

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun dari daun kangkung air (*Ipomoea aquatica*) yang diperoleh dari daerah Waduk Cengklik, Boyolali. Sampel yang dipilih yaitu daun dari tanaman kangkung air yang masih segar, warna hijau tua, dan dipisahkan daun yang rusak kemudian keringkan menjadi simplisia.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama penelitian yang pertama adalah ekstrak etanol 96% dilanjutkan dengan fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak daun kangkung air. Variabel utama penelitian yang kedua adalah aktivitas efek sedatif ekstrak dan fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun kangkung air terhadap mencit putih (*Mus musculus*) dengan metode uji *rotarod*.

2. Klasifikasi variabel utama

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

Variabel bebas adalah variabel yang dapat mempengaruhi perubahan pada variabel terikat (Endra, 2017). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun kangkung air, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak daun kangkung air.

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi oleh atau menjadi akibat dari variabel bebas (Endra., 2017). Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas sedatif ekstrak dan fraksi *n*-heksan, etil asetat, air dari ekstrak daun kangkung air terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus*) yang diamati adalah lamanya durasi mencit dapat bertahan tetap berlari pada alat *rotarod* sebagai efek sedatif yang ditimbulkan.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang dijaga dalam kondisi konstan agar pengaruh variabel bebas terhadap variabel terikat dapat diamati secara objektif tanpa adanya gangguan dari faktor lain (Endra, 2017). Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kondisi fisik mencit meliputi berat badan mencit, kondisi sampel, kondisi penelitian, waktu pengamatan, prosedur ekstraksi, dan fraksinasi.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun kangkung air adalah daun kangkung air dalam kondisi yang masih segar, warna hijau, dan tidak rusak diperoleh dari daerah Waduk Cengklik, Boyolali.

Kedua, daun kangkung air adalah serbuk daun kangkung air yang dihasilkan dari proses pengambilan bahan, sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, sortasi kering, setelah kering dihaluskan mesin penggiling, diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak daun kangkung air adalah hasil ekstraksi serbuk daun kangkung dengan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah residu fraksi ekstrak daun kangkung air yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana sebagai pelarut non polar setelah diuapkan menggunakan *waterbath*.

Kelima, fraksi etil asetat adalah residu fraksi *n*-heksana dari ekstrak daun kangkung air yang difraksinasi dengan pelarut etil asetat sebagai pelarut semi polar diuapkan menggunakan *waterbath*.

Keenam, fraksi air adalah residu fraksi etil asetat dari ekstrak daun kangkung air diuapkan menggunakan *waterbath*.

Ketujuh, uji efek sedatif adalah pengujian yang menggunakan metode *rotarod*, menempatkan hewan uji di bagian yang akan berputar dari rotor drum kemudian diberi perlakuan lalu beri jeda 30 menit setelah perlakuan, kemudian letakkan kembali mencit pada *rotarod* dengan kecepatan 30 rpm, pengujian dilakukan pada waktu menit ke-30, 60, 90, 120.

Kedelapan, fraksi paling efektif adalah fraksi yang memiliki aktivitas sedatif paling tinggi diantara kelompok fraksi lainnya.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan antara lain blender, ayakan mesh no 40, timbangan analitik, maserasi, wadah ember, botol gelap, kertas saring, tabung reaksi, kain flanel, penggaris, corong pisah, batang pengaduk, evaporator, *waterbath*, *stopwatch*, *rotarod*, spuit dengan jarum tumpul, *beaker glass*, gelas ukur, tabung spiritus, gelas ukur, oven, kurs, cawan porselen, spatel, jar kaca, lampu KLT, pipa kapiler, gelas ukur, lempeng KLT, *chamber*, sinar UV 245 dan sinar UV 366, kandang mencit.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kangkung air yang diperoleh dari daerah Waduk Cengklik,

Boyolali, Jawa Tengah. Kondisi daun kangkung yang masih segar, warna hijau tua, dan tidak cacat.

2.2 Bahan kimia. Penelitian ini menggunakan bahan kimia berupa etanol 96%, *aquades*, tablet diazepam (kontrol positif), CMC Na (kontrol negatif), *n*-heksan, etil asetat, metanol, kloroform, AlCl_3 , serbuk Mg, HCl pekat, HCl 2N, amil alkohol, FeCl_3 , H_2SO_4 pekat, asetat anhidrat, reagen *mayer*, reagen *dragendorff*, dan reagen *wagner*.

2.3 Hewan uji. Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit putih jantan (*Mus musculus*) sehat yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi.

D. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan *ethical clearance*

Klirens etik (*ethical clearance*) adalah pernyataan tertulis yang diterbitkan oleh komite etik penelitian sebagai bentuk persetujuan terhadap pelaksanaan suatu penelitian yang melibatkan makhluk hidup, setelah proposal penelitian dinilai memenuhi prinsip dan standar etika yang berlaku. Langkah pertama, yaitu dengan mengajukan dan mengisi form permohonan pembuatan klirens etik di *official website* Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) RSUD Dr. Moewardi Surakarta, lalu menyerahkan naskah proposal riset pada pihak rumah sakit untuk pengkajian aspek etik protokol penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan sebagai percobaan. Klirens etik akan dikeluarkan jika memenuhi persyaratan layak etik.

2. Determinasi tanaman kangkung air

Determinasi tanaman dilakukan untuk memastikan keakuratan sampel daun kangkung air berkaitan dengan karakteristik morfologi yang terdapat pada tanaman kangkung air yang dilakukan di UPA Laboratorium Universitas Setia Budi.

3. Pengambilan bahan dan pembuatan serbuk daun kangkung air

Daun kangkung air yang digunakan pada penelitian diambil secara acak yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, memiliki warna hijau yang segar, tidak rusak, serta dalam kondisi bebas dari penyakit atau hama. Pemilihan ini dilakukan agar mendapat daun yang memiliki kandungan senyawa yang optimal. Pengambilan sampel dilakukan di Waduk Cengklik, Boyolali, Jawa Tengah.

Proses dimulai dengan memisahkan daun dari batangnya, kemudian melakukan sortasi basah, lalu pencucian daun kangkung air menggunakan air bersih yang mengalir, sehingga kotoran dapat hilang dengan baik, daun ditiriskan agar tidak mempercepat pertumbuhan mikroba dan mempercepat pengeringan. Pengeringan dilakukan dengan pemanasan bantuan sinar matahari dan ditutup dengan kain hitam tujuannya untuk mencegah sinar matahari langsung yang dapat merusak senyawa dalam daun kangkung air.

Simplisia kering selanjutnya dihaluskan menggunakan mesin penggiling, kemudian diayak dengan ayakan No. 40 untuk memperoleh serbuk daun kangkung air dengan tingkat kehalusan yang relatif homogen. Serbuk yang dihasilkan disimpan dalam wadah tertutup rapat guna menjaga kualitas dan kestabilannya.

4. Penetapan susut pengeringan serbuk

Penetapan susut pengeringan menggunakan metode gravimetri dengan replikasi 3x dengan menimbang seksama serbuk daun kangkung air sebanyak 2 gram dalam kurs yang telah di tara dan dipanaskan sebelumnya pada suhu 105°C. Sampel dimasukkan ke dalam oven dan dikeringkan pada suhu yang telah ditetapkan hingga mencapai bobot konstan. Sebelum proses pengeringan, kurs dibiarkan tetap tertutup lalu kurs didinginkan didalam desikator hingga mencapai suhu ruang. Nilai susut pengeringan yang baik adalah kurang dari 10% (Kemenkes RI, 2022).

5. Pembuatan ekstrak daun kangkung air

Serbuk daun kangkung air sebanyak 900 g dibagi dalam 3 bagian masing-masing berisi 300 g dalam 3 liter pelarut etanol 96%, kemudian didiamkan 6 jam dengan sesekali digojog tujuannya agar pelarut mengalir dengan baik ke dalam serbuk yang telah halus sehingga zat aktif dapat terlarut, kemudian didiamkan selama 18 jam. Maserat disaring dengan kain flanel, dan menyaring kembali menggunakan kertas saring. Prosedur ekstraksi diulangi dengan pelarut yang sama dan jumlah pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Filtrat yang diperoleh pada maserasi dan remaserasi digabungkan kemudian filtrat dipekatkan di *rotary evaporator* hingga menjadi ekstrak kental. Ekstrak kental di timbang hingga bobot tetap. Ekstrak yang diperoleh dihitung rendemennya dengan syarat tidak kurang dari 10% menggunakan rumus (Kemenkes, 2022).

$$\text{Rendemen ekstrak} : \frac{\text{berat ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{berat serbuk awal (g)}} \times 100\%$$

6. Penetapan kadar air ekstrak metode gravimetri

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode gravimetri dengan menimbang sebanyak 10 g ekstrak daun kangkung air yang ditempatkan dalam cawan porselen. Sampel diratakan, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C selama 5 jam setelah itu, sampel didinginkan hingga mencapai suhu ruang lalu ditimbang. Proses pengeringan dilanjutkan dengan interval penimbangan setiap 1 jam hingga diperoleh bobot konstan, yang ditandai dengan selisih bobot tidak lebih dari 0,25%. Syarat yang baik kadar air ekstrak kangkung air adalah tidak lebih dari 10 % (Kemenkes RI, 2022).

7. Identifikasi kandungan kimia daun kangkung air dengan uji tabung

7.1 Uji flavonoid. Ekstrak kangkung air sebanyak 0,1 g dicampur dengan 4 ml etanol 96% lalu ditambah 0,1 mg serbuk Mg, 2 tetes HCl pekat dan 0,4 ml amil alkohol kemudian campuran dikocok. Positif flavonoid jika menunjukkan warna merah, kuning atau jingga yang terbentuk pada lapisan amil alkohol (Kemenkes RI, 2017).

7.2 Alkaloid. Ekstrak daun kangkung air ditimbang sebanyak 0,3 g, kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling, setelah itu ekstrak dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit lalu dinginkan dan saring ekstrak. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian dengan masing-masing 3 tetes. Tiap bagian ditambahkan masing-masing reagen *Mayer*, *Dragendorf* dan *Wagner* 2-3 tetes. Positif mengandung alkaloid ditunjukkan dengan adanya endapan putih atau endapan coklat kemerahan (Kemenkes RI, 2017).

7.3 Uji Saponin. Ekstrak daun kangkung air sebanyak 0,1 gram ditambahkan 10 ml *aquades* panas, kemudian didinginkan dan dikocok selama 30 detik. Terbentuknya busa stabil tidak kurang 10 menit, kemudian tambahkan HCl 2N 1 tetes, adanya busa kurang lebih 1 cm menunjukkan positif adanya saponin (Kemenkes RI, 2017).

7.4 Uji tanin. 10 ml *aquades* ditambahkan pada ekstrak daun kangkung air sebanyak 0,1 gram kemudian dilakukan penyaringan setelah didiamkan 5 menit. 5 tetes FeCl_3 1% diteteskan pada filtrat. Perubahan warna menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman (Kemenkes RI, 2017).

7.5 Steroid/ terpenoid. 0,1 gram ekstrak daun kangkung air ditimbang dan ditambahkan 3 tetes asetat anhidrat kemudian 1 tetes H_2SO_4 pekat. Steroid ditunjukkan dengan adanya perubahan warna biru

atau hijau dan triterpenoid ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi ungu atau merah (Kemenkes RI, 2017).

8. Pembuatan fraksi etanol daun kangkung air

Fraksinasi dilakukan menggunakan metode ekstraksi cair-cair, yaitu dengan menimbang 10 g ekstrak daun kangkung air yang kemudian dilarutkan dalam 10 mL etanol dan ditambah 65 mL *aquades* dimasukkan ke dalam corong pisah, lalu diikuti dengan penambahan 75 mL *n*-heksan, kemudian dipartisi sampai tidak berwarna atau bening. Fase *n*-heksana diuapkan di *waterbath* pada suhu 50°C. Hasilnya ditimbang dan bagian ini disebut fraksi *n*-heksan. Residu yang diperoleh dari partisi *n*-heksan dimasukkan ke dalam corong pisah, ditambah 75 mL etil asetat, kemudian dipartisi dalam fase etil tidak berwarna atau jernih. Fase etil asetat diuapkan di *waterbath* pada suhu 50° C. Hasilnya ditimbang dan bagian ini disebut fraksi dari etil asetat. Residu yang diperoleh dari partisi etil asetat diuapkan di *waterbath* suhu 50°C. Hasilnya ditimbang dan bagian ini disebut fraksi air (Firdausi *et al.*, 2015). Total ekstrak yang digunakan pada fraksinasi adalah 30 g ekstrak daun kangkung air. Filtrat fraksi kemudian dihitung rendemennya menggunakan rumus (Kemenkes, 2022).

$$\text{rendemen fraksi} : \frac{\text{berat fraksi kental (g)}}{\text{berat ekstrak awal (g)}} \times 100\%$$

9. Identifikasi flavonoid dengan metode KLT

Identifikasi flavonoid dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fase diam yang digunakan adalah *silika gel* GF₂₅₄. Ekstrak pekat 1 g dilarutkan dalam 10 ml etanol 96 %, baku pembanding kuersetin, dan masing-masing larutan fraksi di totolkan di atas lempeng KLT *silika gel* GF₂₅₄ yang berukuran 5 cm x 7 cm dibuat garis lurus pada lempeng kira-kira 1 cm (sebagai batas bawah) dan 0,5 cm (sebagai batas atas) menggunakan pipa kapiler. Lempeng yang sudah di totolkan selanjutnya dikeringkan dan dielusi menggunakan fase gerak metanol : kloroform : air (65:25:4). Pemantauan bercak dilakukan dengan sinar ultraviolet 254 dan 366. Penyemprot penampak bercak aluminium (III) klorida, setelah itu di oven suhu 105° selama 5 menit untuk memperjelas bercak, kemudian dilakukan perhitungan nilai R_f (Wirasutisna *et al.*, 2012).

10. Uji aktivitas sedatif

10.1 Pembuatan stok suspensi Na-CMC 0,5%. Timbang Na-CMC sebanyak 0,5 gram, lalu disuspensikan dengan 50 ml *aquades*,

setelah itu dimasukkan ke dalam *beaker glass*, lalu tambahkan *aquades* hingga 100 ml.

10.2 Pembuatan larutan stok diazepam. 1 tablet diazepam kekuatan 2 mg dibuat suspensi diazepam dengan menggerus kekuatan 2 mg di dalam mortir kemudian ditambahkan 5 ml larutan Na-CMC 0,5%, lalu diaduk hingga homogen setelah itu dimasukkan ke dalam *beaker glass* 100 mL, lalu ditambah Na-CMC 0,5 % sampai tanda batas.

10.3 Penetapan dosis diazepam. Dosis terapeutik diazepam yaitu 2 mg/70 kgBB manusia. Faktor konversi manusia dengan berat 70 kg ke mencit berat badan 20 gram adalah 0,0026. Dosis untuk mencit 20 gram didapatkan 0,0052 mg/20 g BB mencit.

10.4 Pembuatan larutan stok ekstrak daun kangkung air. Sebanyak 1 gram ekstrak daun kangkung air ditambahkan dengan Na-CMC 0,5% sampai 100 ml aduk hingga homogen. Konsentrasi larutan stok 1 %. Dosis yang diberikan pada mencit yaitu dosis ekstrak daun kangkung air adalah 4 mg/20 g BB mencit atau 200 mg/kg BB mencit.

10.5 Pembuatan larutan stok fraksi *n*-heksan ekstrak daun kangkung air. Sebanyak 200 mg fraksi *n*-heksan ekstrak daun kangkung air ditambahkan dengan Na-CMC 0,5% sampai 100 ml aduk hingga homogen. Konsentrasi larutan stok 0,2 %. Dosis fraksi *n*-heksan ekstrak daun kangkung air yang diberikan pada mencit adalah 0,66 mg/20 g BB mencit atau 33 mg/kg BB mencit.

10.6 Pembuatan larutan stok fraksi etil asetat ekstrak daun kangkung air. Sebanyak 200 mg fraksi etil asetat ekstrak daun kangkung air ditambahkan dengan Na-CMC 0,5% sampai 100 ml aduk hingga homogen.. Konsentrasi larutan stok yaitu 0,2 %. Dosis fraksi etil asetat ekstrak daun kangkung air yang diberikan pada mencit adalah 0,4 mg/20 g BB mencit atau 20 mg/kg BB mencit.

10.7 Pembuatan larutan stok fraksi air ekstrak daun kangkung air. Sebanyak 300 mg fraksi air ekstrak daun kangkung air ditambahkan dengan Na-CMC 0,5% sampai 100 ml aduk hingga homogen. Konsentrasi larutan stok 0,3 %. Dosis fraksi air ekstrak daun kangkung air yang diberikan pada mencit adalah 1,46 mg/20 g BB mencit atau 73 mg/kg BB mencit.

11. Prosedur pengujian aktivitas sedatif

Pertama, selama satu minggu mencit akan diadaptasi terlebih dahulu dengan alat *rotarod* dengan cara dilatih di alat putar *rotarod*

selama 15 menit setiap hari untuk penyesuaian. Perlakuan dengan menggunakan metode oral.

Kedua, mencit dibagi menjadi 6 kelompok secara acak, masing-masing kelompok terdiri atas 6 ekor mencit dan timbang BB tiap kelompok perlakuan untuk menentukan dosis yang akan diberikan

Ketiga, sebelum pengujian mencit dipuasakan terlebih dahulu selama 3-4 jam untuk pengosongan lambung.

Keempat, tiap mencit diberi perlakuan sesuai dengan kelompoknya yaitu :

Kelompok 1 : Na-CMC 0,5% sebagai kontrol negatif

Kelompok 2 : Diazepam 0,013mg/20 g BB mencit sebagai kontrol positif

Kelompok 3 : Ekstrak etanol daun kangkung air dosis 4 mg/20 g BB atau 73 mg/kg BB mencit.

Kelompok 4 : Fraksi *n*-heksan daun kangkung air dosis 0,66 mg/20 g BB mencit atau 33 mg/kg BB mencit.

Kelompok 5 : Fraksi etil asetat daun kangkung air dosis 4 mg/20 g BB mencit atau 20 mg/kg BB mencit.

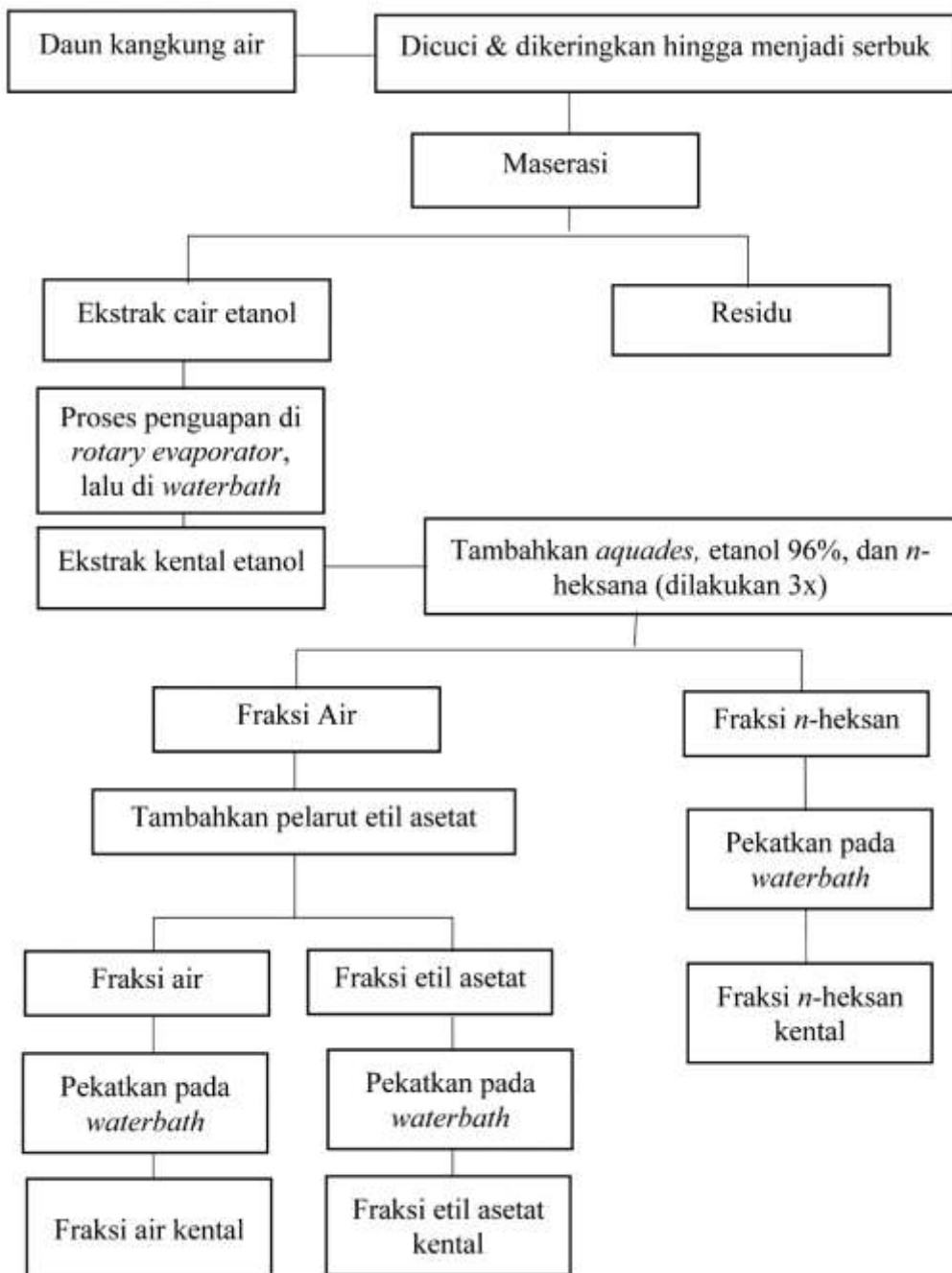
Kelompok 6 : Fraksi air daun kangkung air dosis 1,46 mg/20 g BB mencit atau 73 mg/kg BB mencit.

Kelima, setelah diberikan perlakuan, mencit diistirahatkan selama 30 menit kemudian mencit kembali diletakkan pada alat *rotarod* dan diputar dengan kecepatan 30 rpm. Pengujian dilakukan pada waktu ke-30, 60, 90, dan 120 menit Hitung lamanya durasi mencit bertahan pada alat *rotarod*.

E. Analisis Data

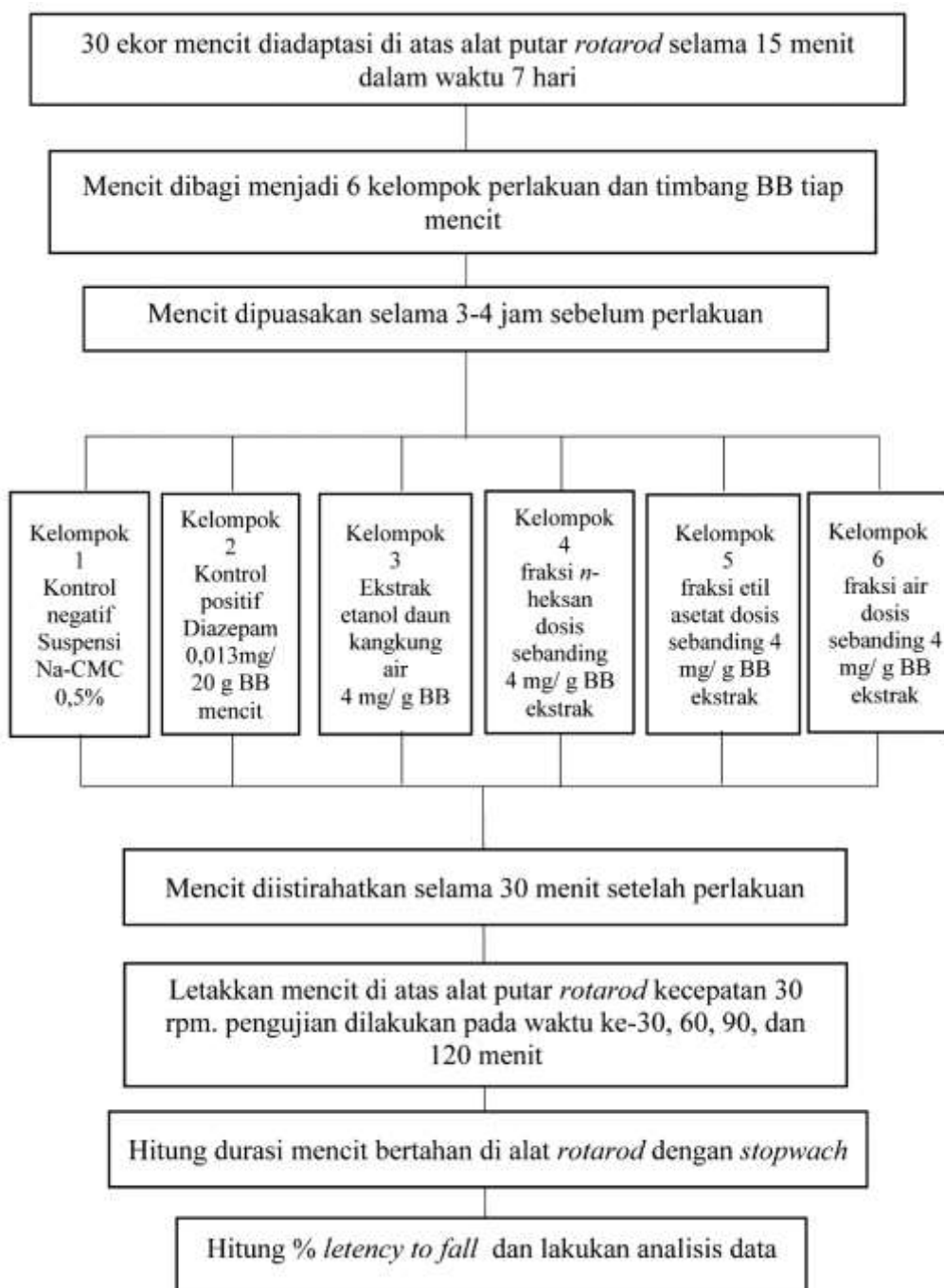
Data yang didapatkan dianalisis dengan terlebih dahulu diolah dengan *One Way Anova* karena variabel dependennya berupa numerik, dengan jumlah sampel >2 dan tidak berpasangan. Syarat melakukan uji ini adalah data harus berdistribusi normal dan varian datanya homogen. Untuk tau apakah data berdistribusi normal dilakukan uji normalitas *Saphiro-Wilk* karena sampel yang dipakai 0,05 dan dikatakan datanya homogen jika $p\text{-value} > 0,05$ dengan uji *Levene*. Namun, apabila syarat-syarat tersebut tidak terpenuhi, maka dapat dilakukan uji non parametrik yaitu uji *Kruskall-Wallis*. Mengetahui kelompok mana yang mempunyai perbedaan dilakukan uji *Post Hoc* yaitu dengan menggunakan uji *Post Hoc Tukey HSD*.

F. Skema Penelitian



Gambar 3. Pembuatan ekstrak etanol dan fraksinasi daun kangkung air

G. Skema Pengujian Aktivitas Sedatif



Gambar 4. Skema pengujian efek sedatif ekstrak etanol dan fraksi daun kangkung air