

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi merupakan keseluruhan objek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih merah yang diperoleh di daerah Klaten, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel merupakan sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih merah yang diperoleh di daerah Klaten, Jawa Tengah pada bulan Desember 2018. Sampel yang diambil adalah daun yang masih segar, sehat, tidak berpenyakit dan berwarna hijau pada permukaan atas daun dan merah pada permukaan di bawah daun.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz and Pav.) dan efek tonikum yang ditunjukkan sebagai respon kelelahan oleh mencit.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama dapat diidentifikasi kedalam beberapa macam variabel yaitu, variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali.

Variabel bebas merupakan variabel yang sengaja diubah-diubah untuk melihat pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah variasi dosis ekstrak etanol daun sirih merah yang akan diberikan pada mencit.

Variabel tergantung adalah titik permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian dan akibat dari variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah waktu lelah yang ditunjukan oleh mencit setelah diberi perlakuan.

Variabel terkendali adalah variabel yang memengaruhi variabel tergantung sehingga kualifikasinya perlu ditetapkan agar mendapatkan hasil yang tidak tersebar. Variabel terkendali pada penelitian ini adalah kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, lingkungan, tempat hidup, jenis kelamin dan galur.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun sirih merah merupakan daun yang berasal dari tanaman sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz and Pav.) keluarga Piperaceae yang diambil dari daerah Klaten, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun sirih merah adalah serbuk yang diperoleh dari penghancuran simplisia kering daun sirih merah.

Ketiga, ekstrak daun sirih merah adalah sari daun sirih merah yang diperoleh dari maserasi dengan menggunakan cairan penyari etanol 70% dan mengandung sejumlah zat berkhasiat.

Keempat, dosis ekstrak daun sirih merah diperoleh berdasarkan dosis yang diperoleh dari masa orientasi terhadap hewan uji.

Kelima, *natatory exhaustion* merupakan uji tonikum yang dilakukan dengan cara merenangkan mencit untuk mengetahui selisih waktu lelah mencit sebelum diberi perlakuan (T₀) dan setelah diberi perlakuan (T₁).

Keenam, kontrol positif yang digunakan adalah kafein, karena memiliki efek stimulan terhadap sistem syaraf pusat sehingga mengurangi rasa lelah.

Ketujuh, hewan uji yang digunakan adalah mencit putih jantan galur Swiss, berusia 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram.

Kedelapan, efek tonikum adalah efek yang menunjukkan penambahan waktu lelah mencit.

Kesembilan, waktu lelah adalah lamanya mencit mengalami kelelahan selama direnangkan ditandai dengan hewan uji membiarkan kepalanya berada di bawah permukaan air selama lebih dari 7 detik dan dicatat sebagai interval dari waktu memasukkan hewan uji ke dalam tangki air hingga timbul lelah.

Kesepuluh, dosis efektif adalah dosis terkecil yang memiliki efek tonikum sebanding dengan kontrol positif.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan pembuatan simplisia yaitu gunting dan oven, peralatan untuk pembuatan ekstrak yaitu alat penyerbuk, ayakan nomer 40, botol kaca, corong kaca, kain flanel, kertas saring dan *rotary evaporation*. Alat untuk uji tonikum adalah sputit injeksi dengan jarum oral

(ujung tumpul), beaker glass, batang pengaduk, timbangan analitik, *stopwatch*, dan tangki air besar (kolam uji).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih merah yang diambil dari daerah Klaten, Jawa Tengah. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah CMC Na, kafein, aquadest dan etanol 70%. Hewan uji yang digunakan adalah mencit putih jantan dengan berat badan 20-30 gram dan berusia 2-3 bulan. Hewan uji tersebut diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Surakarta.

D. Jalannya Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut :

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah determinasi tanaman sirih merah untuk memastikan kebenarannya yang berkaitan dengan morfologi tanaman terhadap kepustakaan. Determinasi tanaman dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Tawangmangu, Karanganyar.

2. Pengumpulan bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih merah yang diperoleh dari daerah Klaten, Jawa tengah. Daun sirih merah yang diambil kurang lebih sebanyak 2 kg.

3. Pengeringan bahan

Daun sirih merah yang telah dikumpulkan dicuci bersih menggunakan air untuk menghilangkan kotoran dan cemaran kemudian ditiriskan. Daun sirih merah yang sudah bersih kemudian dirajang dan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 40°C.

4. Pembuatan serbuk

Daun sirih merah yang telah kering selanjutnya diserbuk menggunakan alat penyerbak, kemudian diayak dengan ayakan nomer 40. Serbuk yang diperoleh kemudian ditimbang dan disimpan dalam wadah yang tertutup rapat.

5. Pengujian kelembaban serbuk

Pengujian kelembaban serbuk dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Caranya adalah dengan memasukkan serbuk ke dalam alat *moisture balance* sebanyak 2 gram dengan suhu 105°C, kemudian ditunggu hingga alat memberikan tanda bunyi. Kelembapan dalam serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10% (Depkes RI, 1985).

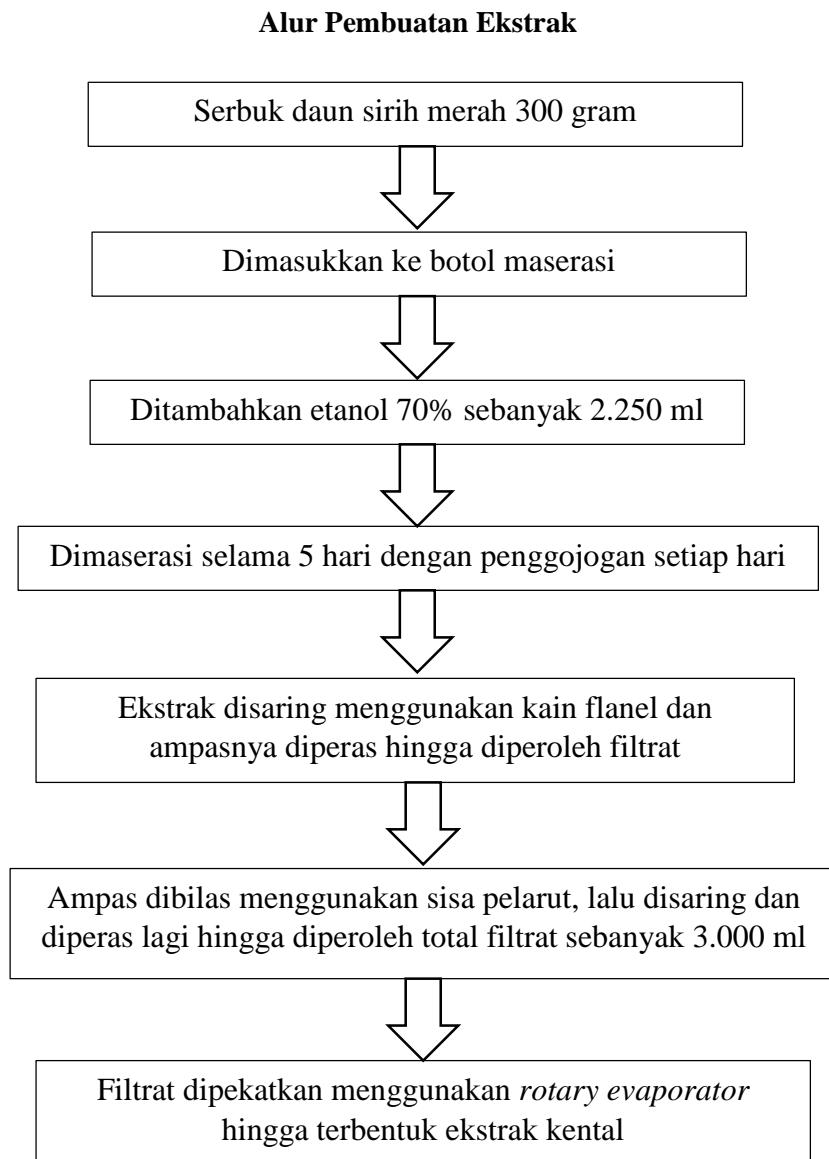
6. Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak daun sirih merah dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi yang paling sederhana, murah, dan paling mudah untuk dilakukan. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia kedalam cairan penyari yang cocok.

Maserasi pada umumnya dilakukan dengan cara 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok dimasukkan ke dalam bejana, kemudian dituangi 75 bagian cairan penyari, ditutup dan dibiarkan selama lima hari terlindung dari cahaya

sambil berulang-ulang diaduk. Setelah lima hari, sari diserkai lalu ampasnya diperas. Ampas kemudian ditambah dengan cairan penyari secukupnya, diaduk dan diserkai, sehingga diperoleh seluruh sari sebanyak 100 bagian (Depkes RI, 1986).

Pembuatan ekstrak etanol daun sirih merah dilakukan dengan merendam serbuk daun sirih merah sebanyak 300 gram ke dalam botol maserasi dan ditambahkan dengan etanol 70% sebanyak 2.250 ml lalu dimaserasi selama 5 hari dengan penggojogan setiap hari. Ekstrak disaring dengan kain flanel dan ampasnya diperas, kemudian ampas dibilas menggunakan pelarut dan disaring kembali hingga diperoleh filtrat sebanyak 3.000 ml. Filtrat yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* kemudian dimasukkan ke dalam oven hingga dapatkan ekstrak kental.



Gambar 4. Skema pembuatan ekstrak daun sirih merah.

7. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun sirih merah

7.1. Identifikasi flavonoid. Sebanyak 0,1 g ekstrak daun sirih merah dimasukkan ke dalam gelas piala kemudian ditambahkan 10 ml air panas dan didihkan selama 5 menit. Setelah itu, disaring dan filtratnya digunakan untuk pengujian. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 0.5 g serbuk Mg, 1 mL HCl pekat, dan 1 mL amil alkohol kemudian dikocok dengan kuat. Positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Harbone, 1987).

7.2. Identifikasi saponin. Identifikasi saponin dilakukan dengan cara 1 mg ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 ml air panas dan dibiarkan mendingin, setelah itu dikocok kuat-kuat selama 10 detik maka akan terbentuk busa atau buih yang stabil (Depkes RI, 1980).

7.3. Identifikasi tanin. Identifikasi tanin dilakukan dengan cara sebanyak 1,0 g ekstrak daun sirih merah ditambahkan air kemudian didihkan selama beberapa menit, setelah itu larutan ditambahkan FeCl₃. Terbentuknya warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Harbone, 2007).

8. Pembuatan larutan stok

8.1. CMC Na 0,5%. Pembuatan larutan CMC Na 0,5% dilakukan dengan cara melarutkan 500 mg CMC Na ke dalam air hingga 100 ml kemudian diaduk hingga terlarut.

8.2. Kafein. Kafein digunakan sebagai kontrol positif. Pada penelitian Mafitri & Parmadi (2018), dosis kafein yang diberikan pada mencit adalah 13 mg/kgBB. Larutan kafein dibuat dengan konsentrasi 0,1%. Pembuatan larutan

dilakukan dengan cara melarutkan 100 mg kafein ke dalam larutan CMC Na hingga 100 ml.

8.3. Larutan ekstrak. Larutan ekstrak daun sirih merah dibuat dengan konsentrasi 0,5%. Pembuatan larutan ekstrak dilakukan dengan cara melarutkan 500 mg ekstrak daun sirih merah ke dalam larutan CMC Na hingga 100 ml.

9. Prosedur pengujian

Hewan uji berupa mencit putih jantan dengan berat badan 20-30 gram sebanyak 25 ekor. Hewan uji kemudian dibagi menjadi 5 kelompok, dimana tiap kelompok masing-masing terdiri atas 5 ekor mencit jantan. Pembagian kelompok untuk tiap perlakuan adalah sebagai berikut :

Kelompok I : CMC Na 0,5% sebagai kontrol normal

Kelompok II : Kafein 13 mg/kgBB mencit sebagai kontrol positif

Kelompok III : Ekstrak daun sirih merah 35 mg/kgBB mencit

Kelompok IV : Ekstrak daun sirih merah 70 mg/kgBB mencit

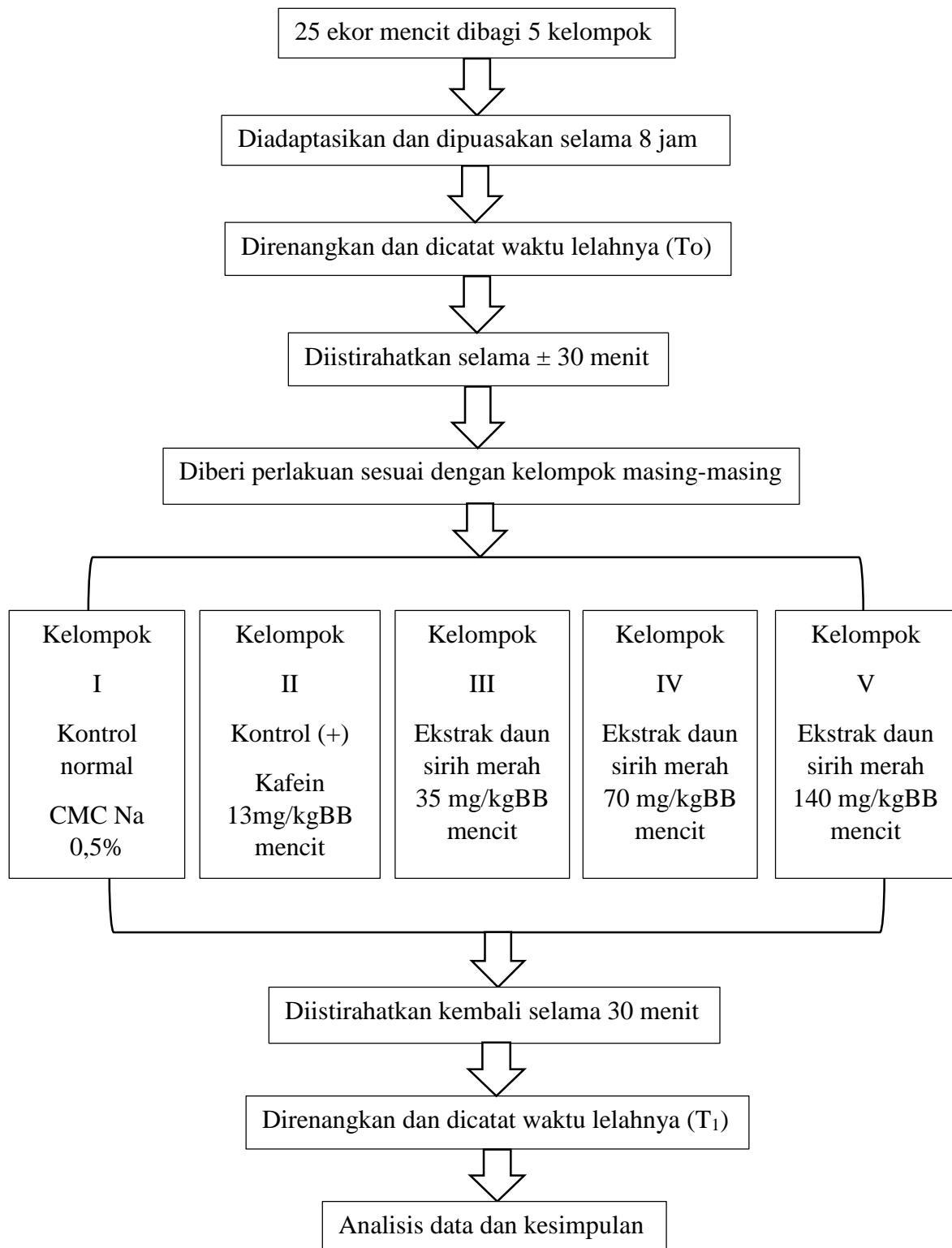
Kelompok V : Ekstrak daun sirih merah 140 mg/kgBB mencit

Sebelum mencit digunakan, mencit terlebih dahulu diadaptasikan selama satu minggu dan dipuaskan selama 8 jam (Mafitri & Parmadi , 2018). Kemudian, sebelum mencit diberi perlakuan, masing-masing kelompok mencit direnangkan terlebih dahulu dan dicatat waktu lelahnya. Waktu lelah mencit ditandai dengan mencit membiarkan kepalanya berada di bawah permukaan air selama 7 detik. Mencit kemudian diistirahatkan dan dikeringkan selama 30 menit, kemudian diberi perlakuan sesuai kelompoknya secara per oral. Mencit yang sudah diberi perlakuan

kemudian diistirahatkan kembali selama 30 menit lalu direnangkan kembali hingga timbul tanda-tanda kelelahan. Waktu lelah mencit kemudian dicatat.

Data waktu lelah mencit yang diperoleh sebelum dan sesudah pemberian perlakuan adalah untuk melihat adanya pengaruh dari perlakuan terhadap kelelahan yang terjadi. Pemberian perlakuan dimaksudkan untuk memperoleh data penambahan waktu lelah mencit yang merupakan indikasi adanya efek tonikum dari ekstrak daun sirih merah.

Alur Penelitian



Gambar 5. Skema kerja penelitian.

E. Analisis Hasil

Data penambahan waktu lelah mencit yang diperoleh dianalisis dengan *One Sample Kolmogorov-Smirnov Test*. Apabila data terdistribusi normal (signifikansi $> 0,05$), analisis data kemudian dilanjutkan dengan *One Way Anova* menggunakan program aplikasi SPSS untuk mengetahui perbedaan yang nyata diantara perlakuan. Jika hasil uji *One Way Anova* dan uji *Lavene Statistic* menunjukkan hasil normal (signifikansi $> 0,05$), selanjutnya dilakukan uji *Turkey* untuk melihat waktu lelah atau efek tonikum yang paling baik diantara kelompok perlakuan dan perbedaan antara masing-masing kelompok, namun bila hasilnya tidak normal, maka uji non parametrik menggunakan *Kruskal Wallis Test* dan uji lanjutan *Mann-Whitney Test*.