

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi Sampel

Populasi dalam penelitian ini yaitu daun cocor bebek yang diperoleh dari daerah Pekalongan, Jawa Tengah.

Sampel merupakan bagian dari populasi yang diteliti. Pada penelitian kali ini, sampel yang digunakan yaitu daun cocor bebek. Daun cocor bebek dipilih yang berwarna hijau, berumur 3-4 bulan, dan terbebas dari hama yang diperoleh dari daerah Pekalongan, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pada penelitian kali ini yaitu ekstrak etanol daun cocor bebek. Variabel kedua pada penelitian ini yaitu efek antidiare ekstrak etanol daun cocor bebek terhadap mencit putih jantan. Variabel ketiga pada penelitian kali ini yaitu aktivitas antidiare dari ekstrak etanol daun cocor bebek terhadap mencit putih jantan dengan metode transit intestinal.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel dibedakan menjadi beberapa klasifikasi yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan yang terakhir variabel terkontrol. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja direncanakan dan memiliki pengaruh yang baik pada variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun cocor bebek.

Variabel tergantung adalah variabel akibat dari variabel utama. Pada penelitian ini, variabel tergantung adalah efek antidiare ekstrak etanol daun cocor bebek terhadap mencit putih jantan dengan pengamatan parameter berupa rasio jarak tempuh marker terhadap panjang usus keseluruhan.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung dan merupakan variabel yang dapat dikendalikan dari peneliti. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah berat mencit, kondisi fisik hewan uji, keadaan hewan uji, kondisi lingkungan sekitar, serta peneliti.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, tanaman cocor bebek merupakan tanaman yang bisa didapatkan di daerah Pekalongan, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun cocor bebek merupakan hasil pengeringan dari daun yang telah dicuci bersih dan dikeringkan. Setelah dikeringkan lalu dihaluskan dengan memakai mesin penggiling dan diayak menggunakan ayakan dengan nomor 60 mesh.

Ketiga, ekstrak etanol daun cocor bebek merupakan ekstrak yang didapatkan dengan mengekstraksi serbuk daun cocor bebek dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 50%, 70%, dan 96% lalu diuapkan menggunakan *rotary evaporation* sehingga didapatkan ekstrak yang kental.

Keempat, hewan uji yang dipakai pada penelitian ini merupakan hewan mencit yang telah dipelihara dengan tujuan untuk penelitian di laboratorium. Hewan uji ini diinduksi menggunakan minyak jarak atau *oleum ricini* sehingga mencit mengalami diare.

Kelima, diare merupakan perubahan konsistensi feses menjadi lembek dan berlendir pada hewan uji mencit.

Keenam, aktivitas antidiare adalah kemampuan dalam menurunkan motilitas usus, yang ditunjukkan oleh penurunan persentase jarak tempuh marker di saluran cerna secara signifikan dibandingkan kontrol negatif dan mendekati atau setara dengan kontrol positif (loperamid).

Ketujuh, metode transit intestinal merupakan metode yang dipakai dalam pengujian antidiare. Pengujian ini dilakukan dengan menghitung rasio jarak usus yang ditempuh oleh marker terhadap panjang usus keseluruhan dengan mengukur panjangnya menggunakan meteran pita.

Kedelapan, konsentrasi pelarut yang paling kuat merupakan konsentrasi pelarut yang menghasilkan ekstrak dengan aktivitas antidiare tertinggi, ditunjukkan oleh penurunan persentase transit intestinal secara signifikan dan efek yang setara dengan kontrol positif.

C. Alat, Bahan, dan Hewan Uji

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian dalam pembuatan simplisia kering dan pembuatan ekstrak yaitu pisau, tempat penampung ekstrak dan simplisia kering, neraca analitik, gelas beaker, batang pengaduk, rotary evaporation, oven. Alat yang digunakan untuk perlakuan hewan uji coba yaitu jarum oral, spuit, kandang mencit, kapas, alat bedah, pisau, meteran pita, handscoon dan, masker.

2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk membuat sampel berupa daun cocor bebek yang masih segar diperoleh dari daerah Pekalongan, Jawa Tengah. Bahan yang digunakan untuk membuat berupa pelarut etanol 50%, etanol 70%, etanol 96%, *aquadest*, loperamid HCl 2 mg sebagai kontrol positif, dan CMC-Na, oleum ricini, dan norit.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan yaitu mencit putih jantan berumur 2-3 bulan dengan berat rata-rata 15-30 gram sebanyak 24 ekor. Mencit dikelompokkan menjadi 6 kelompok yaitu, kelompok I merupakan kontrol normal, kelompok II sebagai kontrol negatif, kelompok III sebagai kontrol positif, kelompok IV sebagai perlakuan ekstrak etanol 50% daun cocor bebek, kelompok V sebagai perlakuan ekstrak etanol 70% daun cocor bebek, dan kelompok VI perlakuan ekstrak etanol 96% daun cocor bebek.

Hewan uji diaklimatisasi yaitu penyesuaian atau adaptasi terhadap lingkungan selama 1 minggu. Selama aklimatisasi hewan uji tetap diberikan pakan normal. Mencit dipuasakan kurang lebih 18 jam sebelum percobaan, namun minum tetap diberikan dengan tujuan menyamakan keadaan mencit, mencegah pengaruh dari makanan yang dikonsumsi sehingga tidak mengganggu proses absorpsi (Manek *et al.*, 2020).

D. Jalannya Penelitian

1. *Ethical clearance*

Ethical clearance dilakukan untuk memastikan seluruh rangkaian penelitian telah memenuhi prinsip etika penelitian, khususnya dalam penggunaan hewan uji, meliputi aspek kesejahteraan hewan, keamanan prosedur penelitian, serta kepatuhan terhadap pedoman dan peraturan yang berlaku. *Ethical clearance* dilakukan oleh Rumah Sakit Moewardi Surakarta.

2. Karakteristik tumbuhan

2.1 Determinasi tumbuhan. Determinasi dilakukan untuk memastikan kebenaran tumbuhan cocor bebek dengan morfologi atau karakteristik dari tumbuhan tersebut. Determinasi ini dilakukan pada bagian daunnya. Determinasi dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi, Surakarta.

2.2 Pengambilan bahan. Daun cocor bebek diperoleh dari daerah Pekalongan, Jawa Tengah. Daun cocor bebek diambil saat dalam keadaan segar, bebas dari hama dan penyakit. Daun cocor bebek diambil saat sudah siap panen, kurang lebih usia 3-4 bulan.

2.3 Pengeringan bahan. Daun cocor bebek segar di sortasi basah. Setelah itu, dicuci dengan air mengalir. Kering anginkan daun sebelum dilakukan pengovenan supaya jumlah air berkurang setelah proses pencucian. Pengeringan dilakukan menggunakan oven pada suhu 40-50°C. Proses pengeringan dilakukan hingga daun cocor bebek kering, ditandai dengan daun yang mudah diremah.

2.4 Pembuatan serbuk. Daun cocor bebek yang telah kering lalu digiling atau dihaluskan menggunakan mesin. Setelah dirasa cukup halus, serbuk diayak menggunakan ayakan nomor 60 mesh sehingga didapatkan serbuk daun cocor bebek.

3. Identifikasi serbuk daun cocor bebek

3.1 Pemeriksaan organoleptis serbuk. Pemeriksaan ini meliputi bentuk, warna, bau, serta rasa. Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui sifat fisik dan kualitas serbuk.

3.2 Penetapan susut pengeringan serbuk. Penetapan susut pengeringan serbuk dilakukan dengan metode gravimetri untuk mengetahui jumlah zat yang hilang selama proses pengeringan, terutama air dan komponen volatil. Sampel serbuk ditimbang, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu $\pm 105^{\circ}\text{C}$ hingga diperoleh bobot tetap, didinginkan dalam desikator, dan ditimbang kembali. Besarnya susut pengeringan dihitung dari selisih bobot sebelum dan sesudah pengeringan yang dinyatakan dalam persen. Menurut Farmakope Herbal Indonesia (FHI), kadar susut pengeringan serbuk simplisia umumnya tidak boleh melebihi 10%, karena nilai yang terlalu tinggi menunjukkan kadar air yang besar dan dapat menurunkan stabilitas serta mutu serbuk selama penyimpanan.

4. Pengenceran pelarut etanol 50% dan 70%

4.1 Pengenceran etanol 96% menjadi etanol 70%. Membuat etanol 70% sebanyak 5000 ml untuk maserasi. Mengambil etanol 96% sebanyak 3646 ml menggunakan gelas ukur. Setelah itu, tambahkan 1354 ml aquades, lalu homogenkan. Membuat etanol 70% untuk remaserasi sebanyak 2500 ml. mengambil etanol 96% sebanyak 1823 ml lalu tambahkan 677 ml aquadest dan homogenkan. Setelah homogen, untuk memastikan kadar etanol, dilakukan pengecekan kadar menggunakan

alkoholmeter. Jika kadar etanol kurang dari 70% maka diberi tambahan etanol 96% dan dicek kembali sampai kadarnya 70%. Kemudian beri label etanol 70%. Hasil perhitungan banyak etanol dan aquadest yang dibutuhkan dapat dilihat pada lampiran 8.

4.2 Pengenceran etanol 96% menjadi etanol 50%. Membuat etanol 50% sebanyak 5000 ml untuk maserasi. Mengambil etanol 96% sebanyak 2604 ml menggunakan gelas ukur. Setelah itu, tambahkan 2396 ml aquades, lalu homogenkan. Membuat etanol 50% untuk remaserasi sebanyak 2500 ml. mengambil etanol 96% sebanyak 1302 ml lalu tambahkan 1198 ml aquadest dan homogenkan. Setelah homogen, untuk memastikan kadar etanol, dilakukan pengecekan kadar menggunakan alkoholmeter. Jika kadar etanol kurang dari 50% maka diberi tambahan etanol 96% dan dicek kembali sampai kadarnya 50%. Kemudian beri label etanol 50%. Hasil perhitungan banyak etanol dan aquadest yang dibutuhkan dapat dilihat pada lampiran 9.

5. Pembuatan ekstrak daun cocor bebek

Ekstraksi yang digunakan yaitu dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 50%, 70%, dan 96%. Maserasi dilakukan masing-masing dengan 500 gram serbuk daun cocor bebek dimasukkan ke dalam maserator lalu ditambahkan 10 bagian pelarut (1:10), yaitu (500 g simplisia: 5 L etanol). Serbuk direndam selama 6 jam pertama sambil diaduk sesekali kemudian diamkan selama 18 jam, Pisahkan maserat dengan cara filtrasi, proses penyarian diolangi sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama.

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot yang didapat}}{\text{bobot simplisia yang diekstrak}} \times 100\%$$

6. Identifikasi ekstrak daun cocor bebek

6.1 Pemeriksaan organoleptis ekstrak. Pemeriksaan organoleptis ekstrak dilakukan dengan tujuan mengetahui sifat fisik dan kualitas serbuk dilihat dari segi bentuk, warna, bau, dan rasa.

6.2 Penetapan kadar air ekstrak daun cocor bebek. Penetapan kadar air ekstrak daun cocor bebek dilakukan dengan menggunakan metode destilasi toluen. Toluene dijenuhkan dengan air. Timbang 10 gram ekstrak di atas kaca arloji. Tambahkan 200 ml toluen yang telah dijenuhkan sebelumnya menggunakan air sebanyak 20 ml. panaskan menggunakan api bunsen selama 15 menit. Setelah semua

tersuling, panaskan lagi selama 5 menit. Hasil dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\frac{\text{volume air}}{\text{bobot awal}} \times 100 \%$$

6.3 Identifikasi kandungan senyawa kimia daun cocor bebek. Tujuan dari pengujian ini adalah untuk mengidentifikasi kandungan ekstrak etanol daun bayarm. Identifikasi senyawa kimia bertujuan untuk menetapkan keberadaan senyawa kimia dalam ekstrak etanol dan cocor bebek. Identifikasi senyawa ekstrak etanol daun flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, dan steroid.

6.3.1 Identifikasi flavonoid. Ekstrak daun cocor bebek ditambahkan serbuk logam Mg. 1 mL HCL pekat, dan 1 ml amil alkohol untuk identifikasi. Hasil positif ditunjukkan dengan munculnya warna merah atau kuning pada lapisan amil alkohol.

6.3.2 Identifikasi tanin. Ekstrak daun cocor bebek ditimbang hingga 0,1 gr lalu ditambahkan 2 mL. FeCs, kemudian dikocok. Perubahan warna larutan menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin.

6.3.3 Identifikasi saponin. Ekstrak daun cocor bebek sebanyak 0.5 gram ditambahkan 10 ml. *aquadest*, kemudian tambahkan 1 tetes HCL 2N lalu di kocok dengan kuat selama 10 detik. Hasil positif ditunjukkan dengan munculnya buih stabil selama tidak kurang dari 10 menit (Surbakti, 2018).

6.3.4 Identifikasi alkaloid. Ekstrak sebanyak 0,5 gram ditambahkan 2 ml. kloroform, 10 ml ammonia dan 10 tetes H₂SO₄, Kocok campuran dan biarkan membentuk 2 lapisan. Lapisan H₂SO₄ yang terbentuk dibagi menjadi 3 di tabung reaksi. Ketiga larutan di uji dengan percaksi Mayer, Dragendorff, dan Wagner. Hasil positif pereaksi Mayer ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih, hasil positif pada pereaksi Dragendorff ditunjukkan dengan terbentuknya endapan merah jingga, dan hasil positif pereaksi Wagner berubahnya warna larutan menjadi coklat (Surbakti, 2018).

6.3.5 Identifikasi steroid/terpenoid. Ditimbang ekstrak daun cocor bebek sebanyak 0,1 g lalu ditambahkan 2 mL. n-heksana dan dikocok: Tambahkan percaksi Lieberman-Buchard ke lapisan n-heksana. Perubahan warna menjadi biru kehijauan menunjukkan adanya steroid dan terbentuknya warna merah, jingga atau ungu menandakan adanya terpenoid (Makalalang *et al.*, 2010).

7. Penetapan kadar total fenol cara folin-ciocalteu

7.1 Larutan uji untuk ekstrak. Timbang saksama lebih kurang 0,2 g ekstrak, masukkan ke dalam labu Erlenmeyer, ambahkan 25 ml. metanol P, aduk selama 30 menit dengan pengaduk magnetik. Saring ke dalam labu tentukur 25-ml, tambahkan metanol P melalui penyaring sampai tanda.

7.2 Larutan pembanding. Timbang saksama lebih kurang 10 mg asam galat, masukkan ke dalam labu tentukur 10 ml, larutkan dengan metanol P, tambahkan metanol P sampai tanda sehingga menghasilkan larutan dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$. Buat seri pengenceran larutan pembanding dengan kadar berturut-turut 50, 40, 30, 20, 10 $\mu\text{g/ml}$ sebanyak 10 ml. Untuk volume pemipetan adapat dilihat pada tabel

Tabel 2. Volume pemipetan pembuatan seri pengenceran	
Konsentrasi (ppm)	Volume yang dipipet (ml)
10	0,1
20	0,2
30	0,3
40	0,4
50	0,5

7.3 Pengukuran. Pada masing-masing 1 ml larutan uji dan masing-masing seri larutan pembanding ke dalam wadah yang sesuai, tambahkan 5,0 mL enceran Folin-Ciocalteu LP (7,5% dalam air). Diamkan selama 8 menit, tambahkan 4,0 mL. NaOH 1%, inkubasi selama 1 jam. Ukur serapan masing-masing larutan pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 730 nm. Lakukan pengukuran blangko dengan cara yang sama, tanpa penambahan larutan uji. Buat kurva kalibrasi dan hitung kadar larutan uji.

8. Pembuatan kurva baku

8.1 Penentuan panjang gelombang maksimum. Reaksikan seri pengenceran konsentrasi tertinggi dengan pereaksi. Lakukan scanning panjang gelombang 400-850 nm. Tentukan panjang gelombang maksimum.

8.2 Penentuan *operating time*. Reaksikan seri pengenceran konsentrasi tertinggi dengan pereaksi. Lakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang maksimum selama 70 menit. Tentukan *operating time*

8.3 Pengukuran. Pada masing-masing 1 ml larutan uji dan masing-masing seri larutan pembanding ke dalam wadah yang sesuai, tambahkan 5,0 ml enceran Folin-Ciocalteu LP (7,5% dalam air).

Diamkan selama 8 menit. Tambahkan 4.0 ml NaOH 1%. Inkubasi selama *operating time* terpilih. Ukur serapan masing-masing larutan pada panjang gelombang maksimum. Lakukan pengukuran blangko dengan cara yang sama, tanpa penambahan larutan uji. Hitung kadar fenol total sebagai asam galat dalam serbuk simplisia dengan kurva baku. Pilih absorbansi baku yang mendekati absorbansi sampel, lalu hitung kadar fenol total sebagai asam galat dalam serbuk simplisia dengan rumus:

$$\% = \frac{\left(C_p \times \frac{A_u}{A_p} \times V \times f \right)}{W} \times 100$$

Keterangan :

- C_p : Kadar Larutan pembanding
 A_u : Serapan Larutan uji A Serapan Larutan pembanding
 V : Volume Larutan uji sebelum pengenceran
 F : Faktor pengenceran Larutan uji
 W : Bobot bahan uji

9. Pengujian antidiare

9.1 Penentuan dosis uji. Dosis sediaan uji yang dipakai pada kelompok perlakuan dengan variasi dosis yang digunakan pada penelitian ini sebesar 52 mg/kg BB mencit. Dosis ini diambil berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh (Fitriani, 2021)

9.2 Dosis loperamid. Dosis loperamid pada manusia 70 kg Kemudian dikonversi ke mencit berat badan 20 g nilai konversi 0,026. Dosis loperamid 2 mg maka dosis ke mencit diperoleh 2,6 mg/kg BB mencit.

9.3 Pembuatan suspensi CMC-Na 1%. Suspensi dibuat dengan ditimbang CMC-Na 1 g lalu ditaburkan diatas *aquadest* panas tunggu hingga CMC-Na mengembang, lalu dimasukkan dalam mortir dan digerus hingga homogen dan ditambahkan *aquadest* ad 100 ml.

9.4 Pembuatan suspensi loperamid HCL. Suspensi dibuat dengan menggerus 1 tablet loperamid HCL. lalu disuspensikan dalam larutan CMC-Na lalu digerus dan dicampur hingga homogen

9.4.1 Pembuatan suspensi ekstrak daun cocor bebek. Suspensi ekstrak dibuat dengan menimbang ekstrak sebanyak 5000 mg kemudian dimasukkan dalam mortir. Kemudian timbang CMC-Na 0,5% dan ditambahkan *aquadest* hangat lalu digerus sampai terbentuk mucilage. Masukkan ekstrak cocor bebek ke dalam mortir dan gerus sampai homogen. Tambahkan *aquadest* ad 100 ml.

9.4.2 Pembuatan suspensi norit. CMC-Na 100 mg ditaburkan diatas air panas selama 15 menit, dan digerus sampai homogen. Norit sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam mortir kemudian digerus homogen lalu tambah *aquadest* hingga 100 ml.

9.5 Pengelompokan hewan uji. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian yaitu 24 ekor mencit jantan dengan berat badan rata-rata 15-30 g. Mencit dibagi menjadi 6 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor mencit. Penentuan jumlah hewan uji ditentukan berdasarkan rumus Federer yang dapat dilihat perhitungannya pada lampiran 1. Hasil setiap kelompok terdiri dari 4 ekor mencit dan mendapatkan perlakuan sebagai berikut:

Kelompok I : Kontrol normal. Diberi norit secara per oral

Kelompok II : Kontrol negatif. CMC-Na 1%

Kelompok III : Kontrol positif. Loperamid HCL 2,6 mg/kg BB mencit

Kelompok IV : EDCB 50% diberi dosis 52 mg/kg BB mencit

Kelompok V : EDCB 70% diberi dosis 52 mg/kg BB mencit

Kelompok VI : EDCB 96% diberi dosis 52 mg/kg BB mencit

Ket: ED : Ekstrak Daun (cocor bebek)

9.6 Prosedur uji antidiare. Mencit putih jantan dalam kondisi sehat dengan berat badan 15-30 g, diadaptasi selama 1 minggu. Dikelompokkan menjadi 6 kelompok perlakuan (4 hewan per kelompok) dan ditimbang satu per satu. Hewan uji dipuasakan makan selama 18 jam sebelum percobaan dimulai, namun minuman masih tetap diberikan.

Semua kelompok kecuali kelompok kontrol normal diberi oleum ricini untuk memberikan efek diare pada mencit secara oral setelah satu jam pemberian kemudian diberi perlakuan. Kelompok II (kontrol negatif) diberi CMC-Na 1%, kelompok III (kontrol positif) diberi Loperamid HCL. kelompok IV diberi perlakuan EDCB 50% diberi dosis 52 mg/kg BB mencit, kelompok V EDCB 70% diberi dosis 52 mg/kg BB mencit, EDCB 96% diberi dosis 52 mg/kg BB mencit. Volume pemberian pada kelompok IV, V, dan VI adalah 1,04 ml.

Setelah 45 menit, mencit diberikan norit secara oral sebagai parameter uji Norit diberikan sebagai marker karena norit berwarna hitam sehingga dapat digunakan sebagai tanda pada usus. Pada 165 menit, mencit dikorbankan secara dislokasi tulang leher. Bedah rongga perut mencit, lalu usus dikeluarkan secara hati-hati. Ukur panjang usus yang dilalui marker mulai dari pylorus hingga ujung akhir (yang berwarna hitam) dengan menggunakan meteran pita. Dihitung masing-

masing rasio transit usus dan persentase penghambatannya. Jika rasio yang dihasilkan semakin kecil maka efek antidiare yang dihasilkan semakin baik dengan cara memperlambat motilitas usus (Wahid *et al*, 2018). Rasio transit intestinal dihitung dengan cara:

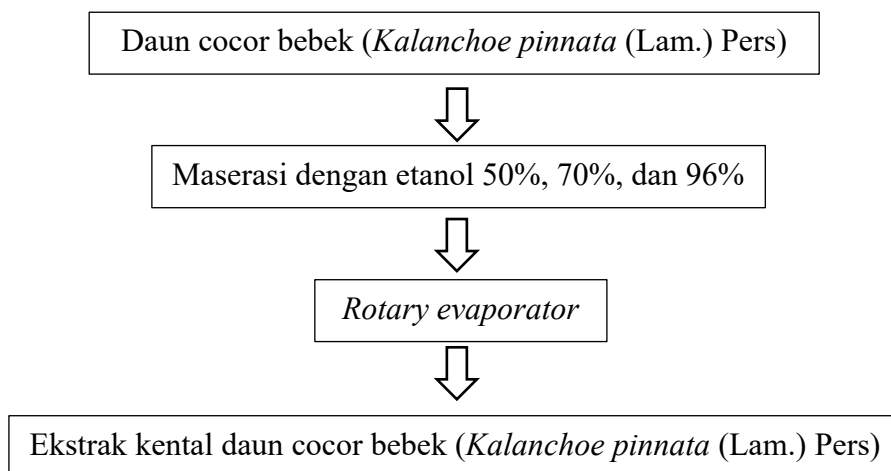
$$\frac{\text{panjang usus yang dilalui marker}}{\text{panjang usus keseluruhan}} \times 100 \%$$

E. Analisis Hasil

Dari hasil pengujian yang diperoleh dari penelitian pengamatan terhadap 6 kelompok perlakuan terhadap tikus putih jantan dari data metode transit intestinal yang dianalisa secara statistik menggunakan perangkat lunak SPSS for Windows menggunakan uji normalitas dan homogenitas data terlebih dahulu. Data yang telah didistribusi normal dan variasi antar sampel homogen, dianalisa dengan metode One Way Anova (Anova Satu Arah) dengan taraf kepercayaan 96% dan apabila menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dilanjutkan uji Post Hoc Tukey.

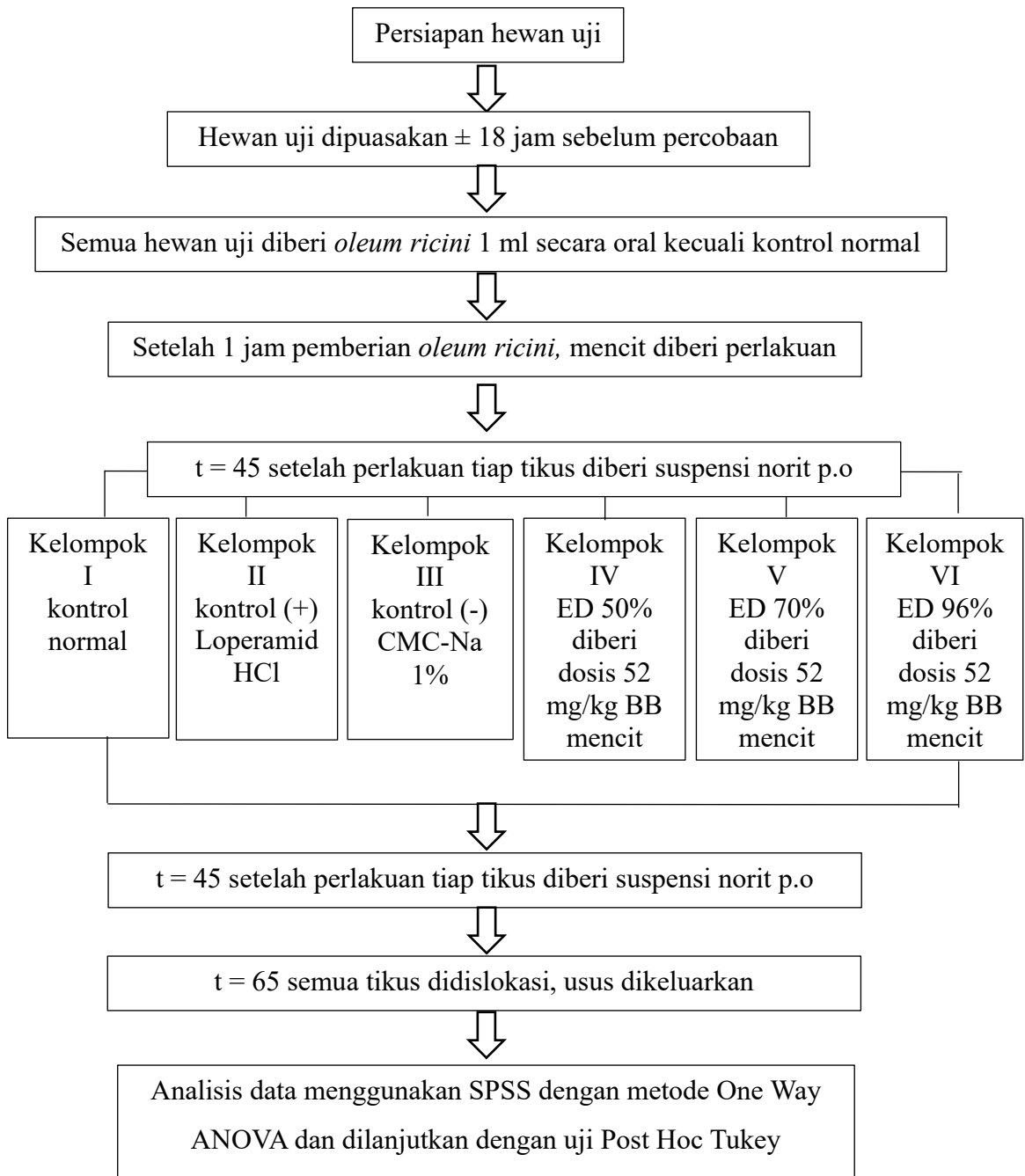
F. Skema Penelitian

1. Prosedur uji ekstraksi



Gambar 3. Prosedur uji ekstraksi

2. Prosedur uji antidiare



Gambar 4. Prosedur uji antidiare