

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Mei 2023. Sampel yang dipilih adalah herba sambiloto yang masih segar, warna hijau tua, dan tidak cacat.

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama penelitian yang pertama adalah ekstrak etanol 70% dilanjutkan dengan fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari herba sambiloto. Variabel utama penelitian yang kedua adalah aktivitas tonikum ekstrak dan fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari herba sambiloto terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus*) dengan metode uji gelantung.

#### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama diklasifikasikan menjadi tiga yaitu variabel bebas, variabel terikat, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang dapat menyebabkan perubahan pada variabel terikat (Sugiyono, 2013). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak herba sambiloto, dosis fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari herba sambiloto.

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi oleh atau menjadi akibat dari variabel bebas (Sugiyono, 2013). Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas tonikum dengan ekstrak dan fraksi *n*-heksana, etil asetat, air dari herba sambiloto terhadap mencit jantan putih (*Mus musculus*) yang meliputi waktu mencit bergelantung sebelum perlakuan dan setelah perlakuan.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dikendalikan sehingga pengaruh variabel bebas terhadap variabel terikat tidak terpengaruh (Sugiyono, 2013). Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kondisi fisik mencit meliputi berat badan, lingkungan hidup, jenis kelamin, kondisi kandang, kondisi penelitian dan kondisi pengamatan, kondisi alat gelantung, prosedur ekstraksi dan fraksinasi.

### 3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) adalah herba dalam kondisi yang masih segar, warna hijau tua, dan tidak cacat. Diperoleh dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk herba sambiloto adalah serbuk yang dihasilkan dari proses pengambilan bahan, sortasi basah, pencucian, pengeringan, sortasi kering, setelah kering dihaluskan dengan blender, diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak herba sambiloto adalah hasil ekstraksi serbuk herba sambiloto dengan pelarut etanol 70% dengan metode maserasi.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah fraksi dari ekstrak herba sambiloto yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana sebagai pelarut non polar.

Kelima, fraksi etil asetat adalah residu fraksi *n*-heksana dari ekstrak herba sambiloto yang difraksinasi dengan pelarut etil asetat sebagai pelarut semi polar.

Keenam, fraksi air adalah residu fraksi etil asetat dari ekstrak herba sambiloto diuapkan menggunakan *waterbath*.

Ketujuh, uji aktivitas tonikum adalah pengujian yang menggunakan metode gelantung dari besi 50 cm (lebar gelantungan) dan dipasang mendatar atau horizontal di atas permukaan meja setinggi 20 cm. Durasi ketahanan gelantung untuk menentukan fraksi teraktif terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus*).

## C. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Alat yang digunakan antara lain blender, ayakan mesh no 40, timbangan analitik, maserasi botol gelap, kertas saring, kain flannel, corong, batang pengaduk, evaporator, *waterbath*, stopwatch, besi gelantung, spuit dengan jarum tumpul, beaker glass, gelas ukur, tabung reaksi, cawan penguap, rak tabung, gelas ukur, aluminium foil, lampu spiritus, lempeng KLT, pipa kapiler, lampu UV 254 dan 366 nm, corong pisah, gelas ukur, kandang mencit, *moisture balance*.

### 2. Bahan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba sambiloto yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Dengan kondisi herba sambiloto yang masih segar,

warna hijau tua, dan tidak cacat. Hewan uji mencit putih jantan (*Mus musculus*), sehat, berat badan  $\pm 20$  g, umur 2-3 bulan yang didapat dari Laboratorium Universitas Setia Budi. Pelarut etanol 70%, *n*-heksana, aquadest, etil asetat. Kontrol negatif menggunakan suspensi Na CMC 0,5%. Kontrol positif menggunakan kafein. Reagen menggunakan Dragendorff, Sudan III Wagner dan Mayer, amoniak, sitroborat, asam klorida 2N, serbuk magnesium, iodium naftol,  $H_2SO_4$ , asam asetat, kloroform.

#### **D. Jalannya Penelitian**

##### **1. Determinasi herba sambiloto**

Determinasi dilakukan untuk memastikan keakuratan sampel herba sambiloto berkaitan dengan karakteristik morfologi yang terdapat pada tanaman sambiloto yang dilakukan di Laboratorium Materia Medica, Jawa Timur.

##### **2. Pengambilan bahan**

Herba sambiloto diperoleh dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Mei 2023. Dengan memilih herba sambiloto yang masih segar, warna hijau tua, tidak cacat, bebas hama dan bahan kimia agar terjamin mutu dan kualitas herba sambiloto yang digunakan.

##### **3. Pembuatan serbuk herba sambiloto**

Herba sambiloto dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan tanah dan kotoran lainnya, kemudian dirajang, dan dikeringkan. Setelah kering dihaluskan dengan blender, dan diayak dengan ayakan nomor 40.

##### **4. Penetapan susut pengeringan serbuk**

Penetapan susut pengeringan dengan menimbang 2 g serbuk herba sambiloto, dimasukkan ke dalam *moisture balance* dengan suhu  $105^{\circ}C$ . Setelah beberapa waktu, alat akan mengeluarkan bunyi “bip” yangandakan bahwa berat serbuk sudah konstan. Hasil susut pengeringan dinyatakan dalam satuan persen seperti yang tertera dalam *moisture balance* (Setyawati, 2018). Penentuan susut pengeringan herba sambiloto dilakukan sebanyak tiga kali, dengan nilai susut pengeringan yang baik adalah kurang dari 10% (Kemenkes, 2017).

##### **5. Pembuatan ekstrak herba sambiloto**

Serbuk herba sambiloto diekstraksi dengan metode maserasi. Maserasi dilakukan dengan 1000 g serbuk herba sambiloto dalam 10 bagian etanol 70% didiamkan selama 6 jam dengan sesekali digojog,

diamkan selama 18 jam. Disaring dengan kain flannel, kemudian disaring kembali menggunakan kertas saring. Residu diremaserasi menggunakan dengan setengah bagian pelarut yang dimaserasi, diamkan selama 6 jam dengan sesekali digojoj, kemudian diamkan selama 18 jam. Disaring dengan kain flannel, dan disaring kembali menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh pada maserasi dan remaserasi digabungkan. Diuapkan dengan evaporator sampai menghasilkan ekstrak yang kental (Kemenkes RI, 2017).

Perhitungan rendemen bertujuan untuk menentukan persentase ekstrak herba sambiloto dari setiap gram serbuk kering dengan metode maserasi. Persentase rendemen dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut: (Kemenkes RI, 2017).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Bobot serbuk kering sebelum diekstraksi (g)}} \times 100\%$$

## 6. Penetapan kadar air ekstrak

Kadar air ditentukan menggunakan metode gravimetri dengan cara menimbang 10 g ekstrak herba sambiloto, memasukkannya ke dalam wadah yang telah ditara. Dikeringkan didalam oven dengan suhu 105°C selama 5 jam, kemudian ditimbang. Pengeringan dilanjutkan dan ditimbang dengan selang waktu 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbangan tidak lebih dari 0,25% (Kemenkes RI, 2017). Penentuan kadar air simplisia merupakan pemenuhan syarat kadar air ekstrak yang bermutu tinggi. Kadar air ditentukan karena air yang tersisa dalam ekstrak merupakan tempat berkembangbiaknya jamur dan mikroorganisme pada kadar air tertentu. Pertumbuhan jamur dan mikroorganisme dapat menyebabkan perubahan kimia pada zat aktif dan dapat menyebabkan penurunan kualitas ekstrak (Depkes, 2010).

## 7. Pembuatan fraksi ekstrak etanol herba sambiloto

Fraksinasi menggunakan metode ekstraksi cair-cair dilakukan dengan cara ditimbang 10 g ekstrak herba sambiloto dilarutkan dengan etanol 70% 10 mL, 65 mL aquadest dimasukkan dalam corong pisah dan ditambah 75 mL *n*-heksana, kemudian dipartisi sampai fase *n*-heksana tidak berwarna atau bening. Fase *n*-heksana dipekatkan dengan evaporator pada suhu 50°C. Hasil ditimbang dan fraksi ini disebut fraksi *n*-heksana. Residu yang diperoleh dari partisi *n*-heksana dimasukkan dalam corong pisah, ditambah 75mL etil asetat, kemudian dipartisi sampai fase etil asetat tidak berwarna atau bening. Fase etil asetat dipekatkan dengan evaporator pada suhu 50°C. Hasil ditimbang dan fraksi ini disebut fraksi etil asetat. Residu yang diperoleh dari

partisi etil asetat dipekatkan dengan *waterbath* pada suhu 50°. Hasil ditimbang dan fraksi ini disebut fraksi air (Agustia, 2019). Rendemen fraksi dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot fraksi}}{\text{Bobot ekstrak herba sambiloto}} \times 100\%$$

## 8. Pengujian kandungan kimia ekstrak herba sambiloto

Identifikasi kandungan senyawa kimia herba sambiloto dilakukan di laboratorium Universitas Setia Budi.

**8.1. Flavonoid.** Sampel ditimbang 0,5 g yang ditambahkan Mg 0,1 g, beberapa tetes HCl pekat, dan 1 mL amil alkohol. Dikocok, larutan berubah menjadi merah bata, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Romana *et al.*, 2015).

**8.2. Alkaloid.** Sampel ditimbang 2 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditetesi dengan 5 mL HCl 2 N yang dipanaskan, lalu biarkan dingin dan dibagi menjadi 3 bagian tabung reaksi masing-masing 1 mL. Setiap tabung diisi dengan masing-masing reagen. Jika ditambahkan pereaksi Mayer, maka akan positif mengandung alkaloid jika terbentuk endapan putih atau kuning. Penambahan pereaksi Wagner akan memberikan hasil positif alkaloid jika terbentuk endapan berwarna coklat. Pada penambahan pereaksi Dragendorff yang mengandung alkaloid jika merah atau jingga (Muthamainnah, 2017).

**8.3. Saponin.** Sampel 1 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan 10 mL air panas, dinginkan dan dikocok kuat 10 detik. Hasil positif saponin jika terbentuk busa 1-10 cm tidak kurang dari 10 menit dan ketika ditambahkan 1 tetes HCl 2 N busanya tidak hilang (Muthamainnah, 2017).

**8.4. Tanin.** Sampel ditimbang 0,5 g, ditambahkan 3 tetes FeCl<sub>3</sub>. Terbentuknya endapan biru-hitam, hijau kehitaman atau biru-hijau menunjukkan adanya tanin (Indriyana, 2020).

**8.5. Steroid /triterpenoid.** Sampel setengah gram ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard yang terbuat dengan asam asetat glasial, kloroform, dan HCL pekat. Adanya steroid ditandai terbentuknya cincin biru kehijauan, adanya triterpenoid ditandai terbentuknya cincin merah kecoklatan atau ungu (Anggraeny *et al.*, 2020).

## 9. Uji Kromatografi Lapis Tipis

Uji KLT dilakukan pada ekstrak dan fraksi teraktif dengan menotolkan sampel pada plat KLT. Pengujian dilakukan dengan melarutkan setengah gram sampel dengan 10 mL etanol 70%,

kemudian tandai pada plat KLT dengan batas atas sebesar 0,5 cm dan pada batas bawah sebesar 1 cm. plat KLT dimasukkan dalam fase gerak jenuh di dalam *chamber*, lalu dikeringkan. Plat kering disemprot dengan pereaksi, kemudian keringkan pada suhu 100° selama 5-10 menit, diamati secara visual dengan sinar UV 254 nm dan 366 nm (Kemenkes RI, 2017). Identifikasi KLT flavonoid menggunakan uap amoniak dan penyemprotan sitroborat dengan baku quersetin. Hasil positif pada sinar UV 245 nm meredam sedangkan pada sinar UV 366 nm berfluoresensi berwarna biru, kuning, sampai ungu gelap. Plat menjadi kuning pudar setelah amoniak diuapkan dan disemprot dengan pereaksi sitroborat dan pemanasan pada suhu 100°C selama 5 menit, warna bercak akan menjadi kuning (Hanani, 2015). Identifikasi alkaloid pereaksi semprot menggunakan Dragendorff dengan baku piperin (Hanani, 2015). Hasil positif pada sinar UV 254 nm meredam sedangkan sinar UV 366 nm berfluoresensi berwarna biru atau kuning, setelah disemprot menjadi warna coklat atau jingga (Hanani, 2015).

## **10. Pembuatan sediaan**

**10.1. Pembuatan stok suspensi Na-CMC 0,5%.** Kontrol negatif menggunakan serbuk Na-CMC sebanyak 0,5 g dilarutkan dengan 100 mL air panas dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquadest sampai 100 mL.

**10.2. Pembuatan larutan stok kafein.** Kontrol positif menggunakan serbuk kafein dengan dosis 100 mg/kg BB. Larutan stok 50 mL. Kafein 100 mg disuspensi dalam Na-CMC 0,5% sebanyak 50 mL diaduk sampai larut dan homogen.

**10.3. Pembuatan larutan stok ekstrak herba sambiloto.** Ekstrak herba sambiloto sebanyak 1 g disuspensi dengan Na-CMC 0,5% secara bertahap hingga diperoleh campuran yang homogen. Ditambah larutan Na-CMC sampai 100 mL sehingga konsentrasinya 1%.

**10.4. Pembuatan larutan stok fraksi *n*-heksana.** Fraksi *n*-heksana ditimbang sebanyak 100 mg, kemudian disuspensikan dalam Na-CMC 0,5% secara bertahap hingga homogen dengan volume sampai 100 mL sehingga memperoleh konsentrasi 0,1%.

**10.5. Pembuatan larutan stok fraksi etil asetat.** Fraksi etil asetat ditimbang sebanyak 100 mg, kemudian disuspensikan dalam Na-CMC 0,5% secara bertahap hingga homogen dengan volume 100 mL sehingga memperoleh konsentrasi 0,1%.

**10.6. Pembuatan larutan stok fraksi air.** Fraksi air ditimbang sebanyak 1 g, kemudian disuspensikan dalam Na-CMC 0,5% secara bertahap hingga homogen dengan volume 100 mL sehingga memperoleh konsentrasi 1%.

### **11. Uji aktivitas tonikum**

Penelitian ini menggunakan mencit putih jantan (*Mus musculus*) sebagai hewan uji. Berat badan mencit berkisar antara 20-30 g dengan usia 2-3 bulan sebanyak 24 ekor. Mencit dikelompokkan dalam 6 perlakuan dengan masing-masing 4 ekor. Mencit putih jantan sebelum diberikan sediaan sebagai perlakuan akan digelantungkan pada besi 50 cm (lebar gelantungan), dipasang mendatar atau horizontal di atas permukaan meja setinggi 20 cm. Selama digelantungkan dicatat waktu berapa lama mencit dapat bertahan bergelantung. Mencit diambil dan dibiarkan beristirahat selama 30 menit, selanjutnya diberi perlakuan dengan sediaan uji yang telah dibuat secara peroral. Seluruh perlakuan diberikan secara peroral. Terdapat efek tonikum dapat dilihat dari selisih waktu gelantung sesudah dan sebelum diberi perlakuan.

Pembagian kelompok hewan uji sebagai berikut:

Kelompok I : kontrol negatif diberi Na CMC 0,5%

Kelompok II : kontrol positif diberi kafein 100 mg/kg BB

Kelompok III : perlakuan ekstrak etanol herba sambiloto dengan Dosis 74,554 mg/Kg BB

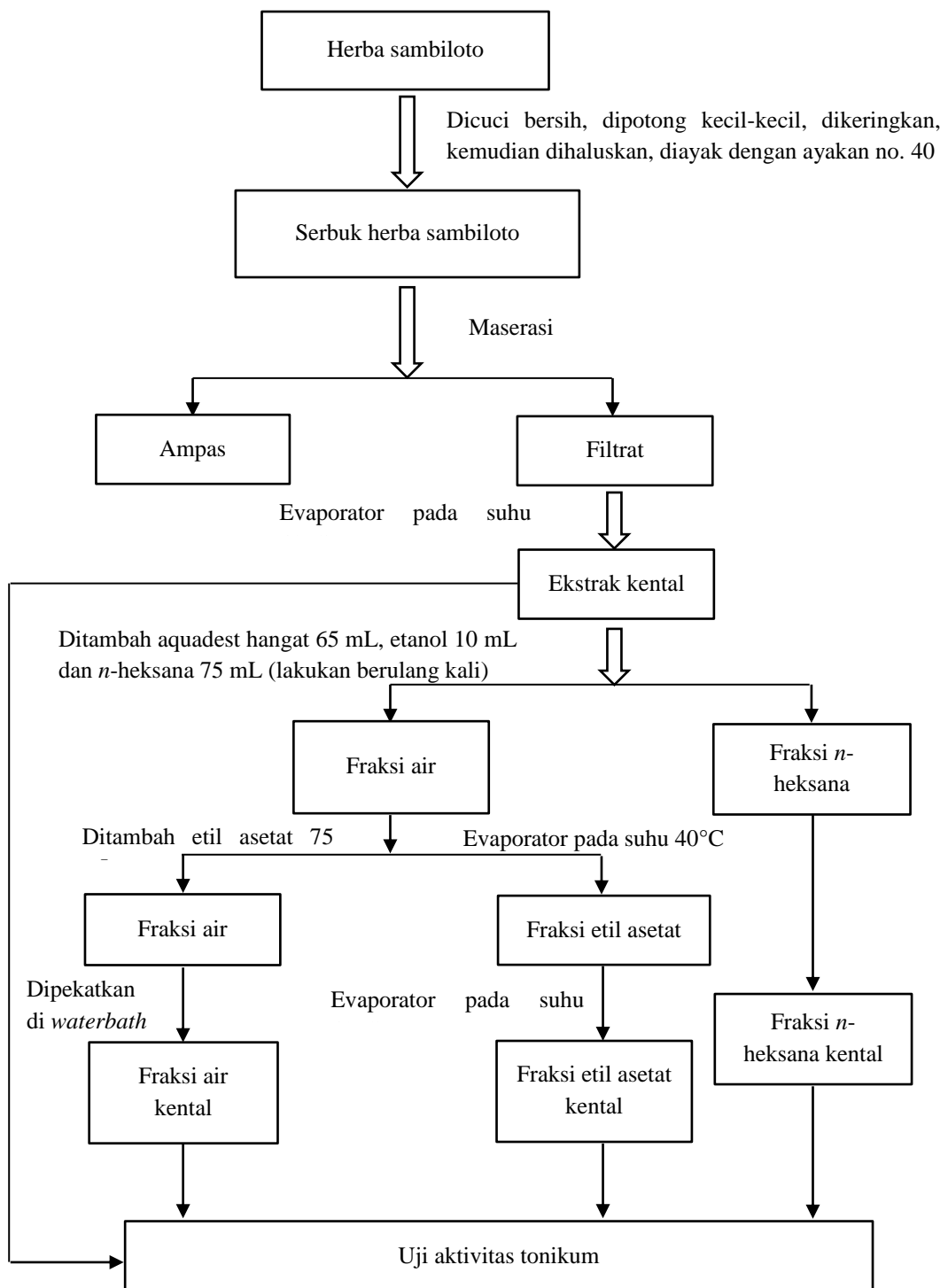
Kelompok IV : perlakuan fraksi *n*-heksana setara dengan dosis efektif

Kelompok V : perlakuan fraksi etil asetat setara dengan dosis efektif

Kelompok VI : perlakuan fraksi air setara dengan dosis efektif

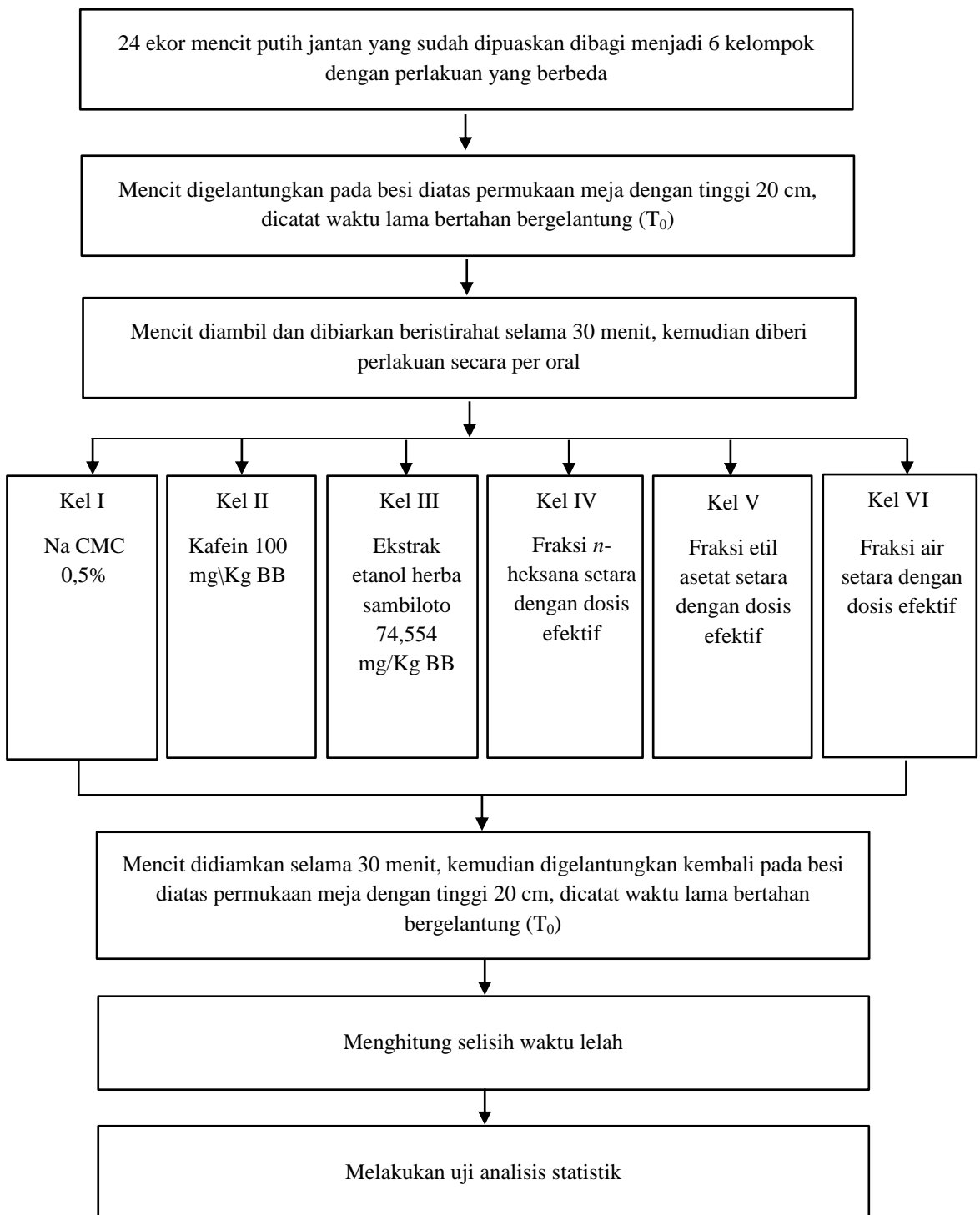
### **12. Analisa Hasil**

Analisis data yang diperoleh pada penelitian berupa data peningkatan daya tahan tubuh pada mencit putih (*Mus musculus*) jantan. Data analisis dengan menggunakan perangkat lunak SPSS. Data hasil pengukuran daya tahan tubuh dianalisis uji *Shapiro-Wilk Test* untuk mengetahui hasil data berdistribusi normal atau tidak. Data yang terdistribusi normal dilakukan uji homogenitas dengan uji *Levene Test*. Data dikatakan homogen jika  $p > 0,05$ . Data homogen dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan metode *ANOVA*. Data yang tidak terdistribusi normal ( $p < 0,05$ ) dapat dilakukan analisis non parametrik dengan menggunakan uji *Kruskal Wallis Test* (Hariyati, 2018).



**Gambar 4. Skema pembuatan ekstrak dan fraksi herba sambiloto**





**Gambar 5. Skema jalannya penelitian**