

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah tanaman bunga telang (*Clitoria ternatea* L) yang berasal dari Kebun Telang Barokah, Grasa, Duren, Kecamatan Jogorogo, Kabupaten Ngawi, Jawa Timur.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun telang yang berwarna hijau segar.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang pertama dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak daun telang (*Clitoria ternatea* L).

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah efektivitas antidiare daun telang (*Clitoria ternatea* L).

Variabel utama yang ketiga dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel bebas adalah variabel utama yang dibuat bervariasi untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi dosis ekstrak daun telang (*Clitoria ternatea* L).

Variabel tergantung adalah variabel akibat dari variabel utama yang menjadi titik permasalahannya dalam penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efektivitas daun telang (*Clitoria ternatea* L).

Variabel terkendali adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung selain variabel bebas, tetapi dapat dikendalikan atau dikontrol kualifikasi sehingga hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulangi dalam penelitian lain dengan tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan umur 2-3 bulan dengan berat lebih kurang 30 gram.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun telang adalah daun hijau segar dari tanaman telang yang diambil dari Kebun Telang Barokah, Grasa, Duren, Kecamatan Jogorogo, Kabupaten Ngawi, Jawa Timur.

Kedua, estrak etanol daun telang adalah hasil ekstraksi daun telang dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode maserasi.

Ketiga, hewan uji dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan yang berumur 2-3 bulan yang dipelihara untuk dipakai sebagai hewan uji.

Keempat, loperamid adalah tablet lopamid yang diproduksi oleh PT. Laboratorium Harsen.

Kelima, konsentrasi adalah ukuran yang menggambarkan banyaknya zat di dalam suatu campuran dibagi dengan volume total campuran tersebut.

Keenam, frekuensi diare dapat dihitung dengan cara menghitung berapa kali terjadi diare selama pengamatan.

Ketujuh, bobot feses didapat dari penimbangan feses diare dikurangi kertas timbang.

Kedelapan, durasi diare dapat dihitung dari lama terjadi diare dikurangi waktu awal terjadi diare.

Kesembilan, dosis efektif adalah dosis terkecil yang memiliki aktivitas sebanding dengan kontrol positif.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah corong pisah, eksikator, gelas ukur 10 mL, gelas ukur 100 mL, kain putih, kandang mencit, lap halus, lumping, neraca analitik, oven, pipet tetes, sendok tanduk, silika gel, spatel, spoit 1 mL, toples, pengayak no. 60, dan wadah.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun telang (*Clitoria ternatea* L), akuades, loperamid sebagai pembanding, etanol 96%, Na-CMC 0,5%, dan *Oleum ricini*.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman perlu dilakukan untuk menetapkan kebenaran sampel yang digunakan. Determinasi didasarkan pada ciri-ciri morfologi dan jenis kedudukan tanaman dalam sistem klasifikasi tanaman. Determinasi tanaman dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Ethical Clearance

Ethical clearance (EC) atau kelayakan etik adalah keterangan tertulis yang diberikan oleh Komisi Etik Penelitian untuk riset yang melibatkan makhluk hidup yang menyatakan bahwa suatu proposal riset layak dilaksanakan setelah memenuhi persyaratan tertentu yang dilakukan di RSUD Dr. Moewardi.

3. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel daun telang yang digunakan adalah daun yang masih berwarna hijau segar diperoleh dari Kebun Telang Barokah, Grasa, Duren, Kecamatan Jogorogo, Kabupaten Ngawi, Jawa Timur.

4. Pembuatan Serbuk Daun Telang

Daun telang hijau segar digunakan karena memiliki katekin yang lebih tinggi dan lebih murah daripada daun telang sudah jadi. Setelah dibersihkan dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel, daun telang ditimbang untuk mengukur beratnya sebelum dimasukkan ke dalam oven, yang dipanaskan pada suhu 50°C. Tujuan pengeringan daun telang adalah untuk menghilangkan air padanya agar mikroorganisme tidak dapat menumbuhkannya dan untuk menghentikan aktivitas enim, yang dapat mengurangi kadar zat akrilik. Setelah daun telang sudah kering, mereka digiling untuk menjadi serbuk dan diayak dengan pengayak no. 60 untuk menghasilkan serbuk dengan tingkat kehalusan yang sama.

5. Ekstraksi sampel

Memasukkan 500 gram serbuk simplisia daun telang ke dalam wadah maserasi, pelarut etanol 96% ditambahkan sampai terendam sepenuhnya (± 2 cm di atas permukaan sampel). Disimpan di tempat yang tidak terpapar sinar matahari langsung dan sesekali dicampur dengan etanol. Setelah disaring satu kali selama dua puluh empat jam, filtrat dan ampas dipisahkan. Kemudian, dengan cara yang sama, ampas diekstraksi kembali dengan pelarut etanol 96% tiga kali. Kemudian, filtrat dimasukkan ke dalam rotavapor dan diuapkan hingga diperoleh ekstrak etanol yang kental. Kemudian, air ditambahkan ke dalam ekstrak dan diuapkan hingga ekstrak bebas etanol. Dengan menggunakan neraca analitik, ekstrak yang diperoleh ditimbang.

6. Uji Kandungan Kimia (Depkes RI, 1995)

6.1 Alkaloid. Ekstrak etanol daun telang ditimbang sebanyak 0,1 gram ditambahkan dengan 5 mL kloroform dan 5 tetes amoniak.

Lapisan kloroform diambil dan ditambahkan dengan 15 mL H_2SO_4 2N. Lapisan H_2SO_4 diambil dan dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi, tabung pertama ditambahkan dengan pereaksi Dragendorff, tabung kedua ditambahkan dengan pereaksi Mayer, dan tabung ketiga ditambahkan dengan pereaksi Wagner. Hasil positif alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan merah dengan penambahan pereaksi Dragendorff, terbentuknya endapan putih dengan penambahan pereaksi Mayer, dan terbentuknya endapan putih dengan penambahan pereaksi Wagner.

6.2 Flavonoid. Ekstrak etanol daun telang ditimbang sebanyak 0,1 gram ditambahkan 5 mL metanol dan dipanaskan pada suhu 50°C , kemudian disaring untuk mendapatkan filtrat. Filtrat kemudian ditambahkan H_2SO_4 pekat, hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau kuning.

6.3 Steroid. Ekstrak etanol daun telang ditimbang sebanyak 0,1 gram ditambahkan dengan 5 mL etanol 80% kemudian dipanaskan pada penangas air selama 2 menit. Filtrat disaring ketika masih panas dan diuapkan sampai kering pada penangas air. Filtrat yang sudah kering ditetesi dengan CHCl_3 diambil dan dipindahkan ke plat, kemudian ditetesi dengan pereaksi Lieberman-Burchard (3 tetes asam asetat anhidrat dan 2-3 tetes H_2SO_4 pekat). Hasil positif steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau atau biru.

6.4 Saponin. Ekstrak etanol daun telang ditimbang sebanyak 0,05 gram ditambahkan 10 mL air panas kemudian dikocok selama 10 detik dengan kuat. Hasil positif saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa/buih setinggi 1-10 cm, dan busi/buah tidak menghilang Ketika ditambahkan dengan asam klorida 2N.

6.5 Tanin. Ekstrak etanol daun telang ditimbang sebanyak 0,05 gram ditambahkan 10 mL air panas, kemudian ditambahkan dengan FeCl_3 . Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru atau hijau kehitaman.

7. Pembuatan larutan koloidal Na-CMC 0,5%

Sebanyak 100 mL akuades dipanaskan pada suhu 70° C dimasukkan Na-CMC sebanyak 1 gram sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan pengaduk elektrik hingga terbentuk larutan koloid yang homogen.

8. Pembuatan suspensi Loperamid HCl

Suspensi loperamid dibuat dengan menggerus di dalam lumpang tablet loperamid dosis 2 mg/tablet sebanyak 10 tablet. Kemudian ditimbang serbuk loperamid sebanyak 7,5 mg, kemudian ditambahkan 100 mL larutan koloidal Na-CMC 0,5% sedikit lalu digerus hingga homogen.

9. Pembuatan suspensi ekstrak etanol daun telang

Suspensi ekstrak dibuat masing-masing 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB. Untuk membuat suspensi ekstrak etanol 100 mg/kgBB yaitu dengan cara ditimbang ekstrak sebanyak 7,5 mg kemudian dilarutkan dengan 100 mL larutan koloidal Na-CMC 0,5% b/c sedikit lalu digerus hingga homogen.

Untuk membuat suspensi ekstrak etanol 200 mg/kgBB yaitu dengan cara ditimbang ekstrak sebanyak 30 mg kemudian dilarutkan dengan 100 mL larutan koloidal Na-CMC 0,5% sedikit lalu digerus hingga homogen. Adapun untuk membuat suspensi ekstrak etanol 400 mg/kgBB yaitu dengan cara ditimbang ekstrak sebanyak 60 mg kemudian dilarutkan larutan koloidal Na-CMC 0,5% sedikit lalu digerus.

10. Penetapan Dosis Loperamid

Loperamid digunakan sebagai kontrol positif. Faktor konversi manusia ke mencit seberat 20 g = 0,0026. Dosis loperamid pada manusia yaitu 8 mg kemudian dikonversikan ke mencit. Konversi manusia ke mencit menjadi $8 \text{ mg} \times 0,0026$ sehingga diperoleh hasil 0,0208 mg/20 gBB mencit. Loperamid tidak larut air maka sediaan dibuat suspensi sebesar 0,02%. Prosedur pembuatan suspensi loperamid yaitu menggerus 10 tablet loperamid (2 mg/tablet) dibuat suspensi dengan cara menambah suspensi Na-CMC 0,5% sedikit demi sedikit hingga serbuk loperamid homogen.

11. Penetapan Dosis Daun Telang

Dosis pemberian ekstrak dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok 3, 4, dan 5. Dengan masing-masing dosis 100; 200; 400 mg/kg BB mencit. Ekstrak kental dibuat sediaan suspensi dengan cara menambahkan Na-CMC 0,5% dalam mortar kemudian ditambah aquadest digerus hingga terbentuk mucilage. Kemudian ditambah ekstrak kental diaduk hingga tercampur dan masukkan ke dalam botol yang telah dikalibrasi dengan ditambah Na-CMC 0,5% sampai 100 mL.

E. Penyiapan Hewan Uji

1. Pemilihan Hewan Uji

Untuk penelitian ini, digunakan mencit (*Mus musculus*) yang dewasa dan sehat dengan berat rata-rata 30 g.

2. Penyiapan Hewan Uji

Sebanyak 25 mencit digunakan dalam penelitian ini, dan mereka dibagi menjadi lima kelompok percobaan. Kelompok 1 sebagai kontrol negatif, kelompok 2 sebagai pembanding, dan kelompok 3, 4, dan 5 sebagai perlakuan.

F. Perlakuan Terhadap Hewan Uji

Parameter yang digunakan adalah waktu dimulainya diare, berat feses, lama diare, dan frekuensi. Digunakan konsentrasi 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB untuk membandingkan suspensi Loperamid HCl dan untuk mengontrol suspensi Na-CMC 0,5%.

Urutan perlakuan antara lain sebagai berikut, mencit diadaptasi dengan lingkungan penelitian selama 1 minggu; satu jam sebelum penelitian mencit dipuaskan; selanjutnya dikelompokkan menjadi 5 kelompok masing-masing 5 ekor; setelah dipuaskan, semua mencit diberikan *Oleum ricini* 0,75 mL secara oral lalu diamati awal mulai terjadi diare, satu jam setelah pemberian perlakuan, masing-masing kelompok diberi perlakuan, yaitu kelompok I diberi suspensi Na-CMC 0,5% sebagai kontrol, kelompok II diberikan suspensi Loperamid sebagai pembanding, kelompok III diberikan suspensi ekstrak etanol daun telang dosis 100 mg/kg BB, kelompok IV diberikan suspensi ekstrak etanol daun telang dosis 200 mg/kg BB, dan kelompok V diberikan suspensi ekstrak etanol daun telang dosis 400 mg/kg BB; semua perlakuan diberikan secara oral, kemudian diamati bobot feses, frekuensi fese, dan lama terjadinya diare tiap 30 menit selama 4 jam.

Pengamatan parameter dapat dilakukan dengan cara mengamati diare yang ditandai dengan buang air besar dimana frekuensinya meningkat dari keadaan normal dan konsistensi feses yang lebih lembek atau cair. Cara mengetahui lama terjadinya diare dengan cara mencatat selisih waktu terakhir terjadinya diare (dalam menit) dengan waktu mula-mula terjadinya diare. Berat feses, caranya dengan menimbang berat feses (dalam gram) setiap 30 menit selama 4 jam. Kemudian cara menghitung frekuensi diare dengan cara menghitung berapa kali terjadi diare selama pengamatan.

G. Analisis Data

Hasil uji aktivitas antidiare ekstrak etanol daun telang yang diperoleh di analisis menggunakan uji *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) versi 26. Data hasil uji percobaan akan dikumpulkan dan dilakukan pengujian normalitas dan homogenitas apakah data terdistribusi normal atau tidak dan apakah data tersebut homogen atau tidak. Pengujian data uji normalitas menggunakan uji *Shapiro wilk*. Data yang terdistribusi normal dan homogen dilanjutkan di analisis dengan menggunakan uji *One way* ANOVA, namun jika tidak terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis* (Hartati *et al.*, 2013).