

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

Populasi adalah semua objek untuk dijadikan tujuan penelitian. Populasi yang dipakai pada penelitian ini yaitu daun sawo manila, yang di peroleh yang diperoleh dari daerah Rejotangan, Tulungagung, Jawa Timur. Sampel yang dipilih adalah daun sawo manila yang masih segar, warna hijau dan tidak cacat.

Sampel adalah suatu bagian kecil dari populasi yang diambil untuk penelitian. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sawo manila, bagian yang diambil yaitu daun, kemudian dibersihkan dan dikeringkan.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama penelitian yang pertama adalah ekstrak etanol 96% dilanjutkan dengan fraksi n-heksana, etil asetat, dan air dari daun sawo manila. Variabel utama penelitian bagian kedua adalah aktivitas tonikum ekstrak dan fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun sawo manila terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus*) dengan metode rotaroad.

2. Klasifikasi variabel utama

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

Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi dosis ekstrak daun sawo manila. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah efek tonikum ekstrak etanol daun sawo manila dan fraksinasi n-heksana, etil asetat, air dari terhadap mencit putih jantan, yang mencakup selisih waktu lelah mencit putih jantan (*Mus musculus*) sebelum perlakuan dengan waktu lelah setelah perlakuan.

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 daun sawo manila terhadap mencit jantan putih (*Mus musculus*) yang meliputi waktu mencit bertahan lama di atas batang rotarod sebelum perlakuan dan setelah perlakuan.

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

3. Definisi operasional variabel utama.

Pertama, sampel daun sawo manila adalah daun yang diambil dari tanaman sawo manila (*Manikara zapota L.*) dalam kondisi yang masih segar, warna hijau tua, dan tidak cacat. Diperoleh dari daerah Rejotangan, Tulungagung, Jawa Timur.

Kedua, serbuk daun sawo manila 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 *Manikara zapota L.* adalah hasil ekstraksi serbuk daun sawo manila dengan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah fraksi dari ekstrak daun sawo manila yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana sebagai pelarut non polar.

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

Keenam, fraksi air adalah residu fraksi etil asetat dari ekstrak daun sawo manila diuapkan menggunakan waterbath.

Ketujuh, uji aktivitas tonikum adalah pengujian yang menggunakan metode rotaroad, dengan melihat waktu ketahanan mencit yang memiliki berat berkisar antara 20-30 gram, yang tidak jatuh selama di atas rotaroad yang berputar.

Kedelapan, fraksis *n*-heksan, etil asetat dan air yang paling efektif memberikan aktivitas tonikum sebanding dengan kontrol positif.

Durasi ketahanan mencit yang tidak jatuh untuk menentukan fraksinasi ekstraksi teraktif terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus*), dengan kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah kafein karena merupakan senyawa yang poten memberikan efek tonikum.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini berupa timbangan, blender, timbangan analitik, bejana maserasi, batang pengaduk kaca, oven, *rotary evaporator*, beaker, tabung reaksi, labu erlenmeyer, gelas ukur, penangas air, gelas krusibel, cawan penguap, *Stealing-bidwell*, kertas perkamen, kertas saring, corong kaca, spuit injeksi dengan jarum oral (ujung tumpul), alat rotarod dan pengayak no 40, corong pisah, kandang mencit, rak tabung reaksi, *moisture balance*, kain fanel.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini berupa daun sawo manila diperoleh dari daerah daerah Rejotangan, Tulungagung, Jawa Timur. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%, *n*-heksan, aquadest, etil asetat, kontrol negative menggunakan Na CMC 1 % yang akan dibentuk mucilago, kontrol positif menggunakan kafein, reage mencit putih jantan (*Mus musculus*), sehat, berat badan \pm 20 g, umur 2-3 bulan yang didapat dari Laboratorium Universitas Setia Budi., kafein, FeCl₃, asam klorida 2N, air suling, pereaksi meyer, reagen burchardat, reagen dragendorff, etil asetat, serbuk magnesium, asam sulfat pekat, pereaksi liberman burchard, FeCl₃ 1%.

D. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan *ethical clearance*

Pembuatan ethical clearance dilakukan di RSUD Dr. Moewardi, Surakarta. Hal pertama yang dilakukan yaitu mengisi formulir pendaftaran online. Mendatangi kontor forensic. Medicolegal RSUD Dr. Moewardi dengan menyerahkan bukti pendaftaran dan form yang telah diisi secara online, serta membawa proposal yang telah ditandatangani pembimbing.

Pembayaran EC akan diproses terlebih dahulu maksimal selama 14 hari, pengambilan EC harus dilakukan secara mandiri disertai bukti pengajuan yang telah ditandatangani oleh petugas.

2. Determinasi tanaman sawo manila

Tahapan pertama dalam penelitian ini adalah mengidentifikasi tanaman sawo manila untuk memastikan keakuratan morfologi tanaman dalam literatur. Identifikasi buah dilakukan di UPT-Laboratorium Universitas Setia Budi, Mojosongo, Jawa Tengah.

3. Pengumpulan bahan dan pengeringan bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sawo manila sebanyak 4235gr lebih yang dapat diperoleh dari Rejotangan, Tulungagung, Jawa Timur. Daun sawo manila yang telah dikumpulkan dicuci dengan air untuk menghilangkan kotoran yang melekat pada simplisia, seperti kotoran, debu, dan pengotor lainnya yang menempel pada simplisia. Daun yang telah dicuci kemudian dirajang di bawah panas sinar matahari sampai kering selama kurang lebih 3-5 hari.

4. Pembuatan serbuk

Daun sawo manila yang sudah kering digiling di penggiling bubuk kemudian didapatkan bubuk simplisia lalu diayak serbuk daun sawo manila dengan ukuran mesh 40, timbang dan simpan dalam wadah kering untuk mengetahui berat akhir simplisia.

5. Pengujian susut pengeringan

Uji susut pengeringan dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance* Prosedurnya adalah memasukkan bubuk seberat 2 gram ke dalam *moisture balance* pada suhu 105°C dan menunggu perangkat berbunyi. Hasil susut pengeringan tidak boleh melebihi 10%.

6. Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi karena metode maserasi merupakan metode yang murah, sederhana, dan mudah untuk dilakukan.

Merasasi dilakukan dengan merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari yang cocok. Ekstrak etanol daun sawo manila yang diharapkan merupakan ekstrak kental. Ditimbang serbuk simplisia 500 gram, dimasukkan ke dalam bejana. Selanjutnya, ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 5 liter. Wadah bejana tersebut kemudian ditutup, dan dilakukan maserasi selama 2-3 jam sambil digojok. Ekstrak yang telah diekstraksi, kemudian didiamkan selama 24 jam. Hasil maserasi kemudian disaring sampai didapatkan filtrat. Filtrat yang terdapat kemudian disaring kembali dengan menggunakan kertas saring. Selanjutnya, kembali dimerasasi kembali sampai warna tampak lebih pucat. Filtrat yang didapatkan kemudian diuapkan pelarutnya dengan menggunakan evaporator sampai didapatkan ekstrak kental (*Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000*). Seluruh proses ekstraksi dilakukan pada suhu ruang 20 – 25 °C.

7. Pengujian kadar air

Penetapan kadar air dalam ekstrak dilakukan menggunakan metode destilasi dengan pelarut toluena. Sebelum digunakan, toluena terlebih dahulu dijenuhkan dengan air untuk memastikan efektivitas proses ekstraksi uap air dari sampel. Sebanyak 20 gram ekstrak ditimbang, lalu dimasukkan ke dalam labu destilasi bersama 200 ml toluena yang telah dijenuhkan. Selanjutnya, campuran tersebut dipanaskan hingga air yang terkandung dalam ekstrak menguap dan terbawa bersama uap toluena. Uap tersebut kemudian diarahkan menuju kondensor, di mana terjadi proses pendinginan sehingga uap berubah kembali menjadi cairan. Cairan hasil kondensasi ini akan terpisah, dan air yang terkumpul ditampung di dalam tabung penampung khusus. Volume air yang diperoleh dari proses ini diukur secara cermat, lalu digunakan untuk menghitung kadar air dalam ekstrak dengan cara membandingkan volume air yang diperoleh dengan bobot awal ekstrak yang digunakan (Sarker & Nahar, 2012).

8. Pembuatan fraksi ekstrak sawo manila

Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan senyawa berdasarkan kepolaran dengan menggunakan metode ekstraksi cair-cair dilakukan dengan cara ditimbang 10 g ekstrak daun sawo manila dilarutkan dengan etanol 96% 10mL kemudian dicampur dengan aquadest sebanyak 65 mL dan *n*-heksan 75mL di corong pisah.

n-heksan sebagai pelarut non-polar akan menarik senyawa non-polar seperti steroid dan lemak ke fase atas, sementara senyawa polar tertinggal di fase air. Selanjutnya, fraksi air ditambahkan etil asetat sebanyak 75mL yang bersifat semi-polar untuk mengekstraksi senyawa seperti flavonoid, alkaloid dan senyawa lainnya ke fase atas (Hamidi et al., 2014). Masing-masing fraksi kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator untuk menghilangkan sisa pelarut dan menghasilkan residu kental yang siap digunakan dalam uji aktivitas tonikum (Pratiwi et al., 2016).

Rendemen fraksi dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut :

$$\text{Rendeman (\% b/b)} = \frac{\text{Berat Fraksi}}{\text{berat Ekstrak daun sawo manila}} \times 100\%$$

9. Identifikasi kandungan daun sawo manila

9.1 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 menjadi merah bata, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Romana *et al.*, 2015).

9.2 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).

9.3 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).

9.4 Tanin. Sampel ditimbang 0,5 g, ditambahkan 3 tetes FeCl₃. Terbentuknya endapan biru-hitam, hijau kehitaman atau biru-hijau menunjukkan adanya tanin (Indriyana, 2020).

9.5 Steroid. Sampel setengah gram ditambahkan pereaksi Liebermann Burchard yang terbuat dengan asam asetat glasial, kloroform, dan HCl pekat. Adanya steroid ditandai perubahan warna hijau kebiruan, mengindikasikan keberadaan steroid (Islam *et al.*, 2011)

10. Pembuatan Larutan Stok

10.1 Na-CMC 1%. Kontrol negative menggunakan serbuk Na-CMC 1% sebanyak 1gram dilarutkan ke dalam 50 mL akuades yang sudah dipanaskan secara perlahan sambil diaduk kemudian larutan menggunakan pengaduk dengan kecepatan sedang hingga Na-CMC mulai mengembang dan membentuk mucilago. Tambahkan akuades hingga volume mencapai 100 mL dalam mortir sambil terus diaduk perlahan. Diamkan larutan selama 24 jam untuk memastikan kelarutan sempurna dan pembentukan mucilago yang stabil (Widyaningsih & Nugroho, 2018).

10.2 Kafein. Kafein digunakan sebagai kontrol positif. Pada penelitian Mafitri dan Parmadi (2018), dosis kafein yang dapat diberikan untuk mencit sebesar 0,00052mg/kg BB mencit. Konsentrasi larutan kafein sebesar 0,52 mg/0,52 ml. Pembuatan larutan dilakukan dengan disuspensikan 100 mg serbuk kafein ke dalam larutan CMC Na hingga 100 ml, lalu diaduk ad homogen.

10.3 Larutan ekstrak. Larutan ekstrak etanol daun sawo manila dibuat dengan konsentrasi larutan ekstrak sebesar 18mg/0,18ml. Pembuatan larutan ekstrak dilakukan dengan disuspensikan 10gr ekstrak daun sawo manila ke dalam larutan CMC Na hingga 100 ml.

10.4 Larutan fraksi etil-asetat. Fraksi etil asetat dengan konsentrasi 3,6mg/0,36ml, ditimbang sebanyak 1gram, kemudian disuspensikan dalam Na. CMC secara bertahap hingga homogen dengan volume 100 mL .

10.5 Larutan fraksi *n*-heksana. Fraksi *n*-heksana dengan konsentrasi 5,4mg/0,54ml dengan ditimbang sebanyak 1gram, kemudian disuspensikan dalam Na-CMC secara bertahap hingga homogen dengan volume sampai 100 mL.

10.6 Pembuatan larutan fraksi air. Fraksi air dengan konsentrasi 7,2mg/0,72ml menimbang sebanyak 1gram kemudian disuspensikan dalam Na-CMC secara bertahap hingga homogen dengan volume 100 mL.

11. Prosedur pengujian

Hewan uji yang digunakan berupa mencit putih jantan dengan berat badan 20-30 gram sebanyak 30 ekor. Hewan uji kemudian dibagi menjadi 6 kelompok, setiap kelompok masing-masing terdiri atas 5 ekor mencit jantan.

Pembagian kelompok perlakuan untuk penguran yaitu sebagai berikut:

Kelompok I : CMC Na 1% sebagai kontrol negatif

Kelompok II : Kafein 0,00052mg/kg BB mencit sebagai kontrol positif.

Kelompok III : Ekstrak etanol daun sawo manila 0,018mg/kg BB mencit

Kelompok IV : Fraksi etil asetat 0,0036mg/kg BB mencit.

Kelompok V : Fraksi *n*-heksana 0,0054mg/kg BB mencit.

Kelompok VI : Fraksi air 0,0072mg/kg BB mencit.

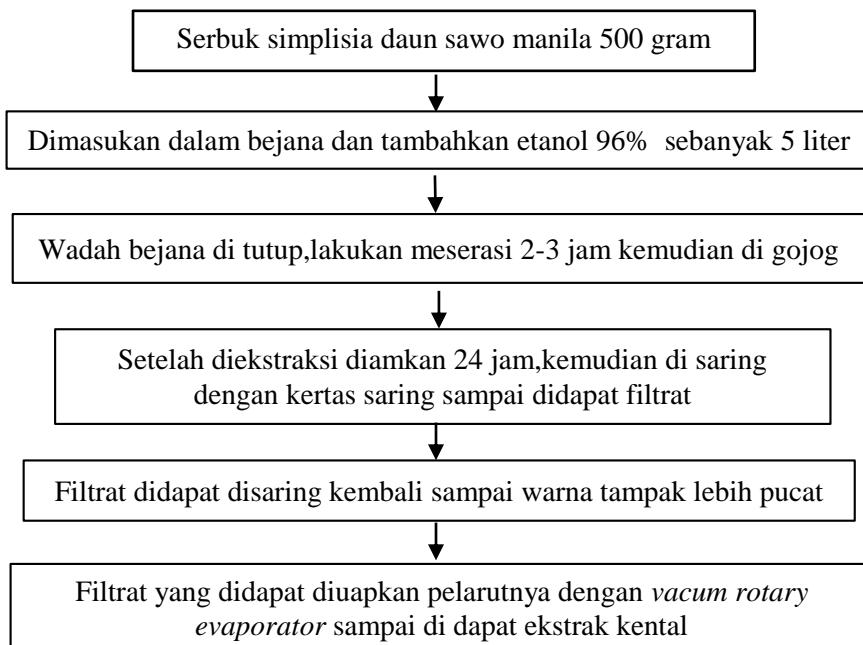
Masing-masing mencit diadaptasikan selama 7 hari, kemudian mencit dipuasakan 1 hari (tetap diberi minum), setelah itu mencit ditaruh di atas alat *rotaroad* selama 5 menit untuk dicatat T0 sebelum perlakuan dan T1 sesudah perlakuan diberikan secara oral pada hewan uji hari pertama,T2 hari kedua berikutnya sampai T3 untuk ketiga hari diberikan larutan uji sesuai dengan dosis yang disiapkan. Setelah semua kelompok hewan uji 30 ekor sudah diberikan larutan secara oral, mencit di diamkan kurang lebih 30 menit, agar larutan yang diberikan mulai diabsorbsi oleh tubuh dan mulai berefek pada hewan uji. Setelah itu hewan uji dinaikan

di atas batang rotarod dengan menempatkan mencit secara horizontal pada balok silinder dan memutarnya kecepatan konstan untuk menghitung seberapa lama mencit dapat bertahan dalam balok silinder Sugiarso (1993).

E. Analisis Data

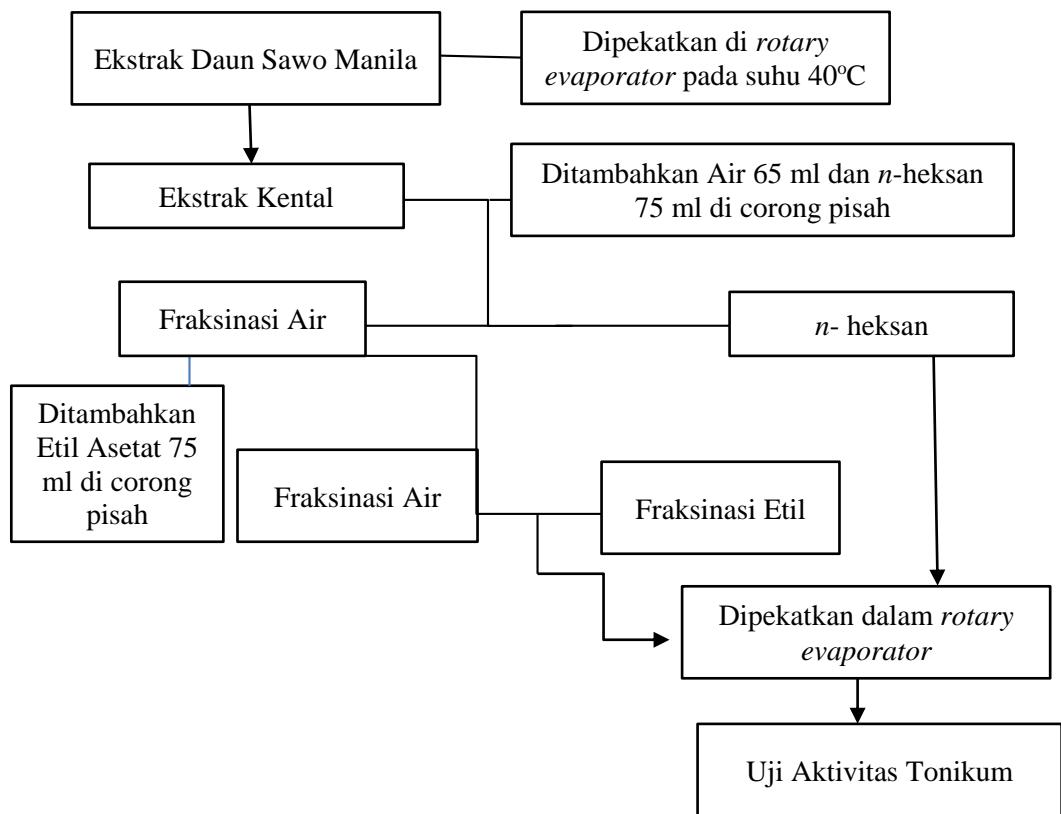
Data yang dikumpulkan untuk uji aktivitas tonikum daun sawo manila dengan menggunakan parameter yaitu waktu bertahan mencit di atas batang rotarod yang mana di hitung dari T0 sebelum perlakuan dan T1 sesudah perlakuan hari pertama diberikan larutan uji sampai T3 hari ketiga perlakuan. Hasil yang diperoleh di analisis menggunakan uji *One Way Anova*. Analisis data yang diperoleh pada penelitian berupa data hasil pengukuran pada mencit putih (*Mus musculus*) jantan. Data analisis dengan menggunakan parangkat lunak SPSS. Data hasil pengukuran T0 dan T1 sampai T3 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* dan dilanjutkan pada uji *Tukey*.

1. Alur Pembuatan Ekstrak



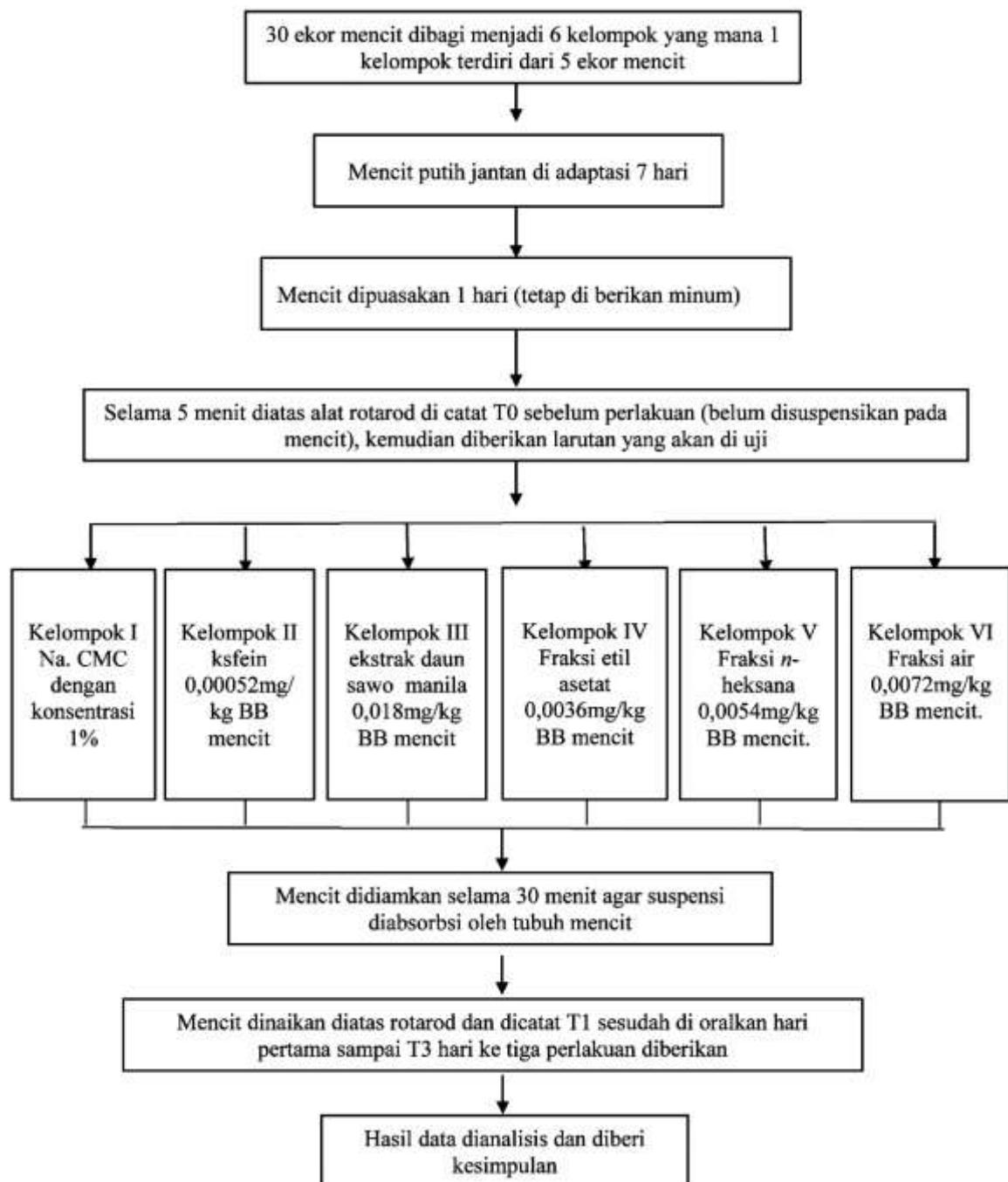
Gambar 2. Alur pembuatan ekstrak

2. Alur Pembuatan Fraksinasi



Gambar 3. Alur pembuatan fraksinasi

3. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur penelitian