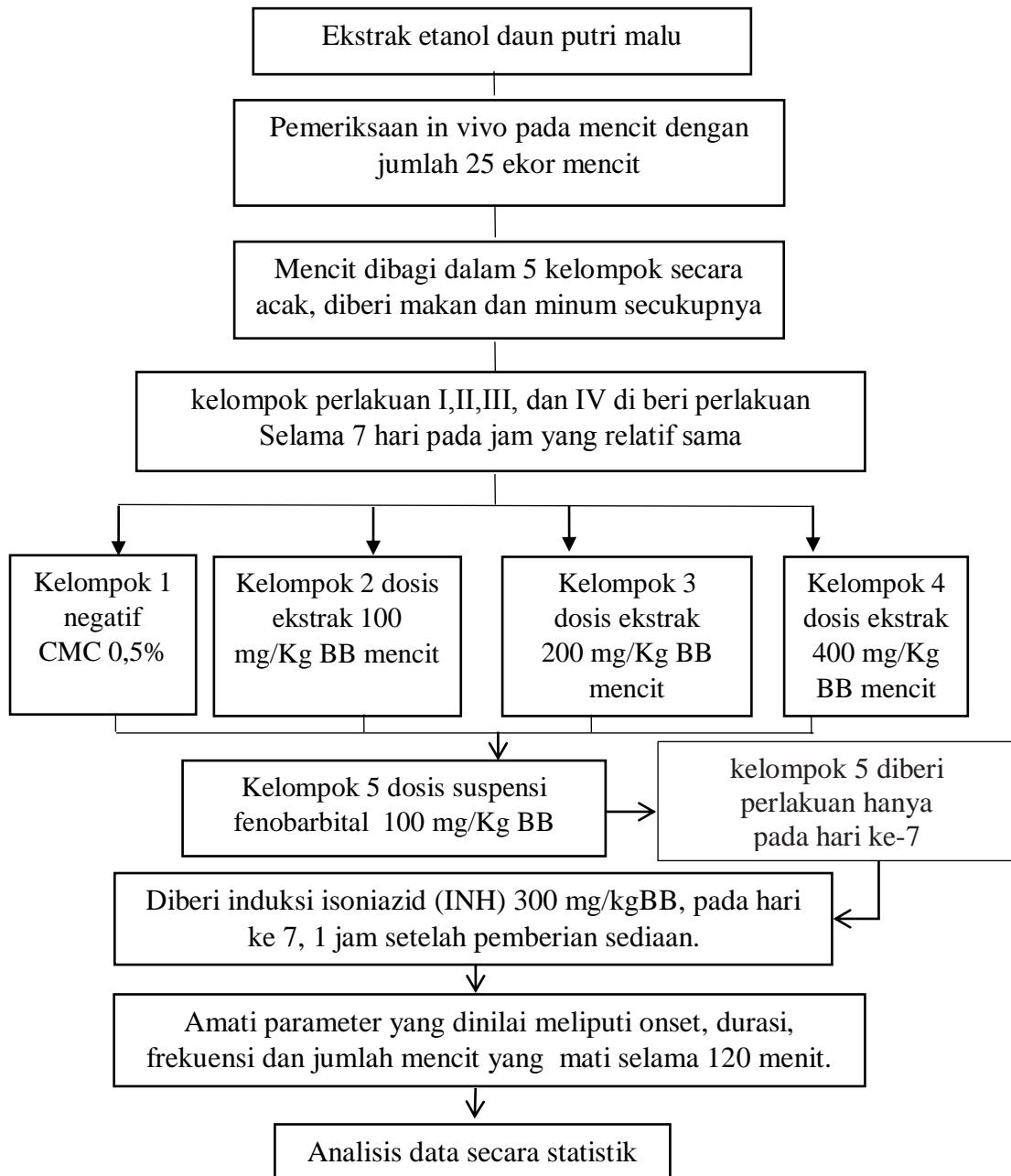
Kelompok I, II, III, dan IV diberi perlakuan selama 7 hari pada jam yang relatif sama. Untuk kelompok V diberi perlakuan hanya pada hari ke-7. Setelah hari ketujuh 1 jam sesudah perlakuan, mencit diinduksi INH dengan dosis 300 mg/KgBB secara i.p yang telah dilarutkan dalam NaCl 0,9%. Amati onset, durasi, frekuensi, dan jumlah mencit mati dengan lama pengamatan selama 120 menit, kemudian dibandingkan antara kelompok dosis dengan kelompok kontrol positif maupun negatif. Onset dihitung mulai dari penyuntikan INH sampai waktu terjadinya kejang. Durasi dihitung dari mulai terjadi kejang sampai selesai kejang. Sedangkan frekuensi adalah jumlah kejang yang terjadi (Anggraeni & Saiful 2011). Skema penelitian dapat dilihat pada gambar 9.

E. Analisa Data

Analisis data pertama yang digunakan dalam penelitian ini untuk melihat apakah data yang telah didapat terdistribusi normal atau tidak dengan

menggunakan uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov* dan dilanjutkan dengan uji parametrik (*One Way ANOVA*) untuk mengetahui perbedaan diantara perlakuan. Uji homogenitas varians menggunakan uji *Levene Statistic* untuk menunjukkan adanya homogenitas, namun jika data yang didapat tidak terdistribusi normal, maka dilakukan uji non-parametrik menggunakan uji *Kruskal Wallis* dan uji *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaannya.

F. Skema Penelitian



Gambar 9. Skema Penelitian