

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi, Sampel dan Hewan Uji

1. Populasi

Populasi yang dipakai dalam penelitian ini yaitu tanaman pepaya (*Carica papaya* L.) di Kecamatan Tawamangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah

2. Sampel

Sampel yang dipakai dalam penelitian ini yaitu daun tanaman pepaya (*Carica papaya* L.) yang diambil di Kecamatan Tawamangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah. Daun diambil pada pagi hari karena belum banyak terjadi penguapan sehingga daun masih segar.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Adapun alat-alat yang digunakan antara lain *handscoon*, kandang mencit, tempat makan dan minum mencit, gelas ukur, *beaker glass*, batang pengaduk, *erlenmeyer*, tabung reaksi, cawan petri dan peralatan laboratorium lainnya.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya, daun pepaya varietas California (*Carica papaya* L.), etanol 70%, *oleum ricini*, loperamid, suspensi Na-CMC 1% ,akuades, *etil asetat* dan *n-heksana*.

3. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mencit jantan (*Mus musculus*) dewasa yang sehat dan memiliki berat antara 20-30 gram. Hewan uji yang digunakan sebanyak 30 ekor yang dibagi menjadi 6 perlakuan.

C. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini yaitu efektivitas ekstrak etanol dan fraksi air daun pepaya varietas California (*Carica papaya* L.) sebagai antidiare. Variabel kedua dalam penelitian ini yaitu mencit putih jantan yang digunakan sebagai hewan uji, variabel ketiga dalam penelitian ini yaitu penentuan efek antidiare pada hewan uji mencit.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam tiga variabel, diantaranya variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu pemberian dosis ekstrak daun pepaya yang telah ditetapkan. Variabel terkontrol dalam penelitian ini meliputi berat hewan uji, kondisi lingkungan, kondisi fisik hewan uji dan pakan yang diberikan. Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu menurunnya frekuensi fase pada hewan uji setelah diberikan perlakuan.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun pepaya adalah daun yang terbebas dari hama yang dipetik pada pagi hari yang diperoleh di Kecamatan Tawamangu, Kabupaten Karanganyar.

Kedua, ekstrak etanol daun pepaya adalah ekstrak yang diperoleh dengan cara maserasi daun pepaya dengan pelarut etanol 70%.

Ketiga, fraksi air dari daun pepaya adalah fraksi yang diperoleh dari ekstrak etanol daun pepaya yang telah dilakukan fraksinasi.

Keempat, hewan uji adalah mencit putih jantan dewasa dengan berat sekitar 20-30 gr yang diperoleh dari Fakultas Farmasi Universitas Setiabudi Surakarta.

Kelima, induksi antidiare yang digunakan adalah *oleum ricini* atau minyak jarak yang akan diinduksikan secara oral pada semua hewan uji sebelum diberikan perlakuan.

Keenam, efek antidiare yang ditimbulkan adalah efek antidiare yang berasal dari ekstrak etanol daun pepaya yang diberikan kepada hewan uji secara peroral.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengumpulan Sampel.

Pengumpulan daun pepaya dilakukan dengan mengambil daun pepaya tua yang segar dan tidak terdapat lubang bekas dimakan serangga atau hama, berwarna hijau yang diambil pada tangkai ke 5 dan 6 pucuk paling bawah. Daun pepaya yang digunakan dalam penelitian ini diambil di kecamatan Tawamangu.

2. Determinasi Tanaman.

Proses menentukan nama atau jenis tanaman tertentu dikenal sebagai determinasi tanaman. Proses ini dilakukan dengan tujuan untuk

memastikan kebenaran bahan yang digunakan dalam penelitian dan untuk menghindari kesalahan saat mengumpulkan bahan yang akan diteliti. Di Laboratorium Morfologi Sistematika Tumbuhan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta, berat daun pepaya diukur. Determinasi dilakukan di Laboratorium Morfologi Sistematika Tumbuhan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

3. Pembuatan Serbuk Daun Pepaya.

Daun pepaya sebanyak 2 kg dikumpulkan kemudian dicuci bersih menggunakan air mengalir, lalu dipotong kecil-kecil, setelah itu dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 40 °C. Setelah kering, daun tersebut dibuat serbuk simplisia dengan cara dihaluskan menggunakan blender.

4. Penetapan Susut Pengeringan Ekstrak.

Sebanyak 1-2 gram ekstrak dimasukkan ke dalam krus porselen dipanaskan dalam oven pada suhu antara 100°C hingga 105°C selama 30 menit, lalu ditimbang. Proses pemanasan ini diulang hingga diperoleh berat yang stabil, dengan selisih kurang dari 0,50 mg untuk setiap gram bahan yang digunakan.

5. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Pepaya

Sebanyak 1000 gram serbuk simplisia daun pepaya dimasukkan ke dalam wadah maserasi lalu ditambahkan pelarut etanol 70% hingga terendam seluruhnya. Rendam ekstrak kira-kira 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian biarkan selama 18 jam. Melakukan filtrasi untuk memisahkan maserat, lalu filtrat dipisahkan dari ampas dengan kain flanel. Ampas ditambah dengan pelarut yang baru sebanyak setengah kali pelarut pertama kemudian rendam kembali ekstrak selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian dibiarkan selama 18 jam, saring filtrat lalu pekatkan. Pemekatan filtrat dilakukan dengan rotary evaporator pada suhu 40°C dan untuk memperoleh sediaan kental filtrat harus diuapkan dengan waterbath.

6. Penetapan Kadar Air Ekstrak

Penetapan kadar air ekstrak etanol daun pepaya dilakukan dengan metode moisture balance. Sebanyak 2 gram ekstrak ditimbang dan dikeringkan pada suhu 105 °C hingga bobot stabil.

Metode yang digunakan dalam penetapan kadar air ekstrak yaitu metode *Moisture Balance*. Penetapan kadar air ekstrak menggunakan alat *moisture balance* dilakukan dengan cara, pertama menyalakan alat, lalu mengatur waktu, suhu dan mode pemanasan, setelah itu membuka

bagian penutup pada alat, memasukan pan aluminium kosong bersih kedalam alat, lalu penutup kembali ditutup, pada saat ini alat akan melakukan tare secara otomatis, setelah itu bagian penutup alat dibuka, sampel ekstrak daun pepaya yang telah dihaluskan diletakan di atas pan aluminium secara merata, lalu alat ditutup kembali. Alat akan memanaskan sampel hingga menunjukkan nilai kadar air sampel yang terbaca konstan. Pada penelitian ini menggunakan metode *Moisture Balance* dikarenakan waktu pengerjaan singkat (3-15 menit), cara pengoprasian lebih mudah dan tidak dipengaruhi oleh human eror pada saat penimbangan sampel.

7. Fraksinasi

Sebanyak 10 g ekstrak etanol daun pepaya ditambahkan akuades dan n-heksan sebanyak 75 mL. kemudian dilakukan ekstraksi cair-cair dalam corong pisah lalu dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Filtrat yang berada di bagian atas merupakan fraksi n-heksana dan filtrat yang berada dibagian bawah yaitu air. Fraksi n-heksana kemudian dipisahkan dari fase air sehingga dapat diperoleh fraksi n-heksana. Hasil fraksinasi tersebut lalu dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40°C dan ditimbang. Residu air yang diperoleh dari fraksinasi n-heksana kemudian difraksinasi lagi dalam corong pisah dengan menggunakan pelarut etil asetat sebanyak 75 ml dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Filtrat yang berada dibagian atas merupakan fraksi etil asetat, sedangkan filtrat yang berada dibagian bawah yaitu fraksi air. Fraksi etil asetat kemudian dipisahkan dari fase air sehingga dapat diperoleh fraksi etil asetat. Hasil fraksinasi tersebut lalu dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40°C dan ditimbang. Residu yang diperoleh dari proses fraksinasi etil asetat merupakan fraksi air. Fraksi air yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan waterbath pada suhu kurang dari 50°C dan ditimbang.

8. Identifikasi Senyawa

Identifikasi senyawa ekstrak etanol daun pepaya pada penelitian ini dilakukan dengan uji tabung, dengan konsentrasi sampel ekstrak sebesar 500 mg/50 mL.

8.1. Identifikasi alkaloid. Pengujian alkaloid dengan metode tabung dimulai dengan persiapan preparasi sampel dahulu yang dilakukan melalui proses penguapan larutan uji 2 mL digunakan untuk mengidentifikasi alkaloid. Larutan yang dihasilkan dibagi ke dalam

lima tabung reaksi. Tabung pertama mengandung 3 tetes HCl 2N (blanko), tabung kedua mengandung 3 tetes pereaksi mayer, tabung ketiga mengandung 3 tetes pereaksi dragendorff, tabung keempat mengandung 3 tetes pereaksi wagner, dan tabung kelima mengandung 3 tetes pereaksi Hager. Adanya alkaloid di tabung ke-5, tabung ke-2, endapan jingga, endapan merah kecoklatan, dan endapan putih menunjukkan adanya alkaloid (Farnsworth, 1966).

8.2. Identifikasi steroid dan terpenoid. Larutan sampel uji sebanyak 0,5 mL+0,5 mL asam asetat+2 mL asam sulfat. Adanya terpenoid ditandai dengan terbentuknya cincin kecoklatan pada perbatasan larutan, sedangkan cincin biru kehijauan menunjukkan adanya sterol (Ciulei, 1984).

8.3. Identifikasi flavonoid. Sebanyak 0,5 gram larutan sampel uji ditimbang lalu masukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan Mg (s) dan larutan HCl. Adanya perubahan warna menjadi merah bata menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Sopianti dan Dede, 2018).

8.4. Identifikasi saponin. Larutan sampel uji 10 mL digojog selama 10 detik, lalu dibiarkan selama 10 detik. Apabila terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil ketika ditambahkan 1 tetes HCl 2N, maka sampel dikatakan positif mengandung saponin (Depkes RI, 1995).

8.5. Identifikasi tannin. Larutan uji sebanyak 1 mL+besi (III) klorida 10%. Adanya senyawa tannin ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua atau hitam (Robinson, 1991).

8.6. Identifikasi glikosida. Larutan uji sampel ekstrak 0,1 mL diuapkan di penangas air. Residunya dilarutkan dengan 5 mL asam asetat P+10 tetes asam sulfat, perubahan warna menjadi biru atau hijau menunjukkan adanya glikosida (Depkes RI, 1995).

9. Pembuatan Larutan Uji

9.1. Pembuatan Suspensi obat Loperamid HCl. Suspensi obat loperamid dibuat dengan cara sebanyak 20 tablet Loperamid dengan dosis 2mg/tablet digerus dalam mortir. Serbuk ditimbang sebesar 7,5 mg, kemudian ditambahkan 10 ml larutan Na-CMC 1% b/v sedikit demi sedikit lalu digerus sampai tercampur homogen.

9.2. Pembuatan Larutan Na-CMC 1%. Akuades hingga 100 ml dipanaskan pada suhu 70°C, lalu ditambahkan 1 gram Na-CMC dimasukan sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga homogen.

9.3. Pembuatan Fraksi Air Daun Pepaya. Suspensi fraksi air daun pepaya dengan larutan stok 1%. Sebanyak 1 gram fraksi air daun pepaya ditimbang dimasukkan dalam mortir, lalu ditimbang Na CMC 1 gram kemudian ditambahkan akuades hangat lalu digerus sampai terbentuk mucilago, setelah itu fraksi air daun pepaya kental dimasukkan dan gerus sampai homogen, kemudian ditambahkan akuades ad 100 ml.

10. Penentuan Dosis

10.1 Dosis Ekstrak. Pemberian dosis ekstrak daun pepaya pada penelitian ini berdasarkan orientasi dosis yang didapat yaitu 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, 800 mg/kgBB. Dosis tersebut mengacu pada dosis biji pepaya dari penelitian sebelumnya yang di lakukan oleh Purwaningdyah *et al.*, (2015). Penentuan variasi dosis berdasarkan rumus kelipatan $1/2n$, n , dan $2n$.

10.2 Dosis Fraksi. Pemberian dosis fraksi air daun pepaya pada penelitian ini berdasarkan hasil perhitungan dosis perbandingan rendemen yang diperoleh dengan ekstrak yang didapat yaitu 138,40 mg/kgBB, 276,80 mg/kgBB, 553,61 mg/kgBB. Dosis yang efektif pada perlakuan ini adalah dosis 553,61 mg/kgBB. Dosis fraksi air daun pepaya dihitung dengan menggunakan rumus di bawah ini :

$$= \frac{\text{Randemen fraksi yang di dapat}}{\text{randemen ekstrak yang di dapat}} \times \text{dosis ekstrak yang digunakan}$$

10.3 Dosis Loperamid. Obat komersial yang ada dipasaran (Loperamid HCl) digunakan untuk antidiare yang berlaku sebagai kontrol positif. Dosis lazim yang digunakan untuk manusia dewasa yaitu 2 mg. Faktor konversi dari manusia ke mencit 20 gram adalah 0,0026. Dosis loperamid HCl untuk mencit $2 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,0052 \text{ mg/20gBB mencit}$.

E. Pemilihan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mencit putih (*Mus musculus*) jantan dengan keadaan sehat dan memiliki berat rata-rata 20-30 gram. Pada penelitian ini menggunakan mencit berjenis kelamin jantan dikarenakan hewan uji mudah dikendalikan dan tidak rawan stres dibanding dengan mencit betina, sehingga diharapkan hasil yang diperoleh akan lebih akurat.

F. Perlakuan Hewan Uji

Pertama mencit diadaptasikan dengan kondisi lingkungan dengan waktu selama satu minggu. Mencit kemudian dipuasakan selama satu jam sebelum penelitian dimulai, kemudian mencit dibagi menjadi enam kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor mencit. Satu jam setelah dipuasakan, setiap kelompok diberi perlakuan sesuai dengan kelompoknya. Kelompok I diberikan suspensi Na-CMC 1% sebagai kontrol negatif, kelompok II diberi suspensi Loperamid HCl sebagai pembanding obat, kelompok III diberi suspensi ekstrak etanol daun pepaya dengan dosis 200 mg/kg BB, kelompok IV dengan dosis 400 mg/kg BB, kelompok V dengan dosis 800 mg/kg BB, dan kelompok VI diberikan fraksi air ekstrak etanol daun pepaya dengan dosis 553,61. Semua perlakuan diberikan secara oral. Penentuan variasi dosis didasarkan pada rumus kelipatan $1/2 n$, n , dan $2n$. Sebelum pemberian perlakuan, semua mencit diberi *Oleum ricini* secara oral satu jam sebelumnya. Kemudian, diamati waktu mulai terjadinya diare, durasi diare, dan frekuensi feses setiap 30 menit selama 6 jam.

G. Cara Pengamatan Parameter Diare

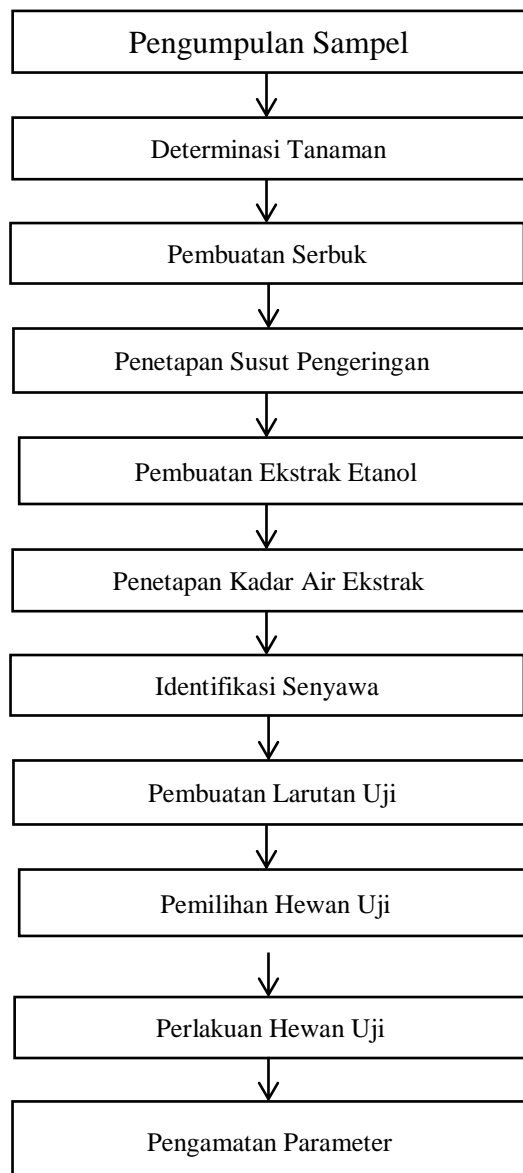
Awal saat terjadinya diare diamati melalui mencatat menit waktu mula-mula terjadinya diare setelah pemberian *oleum ricini*. Lama terjadinya diare, dilakukan dengan cara mencatat selisih waktu awal terjadinya terjadinya dengan waktu akhir terjadinya diare dalam 40 menit. Konsistensi feses, dilakukan dengan cara mengamati bentuk feses yang keluar dari hewan uji. Frekuensi terjadinya diare diamati melalui perhitungan banyaknya terjadi diare pada hewan uji selama pengamatan.

H. Analisis Data

Data pengujian ekstrak daun pepaya sebagai anti-diare diolah dan dianalisis menggunakan metode ANOVA dan Kruskal-Wallis melalui program SPSS. Proses analisis dimulai dengan uji Shapiro-Wilk untuk memeriksa distribusi normalitas data. Jika nilai $p < 0,05$, data dianggap normal; jika tidak, uji non-parametrik akan dilakukan. Jika data terdistribusi normal, analisis dilanjutkan dengan uji homogenitas untuk menguji variansi antar kelompok. Data dianggap homogen jika nilai signifikansi $> 0,05$. Selanjutnya, uji ANOVA akan

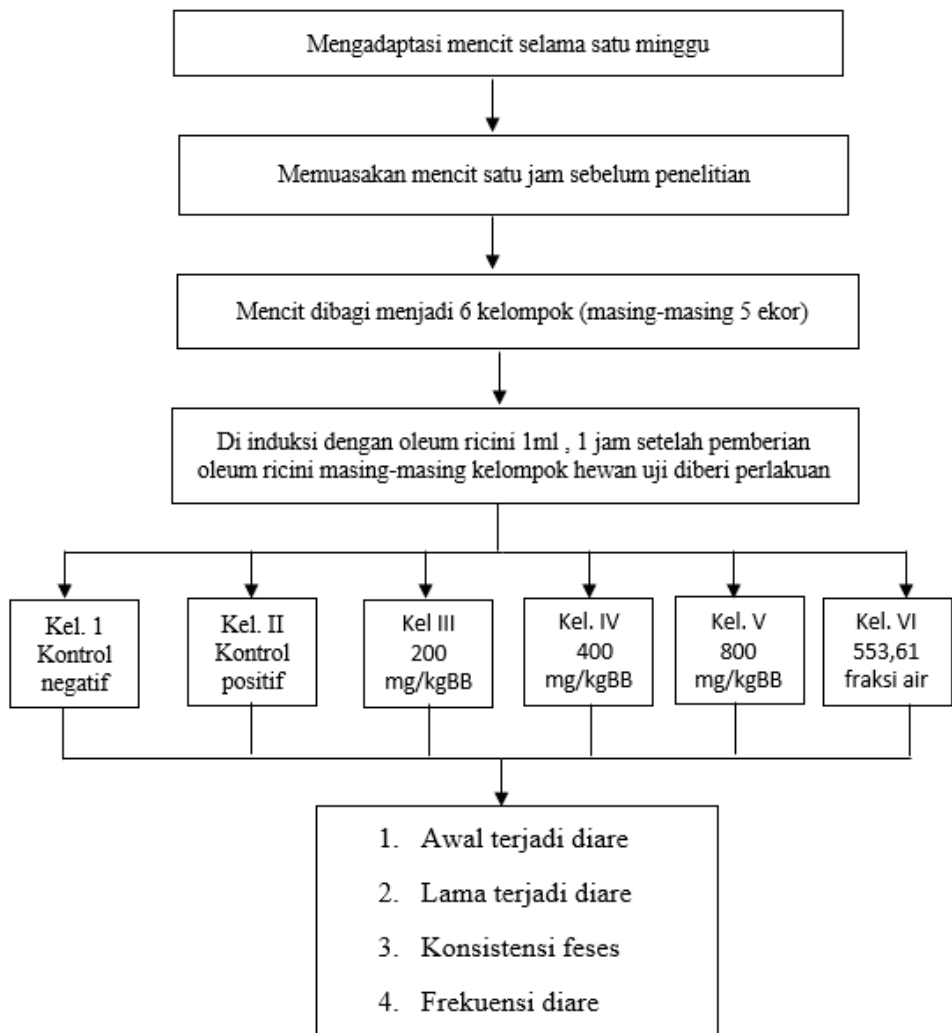
dilakukan dan jika nilai signifikansi $<0,05$, dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antar perlakuan. Terakhir, uji Tukey HSD digunakan untuk membandingkan rata-rata antar semua perlakuan.

I. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

J. Skema jalannya penelitian



Gambar 6. Skema Jalannya Penelitian