

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun selada. Populasi selada dipetik secara acak saat sudah memasuki waktu panen. dengan mengambil helaian daun yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua berwarna hijau, segar dan dalam kondisi terhindar dari penyakit atau hama pada bulan Februari 2022 dari wilayah Tawangmangu Kab. Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu ekstrak daun selada *Lactuca sativa* L. dengan variasi pemberian 32,5836 mg/kg BB, 56,1672 mg/kg BB, dan 144,2988 mg/kg BB.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi Variabel utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini adalah ekstrak daun selada yang digunakan pada penelitian.

Variabel utama kedua adalah parameter uji pada alat rotarod, meliputi jumlah jatuh, caya cengkram, pupil mata, dan reflek balik badan.

2. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah suatu Variabel yang variasinya mempengaruhi variasi lain Variabel bebas dapat dimanipulasi agar efeknya terhadap Variabel lain dapat di maipulasi dan diukur. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Infusum daun selada (*Lactuca sativa* L.) dengan variasi pemberian 32,5836 mg/kg BB, 56,1672 mg/kg BB, dan 144,2988 mg/kg BB..

3. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pertama penelitian ini adalah efek sedatif mencit yang telah diinduksi akuades, diazepam, ekstrak daun selada dengan variasi pemberian 32,5836 mg/kg BB, 56,1672 mg/kg BB, dan 144,2988 mg/kg BB.

Variabel tergantung kedua penelitian ini adalah selisih waktu jatuh pada mencit yang diuji pada alat rotarod, waktu yang digunakan pada penelitian ini adalah menit ke-15, 30, 60, dan 120.

4. Variabel Terkendali

- a. Pertama, daun selada adalah daun dari daun selada yang dipetik pada bulan Februari 2022 dari Tawangmangu, Karanganyar dipetik pada pagi hari, tidak busuk, tidak terlalu muda, tidak terlalu tua dan tidak terkena hama.
- b. Kedua, ekstrak daun selada adalah serbuk daun selada dengan etanol 96% selama 24 jam dalam bejana diekstraksi secara maserasi, kemudian disaring untuk memisahkan maserat, filtrat dipisahkan dengan *rotary evaporator* hingga kental.
- c. Ketiga, mencit putih *Mus musculus* adalah hewan uji yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.
- d. Keempat, ekstrak daun selada (32,5836 mg/kg BB) adalah dosis uji pengaruh daun selada terhadap efek sedatif pada mencit putih.
- e. Kelima, ekstrak daun selada (56,1672 mg/kg BB) adalah dosis uji pengaruh daun selada terhadap efek sedatif pada mencit putih.
- f. Keenam, ekstrak daun selada (144,2988 mg/kg BB) adalah dosis uji pengaruh daun selada terhadap efek sedatif pada mencit putih.
- g. Ketujuh, jumlah putaran adalah jumlah pengamatan putaran rotarod pada menit 15, 30, 60, dan 120 menit setelah mencit diinduksi ekstrak daun selada.
- h. Kedelapan, uji efek sedatif dengan metode *Analysis of Variance* (ANOVA) adalah Untuk mengetahui konsentrasi ekstrak daun selada yang efektif untuk memberikan efek sedatif dengan menggunakan alat uji rotarod.

C. Alat dan bahan

1. Alat

Alat yang dipakai dalam penelitian ini meliputi botol maserasi, timbangan analitik, *rotary evaporator*, corong (pyrex), gelas ukur (pyrex), kertas saring, kain flanel, batang pengaduk (Iwaki), aluminium foil, beakerglass (pyrex), labu takar (pyrex), tabung reaksi (Iwaki), autoklaf, pipet ukur, rak tabung reaksi, blender, ayakan no. 60, oven, timbangan miligram, spuit oral, *Sterling Bidwell*, *Moisture balance*, rotarod, *vacum rotary evaporator*, kandang mencit .

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun selada, etanol 96%, H₂SO₄ pekat, HCl 2 N, H₂SO₄ pekat, prereaksi Mayer, preaksi sitroborat, pereaksi Lieberman Burchard, serbuk Mg, FeCl₃ 1%, H₂O₂, DMSO, toluen., CMC, mencit putih.

D. Jalannya penelitian

1. Determinasi daun

Determinasi daun dengan cara melakukan determinasi pada daun selada. Determinasi daun merupakan proses dalam menentukan kebenaran sampel daun selada. Tujuan dari determinasi adalah menentukan kebenaran ciri-ciri morfologi dari suatu daun. Determinasi daun dilakukan di Laboratorium Sistematika Universitas Setia Budi Surakarta

2. Penyiapan simplisia

Daun selada yang segar dikumpulkan dan disortir, kemudian dicuci sampai bersih menggunakan air lalu ditiriskan dan ditimbang. Daun yang telah ditimbang lalu di oven pada suhu 40°C untuk dikeringkan. Daun yang sudah kering selanjutnya diayak dan diserbuk dengan ayakan no. 60 (Depkes RI, 2009).

3. Pembuatan larutan CMC Na

CMC Na 1% dan CMC Na 2% digunakan sebagai kontrol negatif. Larutan CMC Na 1% dan CMC Na 2% dibuat dengan cara menimbang serbuk CMC Na sebanyak 1000 mg dan 2000 mg, masing-masing ditempatkan dalam cawan penguap, tambahkan sedikit akuades ke dalamnya. CMC perlahan-lahan akan mengembang, setelah mencapai tahap yang diinginkan masukkan CMC yang telah mengembang masukan ke dalam mortir secara bertahap, aduk sampai homogen. CMC Na 1% dan CMC Na 2% yang telah tercampur dengan baik dipindahkan ke dalam wadah dan tambahkan air hingga volume 100 ml, aduk sampai homogen (Anggitasari, 2020).

4. Penentuan konversi tablet diazepam

Diazepam yang digunakan pada penelitian adalah tablet diazepam 15 mg. penelitian Yulianita *et al.*, (2019) menyebutkan bahwa dosis dewasa tablet diazepam adalah 2-10 mg sehari. Dosis yang digunakan pada penelitian adalah dosis pertengahan, yaitu 5 mg. Dosis tablet diazepam yang digunakan adalah 0,013 mg/20gBB mencit, hasil

ini didapatkan dari hasil konversi dosis manusia seberat 70 kg ke mencit seberat 20 mg.

5. Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak pada penelitian ini menggunakan metode maserasi. Serbuk daun selada masing-masing dituang ke dalam botol gelap yang berbeda dan diisi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan (1:10), lalu direndam selama 6 jam pertama sembari diaduk berkali-kali, kemudian diamkan selama 18 jam. Maserat dipisahkan dengan cara penyaringan. Ulangi prosedur ekstraksi dengan pelarut yang sama dan jumlah pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama, lakukan maserasi secara triplo. Maserat yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan di rotary evaporator pada temperatur 65°C (Courtney A, 2012).

5.1 Penentuan dosis. Pemberian oral ekstrak selada (*Lactuca sativa* L.) sebanyak 300 mg kg/BB pada tikus putih *Rattus novvergincus* dapat emberikan efek sedatif yang baik (Widyaningrum *et al.*, 2018). Dosis acuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 300 mg kg/BB tikus, lalu dosis tikus kemudian dikonversi, didapatkan hasil 56,1672 mg/kg BB. Dosis ekstrak selada yang digunakan dalam penelitian menggunakan dosis bertingkat yaitu:

$$\text{Dosis 1} : \frac{1}{2} \times 56,1672 \text{ mg/kg BB} = 28,0836 \text{ mg/kg BB}$$

$$\text{Dosis 2} : 1 \times 56,1672 \text{ mg/kg BB} = 56,1672 \text{ mg/kg BB}$$

$$\text{Dosis 3} : 2 \times 56,1672 \text{ mg/kg BB} = 112,3344 \text{ mg/kg BB}$$

6. Pemeriksaan karakteristik serbuk simplisia

6.1 Susut pengeringan. Penetapan susut pengeringan dengan alat Moisture Balance dengan replikasi 3x. Timbang 2 gram serbuk daun selada, kemudian masukkan ke dalam alat Moisture Balance. Apabila alat tersebut berbunyi dengan ditandai bunyi tertentu disebabkan pengoperasian alat telah selesai, lalu hasil susut pengeringan dilakukan pencatatan (Hidayati *et al.*, 2018).

6.2 Kadar air serbuk. Pengujian kadar air serbuk selada dalam penelitian ini menggunakan alat destilasi Sterling-Bidwell. Serbuk simplisia masing-masing sejumlah 20 gram dituang ke dalam labu destilasi dan dimasukkan toluena sebanyak 200 ml yang sudah dijenuhkan dengan air 10 ml atau hingga seluruh bahan tergenang, lalu merangkai alat destilasi Sterling bidwell disertai kondensor dan dipanaskan sampai sudah tidak terdapat air yang menetes dalam tabung

berskala. Volume air yang dihasilkan pada skala yang ada di alat ditetapkan dalam satuan persen sebagai kadar air serbuk (Courtney A, 2012).

6.3 Kadar air ekstrak. Pengujian kadar air ekstrak selada dalam penelitian ini menggunakan krus. Ditimbang sebanyak 10 gram ekstrak dalam krus porselen bertutup secara saksama. Ekstrak diratakan, kemudian dikeringkan dengan tutup krus terbuka pada suhu 105 °C selama 5 jam. Ekstrak dikeluarkan dan didinginkan di dalam desikator, selanjutnya ditimbang kembali. Pengeringan diulangi sampai tiga kali pengulangan pada selang waktu 1 jam hingga tercapai bobot yang konstan. Perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Rahmawati *et al.*, 2022)

7. Pengujian ekstrak bebas etanol

Pengujian keberadaan etanol dapat dilakukan dengan metode berikut: Sampel ditempatkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan asam asetat dan asam sulfat pekat. Mixture tersebut kemudian dipanaskan. Jika tidak tercium bau ester, hasil pengujian dianggap negatif, artinya tidak terdeteksi keberadaan etanol. Sampel yang akan diuji dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan kemudian ditambahkan dengan asam asetat dan asam sulfat pekat. Proses pemanasan kemudian dilakukan untuk mengkatalisis reaksi yang terjadi antara etanol dengan asam asetat, menghasilkan ester. Apabila etanol hadir dalam sampel, reaksi ini akan menghasilkan bau ester yang khas. Namun, jika tidak tercium bau ester, hal ini menunjukkan bahwa etanol tidak hadir dalam sampel, dan hasil pengujian dianggap negatif untuk keberadaan etanol. (Hidayati *et al.*, 2018).

8. Identifikasi kandungan kimia

Serbuk dan ekstrak dari daun selada dilakukan identifikasi kandungan kimia dengan metode tabung reaksi.

8.1 Alkaloid. Lactucin dan triptofan termasuk kedalam golongan alkaloid. Lactucin dan triptofan memiliki efek *antiinsomnia*, *antianxiety*, dan *sedatife* (Duke, 2001). Sampel dimasukan kedalam tabung reaksi, tambahkan 1 ml HCL 2N dan 9 ml air. Sampel dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit kemudian didinginkan dan disaring. Sampel dibagi menjadi 2, yaitu A dan B masing-masing ditempatkan pada tabung reaksi. Tabung A ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat LP, sampel positif alkaloid akan terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam. Tabung B ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer LP, sampel

positif alkaloid akan terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning yang larut dalam methanol pekat (Depkes, 2000).

8.2 Flavonoid. Mengidentifikasi keberadaan flavonoid, dapat dilakukan langkah-langkah berikut, Ekstrak ditambah air panas kemudian dididihkan selama 15 menit dan disaring untuk serbuk, tambahkan serbuk Mg, larutan alkohol asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol, selanjutnya dicampur dan dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah, reaksi positif ditunjukkan adanya warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes, 2000).

8.3 Saponin. Sampel dimasukkan dalam tabung reaksi tambahkan 10 mL air panas, dinginkan lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Saponin menunjukkan hasil positif jika terbentuk buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm, kemudian pada penambahan 1 tetes HCl 2 N, buih tidak hilang (Depkes, 2013).

8.4 Tanin. Identifikasi tanin dengan sampel sebanyak 4 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan larutan FeCl₃ dengan konsentrasi 1%, jika dalam proses ini terbentuk warna hijau kehitaman, hal ini menunjukkan hasil positif untuk keberadaan tanin dalam sampel. Reaksi antara tanin dengan FeCl₃ menghasilkan kompleks berwarna hijau kehitaman. Perubahan warna ini merupakan indikasi adanya tanin dalam sampel yang diuji, jika tidak terbentuk perubahan warna atau tidak ada warna hijau kehitaman yang terlihat, hal ini menunjukkan hasil negatif dan mengindikasikan ketiadaan tanin dalam sampel yang diuji. (Hidayati *et al.*, 2018).

9. Persiapan Hewan Percobaan

Mencit yang digunakan adalah mencit putih jantan yang sehat sebanyak 25 ekor. Mencit diaklimatisasi dirotarod selama 1 minggu (Sutrisna *et al.*, 2015). Mencit ditempatkan didalam kandang dengan alas berupa sekam dan ditutup dengan anyaman kawat diatasnya, ukuran kandang sebesar 30 cm x 40 cm, masing-masing kandang terdiri dari 5 ekor mencit (Kim *et al.*, 2017).

9.1 Pengelompokan hewan uji. 25 ekor mencit putih jantan dibagi menjadi 5 kelompok kecil, masing-masing kelompok berisi 5 ekor mencit, kelompok mencit adalah sebagai berikut:

- a. Kelompok I, adalah kelompok kontrol negatif hanya diberikan suspensi CMC Na 0,5%.
- b. Kelompok II, adalah kelompok positif, mencit diinduksi dengan diazepam 5 mg/70 kg BB manusia

- c. Kelompok III, adalah kelompok uji yang diinduksi ekstrak selada 32,5836 mg/kg BB.
- d. Kelompok IV, adalah kelompok uji yang diinduksi ekstrak selada 56,1672 mg/kg BB.
- e. Kelompok V, adalah kelompok uji yang diinduksi ekstrak selada 144,2988 mg/kg BB..

10. Pengujian efek sedatif ekstrak daun selada

Pengujian sedatif menggunakan alat uji rotarod. Mencit putih diletakkan di *rotor drum* pada alat rotarod, *rotor drum* adalah batang silinder yang berputar, besarnya putaran tercatat pada alat rotarod, putaran rotarod dimulai dari 4 RPM, kemudian semakin lama akan berputar dengan kecepatan maksimal 40 RPM. Onset waktu yang digunakan adalah menit 15, 30, 60, dan 120 menit. Parameter yang diuji pada penelitian adalah jumlah jatuh, daya cengkram, pupil mata, dan reflek balik badan (Djalil *et al.*, 2017).

10.1 Perlakuan mencit pada uji sedatif dialat rotarod.

Mencit dipuasakan \pm 18 jam, sebelum pengujian air minum tetap diberikan, setelah dipuasakan mencit kemudian ditimbang untuk penentuan dosis (Sutrisna *et al.*, 2015). Mencit diadaptasi selama 5 menit sebelum pemberian sampel, kemudian mencit diberi sampel, taruh mencit pada *rotor drum* dialat rotarod. Onset waktu yang digunakan adalah menit 15, 30, 60, dan 120. Mencit harus diadaptasi dahulu pada rotarod selama 2 menit sebelum memulai onset waktu menit 15, 30, 60, dan 120. Setelah pengujian pada tiap onset waktu menit 15, 30, 60, dan 120 mencit diistirahatkan selama 30 menit, untuk menghindari terjadinya kelelahan. Kelelahan pada mencit dapat mempengaruhi hasil penelitian (Sheila, 2022).

10.2 Uji jumlah jatuh. Mencit diletakan pada *rotor drum* dialat rotarod, mencit yang kelelahan akan jatuh diatas *Counter Time and Trip Plate*, ini adalah adalah pelat yang berfungsi sebagai tempat jatuhnya mencit, pelat ini akan menghitung waktu yang ditempuh mencit selama penelitian. Waktu jatuh mencit akan ditampilkan secara otomatis pada layar dialat rotarod. Hewan uji yang normal akan memiliki jumlah jatuh yang lebih sedikit dibanding dengan hewan uji abnormal. (Djalil *et al.*, 2017).

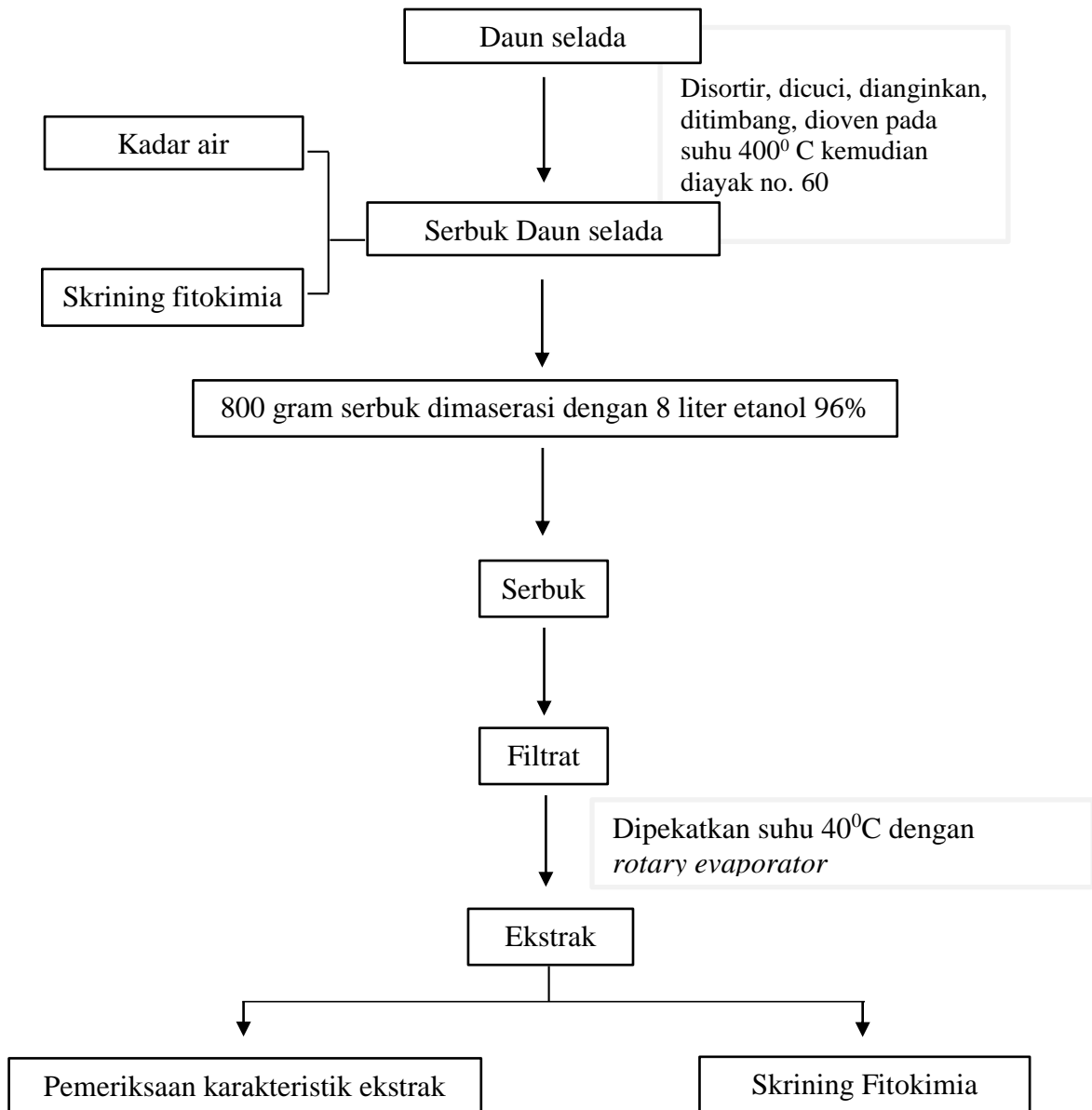
10.3 Uji cengkraman. Mencit yang berlari di *rotor drum* diamati cengkraman kakinya. Mencit normal akan mencengkram *rotor drum*, ini menandakan bahwa mencit memiliki kodinasi motorik yang

normal, agar tetap mempertahankan posisinya di *rotor drum* untuk tidak terjatuh (Djalil *et al.*, 2017).

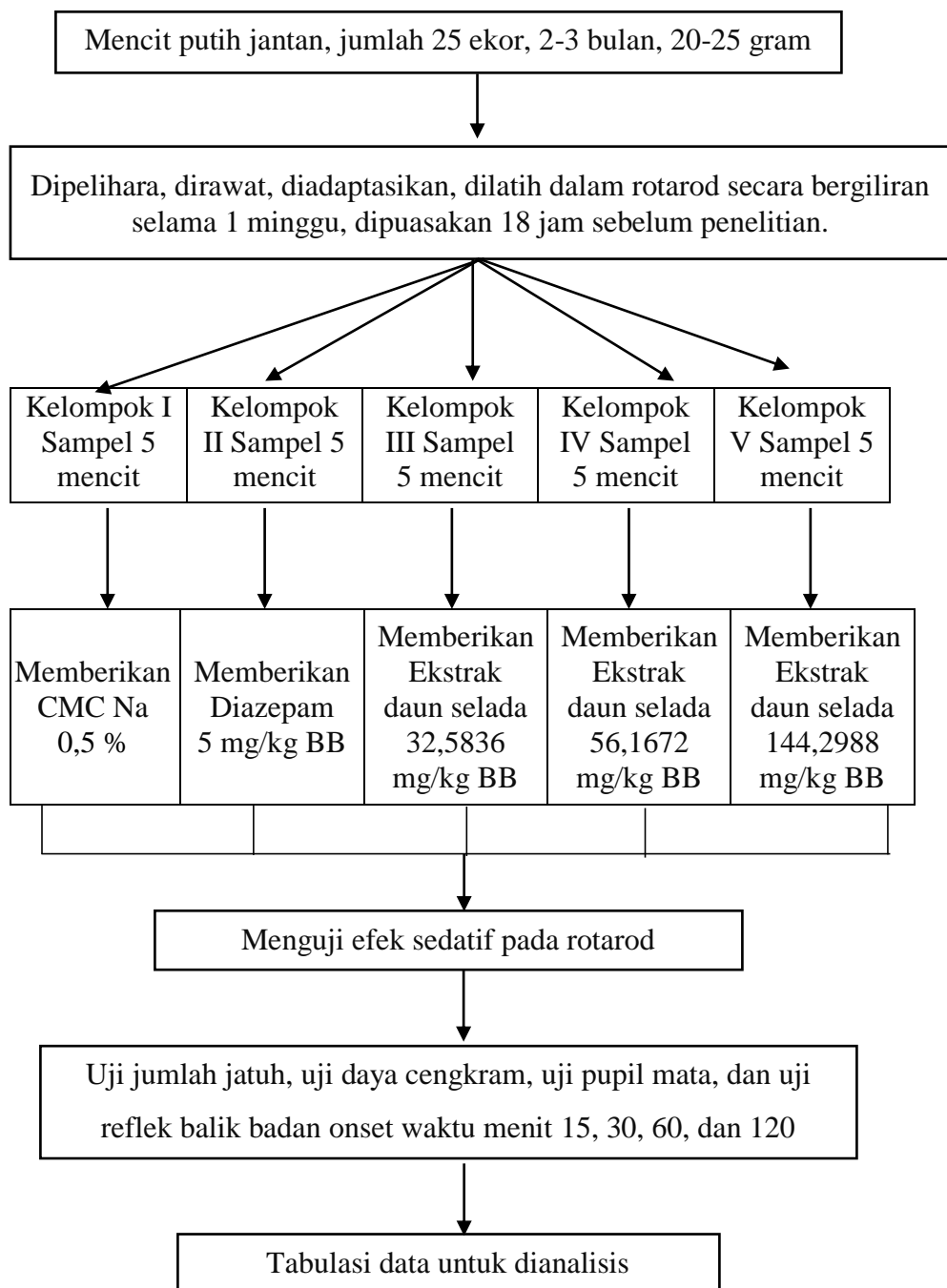
10.4 Uji pupil mata. Mencit diperiksa pupil matanya pada tiap onset waktu menit 15, 30, 60, dan 120. Pupil diukur menggunakan penggaris, pupil mata tetap berukuran 0,2cm, pupil mata sedikit, miosis berukuran 0,1cm, dan pupil mata miosis berukuran kurang dari 0,1cm (Djalil *et al.*, 2017).

10.5 Uji reflek balik badan. Mencit diuji reflek balik badan tiap onset waktu menit 15, 30, 60, dan 120. Reflek balik badan diukur menggunakan *stopwach*. Mencit normal memiliki reflek balik badan yang cepat dibanding mencit abnormal (Djalil *et al.*, 2017).

E. Skema jalannya penelitian



Gambar 4. Skema perlakuan daun selada



Gambar 5. Skema jalannya penelitian

F. Analisis data

Data yang sudah didapatkan kemudian diidentifikasi dan dianalisis secara deskriptif untuk mengamati perbedaan variasi dosis ekstrak selada. Konsentrasi infusum daun selada (*Lactuca sativa* L.) yang efektif dalam mempengaruhi efek aktivitas motorik pada mencit digunakan uji *Analysis of Variance* (Anova) (Kim *et al*, 2017). Variasi dosis ekstrak selada yang digunakan dalam penelitian yaitu 32,5836 mg/kg BB, 56,1672 mg/kg BB, dan 144,2988 mg/kg BB