

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Populasi dan sampel**

#### **1. Populasi**

Populasi adalah objek yang dijadikan tujuan penelitian populasi yang digunakan pada penelitian ini yaitu buah kurma lulu yang diperoleh dari daerah Blitar, Jawa Timur

#### **2. Sampel**

Sampel adalah suatu bagian kecil dari populasi yang diambil untuk penelitian. Sampel yang digunakan adalah buah kurma lulu, bagian yang diambil adalah daging buah kurma.

### **B. Variabel penelitian**

#### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian pertama, ekstrak dan fraksi etanol 96 % diikuti dengan fraksi n-heksana, etil asetat, dan air dari buah kurma lulu.

Variabel utama dalam penelitian kedua adalah aktivitas tonikum ekstrak dan fraksi n-heksana, etil asetat, dan air dari buah kurma lulu bertindak terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus*) Penelitian ini dilakukan dengan metode rotarod.

#### **2. Klasifikasi variabel utama**

Jenis variabel utama: variabel bebas, variabel terikat, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas dari penelitian ini adalah variasi dosis ekstrak buah kurma lulu, dosis fraksi n-heksana, etil asetat, dan air daun buah kurma lulu

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi atau dipengaruhi oleh variabel bebas (Sugiyono, 2018). Variabel tergantung diakibatkan oleh variabel utama, dimana berpusat pada permasalahan yang termasuk dalam kriteria penelitian ini. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah aktivitas tonikum dari ekstrak buah kurma lulu, fraksi n-heksana, etil asetat dan air dari buah kurma lulu terhadap mencit jantan mencakup selisih dari waktu lelah mencit bertahan di batang rotarod sebelum perlakuan dan setelah perlakuan.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang dianggap berpengaruh berbeda dengan variabel bebas. Variabel terkontrol dalam

penelitian ini adalah unmur mencit (2-3 bulan), kondisi mencit yang baik dengan bobot (20-30 gr). jenis kelamin (jantan), lingkungan, kondisi kandang, kondisi alat uji rotarod seta prosedur pembuatan ekstrak.

### **3. Definisi oprasional variabel utama**

Pertama buah kurma lulu dipilih dalam kondisi yang baik bebas dari penyakit, masih segar dengan warna coklat kehitaman dan bebas dari kotoran didapatkan dari daerah surakarta, Jawa tengah pada bulan Januari 2025

Kedua serbuk buah kurma lulu adalah serbuk yang didapatkan dari proses pengambilan mencuci, kemudian di keringkan dengan cara diangin- anginkan dan menggunakan bantuan oven dengan suhu 50° C, berikutnya simplisia buah kurma lulu yang telah kering dihaluskan menggunakan blender, selanjutnya pengayakan menggunakan ayakan no. 40.

Ketiga ekstrak buah kurma lulu adalah hasil ekstraksi serbuk buah kurma lulu dengan campuran pelarut etanol 96 % dengan metode meserasi

Keempat fraksi n-heksana adalah fraksi dari ekstrak buah kurma lulu yang

difraksinasi dengan pelarut n-heksana sebagaai pelarut non polar dengan campuran pelarut etanol 96% dengan metode meserasi

Keempat fraksi n-heksana adalah fraksi dari ekstrak buah kurma lulu yang diftaksinasi dengan pelarut n-heksana sebagaai pelarut non polar

Kelima fraksi etil asetat adalah fraksi dari ekstrak buah kurma lulu yang difraksinasi dengan pelarut etil asetat sebagaai pelarut semi polar

Keenam fraksi air adalah residu fraksi etil asetat dari ekstrak buahh kurma lulu diuapkan dengan waterbath

Ketujuh uji rotarod adalah metode skrining farmakologi yang dilakukan untuk mengetahui lama waktu ketahanan mencit diatas batang rotarod sebelum dan sesudah pemberian larutan uji.

Kedelapan fraksi yang paling efektif adalah fraksi yang memberikan aktivitas yang sebanding dengan kontrol positif.

### **C. Alat dan Bahan**

#### **1. Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini berupa timbangan, blender, timbangan analitik, bejana maserasi, batang pengaduk kaca, timbangan, oven, rotary evaporator, beaker, tabung reaksi, labu erlenmeyer, gelas ukur, penangas air, gelas krusibel, cawan penguap, desikatser, gelas perkamen, kertas saring, corong kaca, spuit injeksi dengan jarum oral (ujung tumpul), alat rotarod, kolam dan pengayak no 40.

#### **2. Bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini berupa buah kurma lulu, pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%, n-heksana, aquadest, dan etil asetat, kontrol negatif menggunakan suspensi Na CMC 0,5%, kontrol positif menggunakan kafein, reagenmencit putih jantan, kafein, CMC-Na, reagen benedict, serbuk Mg, HCL pekat, amil alcohol, air, etil asetat, N-heksan hewan uji.

### **D. Jalannya Penelitian**

#### **1. Uji etik penelitian**

Pembuatan ethical clearance dilakukan di RSUD Dr. Moewardi, Surakarta. Pertama yang dilakukan yaitu mengisi formulir pendaftaran online. Mendatangi kontor forensik dan medicolegal RSUD Dr. Moewardi dengan menyerahkan bukti pendaftaran dan form yang telah diisi secara online, serta membawa proposal yang telah ditandatangani pembimbing. Melakukan pembayaran. EC akan diproses terlebih dahulu maksimal selama 14 hari. Pengambilan EC harus dilakukan secara mandiri disertai dengan bukti pengajuan yang telah ditandatangani oleh petugas

#### **2. Determinasi buah kurma lulu**

Tahapan pertama dalam penelitian ini adalah mengidentifikasi buah kurma lulu untuk memastikan keakuratan morfologi tanaman dalam literatur. Identifikasi buah dilakukan di Universitas Setia Budi, Surakarta, Jawa Tengah.

#### **3. Pengumpulan bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah buah kurma lulu yang segar, kondisi baik, berwarna coklat kehitaman dapat diperoleh dari kota Blitar kecamatan Karanggayam Jawa Timur buah kurma lulu yang digunakan beratnya berkisar antara 5,6 kg.

#### 4. Pengeringan bahan

Daging buah kurma lulu yang telah dikumpulkan dicuci dengan air untuk menghilangkan kotoran yang terdapat atau melekat pada simplisia, seperti kotoran, debu, dan pengotor lainnya yang menempel pada simplisia. Daging buah kurma lulu yang telah dicuci kemudian dipotong-potong dan dikeringkan dibawah sinar matahari diatas kain hitam lamanya berkisar antara 6 hari.

#### 5. Pembuatan serbuk

Daging buah kurma yang sudah kering diblender kemudian didapatkan bubuk simplisia lalu diayak serbuk buah kurma lulu simplisia dengan ukuran mesh 40, timbang dan simpan dalam wadah kering untuk mengetahui berat akhir simplisia.

#### 6. Pengujian susut pengeringan

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

#### 7. Pembuatan ekstrak buah kurma lulu

Pembuatan ekstrak dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi karena metode maserasi merupakan metode yang murah, sederhana, dan mudah untuk dilakukan. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia ke dalam cairan penyari yang cocok. Maserasi biasanya dilakukan dengan cara pada 10 bagian simplisia dengan kehalusan derajat yang sesuai dimasukkan ke dalam wadah digojok 1 jam selama 6 jam, kemudian 75 bagian larutan saring dituang. Setelah 18 jam, lalu diserkai dan diperas ampasnya. Selanjutnya, tambahkan cairan penyari secukupnya ke ampas dan aduk hingga rata sehingga diperoleh sari total 100 bagian (FHI 2017).

Ekstraksi ini menggunakan metode maserasi dan menggunakan pelarut etanol 96%. Maserasi merupakan proses ekstraksi simplisia berbasis pelarut. Pengulangan dalam pengocokan atau pengadukan dilakukan di suhu kamar. Secara teknis, melibatkan ekstraksi menggunakan prinsip metode untuk mencapai konsentrasi kesetimbangan. Maserasi berarti pengadukan secara konstan. Rendam simplisia buah kurma lulu 500 gr dengan etanol 96% sebanyak 7500 ml (Fati *et al*, 2018).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (gr)} \times 100\%}{\text{Bobot serbuk kering sebelum diekstrak}}$$

## 8. Pembuatan fraksi dari ekstrak buah kurma lulu

Proses dilakukan melalui teknik ekstraksi cair-cair. Pertama, 10 gr serbuk buah kurma lulu dilarutkan dengan etanol 96 % dalam 10 mL ditimbang, 65 mL aquadest dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan 75 mL n-heksana. Kemudian, fase n-heksana diuapkan dengan evaporator pada suhu 40°C dan fraksi yang dihasilkan ditimbang. Fraksi air dari n-heksana dimasukkan ke dalam corong pisah dengan ditambah 75 mL etil asetat. Kemudian, fase etil asetat ekstraksi cair-cair. Fase ini dipekatkan dengan evaporator pada suhu 40°C, dan fraksi yang dihasilkan ditimbang dan disebut sebagai fraksi etil asetat. Fraksi air yang diperoleh juga dipekatkan.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (gr)} \times 100\%}{\text{Bobot serbuk kering sebelum diekstrak}}$$

## 9. Identifikasi kandungan buah kurma lulu

**9.1 Glukosa** Tambahkan reagen benedict dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan sampel dihomogenkan dengan cara menggoyangkan tabung reaksi dan dipanaskan didalam shaker waterbath. Didiamkan selama 3 menit dan diamati perubahannya. Senyawa glukosa dan fruktosa ditandai warna kuning warna hijau, oranye, hingga merah yang artinya positif terhadap uji benedict. Bandingkan dengan perubahan warna dengan kontrol positif menggunakan baku glukosa

**9.2 Fruktosa** Tambahkan reagen benedict dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan sampel dihomogenkan dengan cara menggoyangkan tabung reaksi dan dipanaskan didalam shaker waterbath. Didiamkan selama 3 menit dan diamati perubahannya. Senyawa glukosa dan fruktosa ditandai warna kuning warna hijau, oranye, hingga merah yang artinya positif terhadap uji benedict. Bandingkan dengan perubahan warna dengan kontrol positif menggunakan baku glukosa.

**9.3 Flavonoid** timbang ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah serbuk Mg dan 10 tetes HCL pekat kemudian 1 ml amil alkohol dikocok kuat serta dibiarkan memisah. Flavonoid yang positif menghasilkan warna kuning, merah, atau jingga yang terdapat pada lapisan amil alkohol (Lidinilla, 2014). Bandingkan perubahan warna dengan kontrol positif menggunakan quersetin.

**9.4 Tanin** timbang ekstrak ditambah dengan 5 ml aquadest lalu dipanaskan di atas penangas air  $\pm$  5 menit dan direaksikan dengan larutan FeCl<sub>3</sub> terbentuk warna hijau kehitaman berarti positif adanya tanin.

Bandingkan perubahan warna dengan kontrol positif menggunakan asam galat.

**9.5 Triterpenoid** Siapkan ekstrak atau fraksi yang ingin diuji. Tambahkan beberapa tetes asam asetat anhidrat, lalu tambahkan 1-2 tetes asam sulfat pekat ( $H_2SO_4$ ) secara perlahan di dinding tabung (tanpa dikocok). Amati perubahan warna merah, ungu, biru, atau hijau menunjukkan adanya triterpenoid. Bandingkan perubahan warna dengan kontrol positif menggunakan asam oleanolat atau  $\beta$ -amyrin yang diketahui positif triterpenoid.

## **10. Pembuatan larutan stok**

**10.1 CMC-Na 0,5%.** timbang 100 mg CMC Na dibuat dengan cara mensuspensikan 500 mg serbuk CMC Na ke sebanyak 100 ml dalam aquadest dan diaduk sampai homogen.

**10.2 Kafein.** Timbang 2 g Kafein digunakan sebagai kontrol positif. Pada penelitian Mafitri dan Parmadi (2018), dosis kafein yang dapat diberikan untuk mencit sebesar 12 mg/kgBB. Konsentrasi larutan kafein sebesar 2%. Pembuatan larutan dilakukan dengan cara mensuspensikan 2 g serbuk kafein ke dalam larutan CMC Na 0,5% hingga 100 ml, lalu diaduk ad homogen.

**10.3 Larutan ekstrak.** Ekstrak ditimbang 100 mg Larutan ekstrak buah kurma lulu dibuat dengan konsentrasi 0,5%. Pembuatan larutan ekstrak dilakukan dengan cara mensuspensikan 500 mg ekstrak buah kurma ke di suspensikan CMC Na 0,5% hingga 100 ml.

**10.4 Pembuatan larutan fraksi n-heksana.** Fraksi n-heksana ditimbang sebanyak 50 mg, kemudian disuspensikan dalam Na-CMC secara bertahap hingga homogen dengan volume sampai 100 mL sehingga memperoleh konsentrasi 0,1%.

**10.5 Pembuatan larutan fraksi etil-asetat.** Fraksi etil asetat ditimbang sebanyak 100 mg, kemudian disuspensikan dalam Na CMC secara bertahap hingga homogen dengan volume 100 mL hingga tanda batas.

**10.6 Pembuatan larutan fraksi air.** Fraksi air ditimbang sebanyak 50 mg kemudian disuspensikan dalam Na-CMC 0,5% secara bertahap hingga homogen dengan volume 100 mL sehingga memperoleh konsentrasi 1%.

## **11. Prosedur Pengujian**

Hewan uji yang digunakan berupa mencit putih jantan 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:

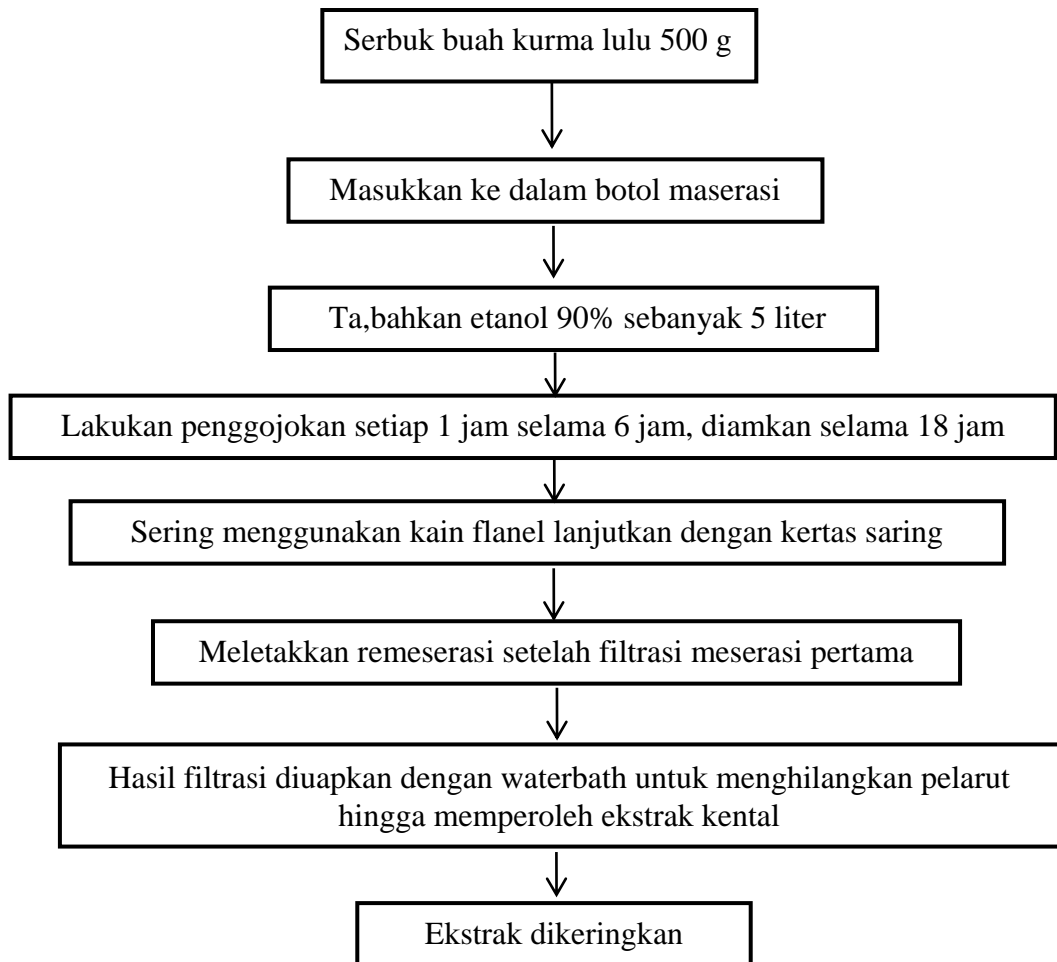
- Kelompok I : CMC Na 0,5% sebagai kontrol negatif
- Kelompok II : Kafein 600 mg/20kgBB mencit sebagai kontrol positif
- Kelompok III : Ekstrak buah kurma lulu dosis 11 mg/2KgBB
- Kelompok IV : Fraksi n-heksan dosis 3,3 mg/KgBB
- Kelompok V : Fraksi etil asetat dosis 2,2 mg/KgBB
- Kelompok VI : Fraksi air dosis 4,4 mg/KgBB

Masing-masing mencit diadaptasikan selama 7 hari kemudian diadaptasikan dengan alat *rotarod* selama 5 menit untuk di catat T0 sebelum perlakuan dan sesudah perlakuan pada hari pertama T1, pada hari kedua T2, pada hari ketiga T3. Hal ini dilakukan agar pada saat perlakuan jumlah jatuh mencit bukan karena belum terbiasa pada *rotarod* tetapi karena mencit lelah. Lalu dicatat belum lelah sebelum perlakuan. Setelah itu didiamkan selama 30 menit dengan tujuan agar larutan uji dimetabolisme, lalu dinaikkan kembali ke atas *rotarod* untuk mengambil data waktu lelah setelah diberi perlakuan. Waktu lelah pada mencit ditandai dengan jatuhnya mencit dari batang rotor dan mencatat pada waktu berapa mencit terjatuh dari batang *rotor*.

### **E. Analisis Data**

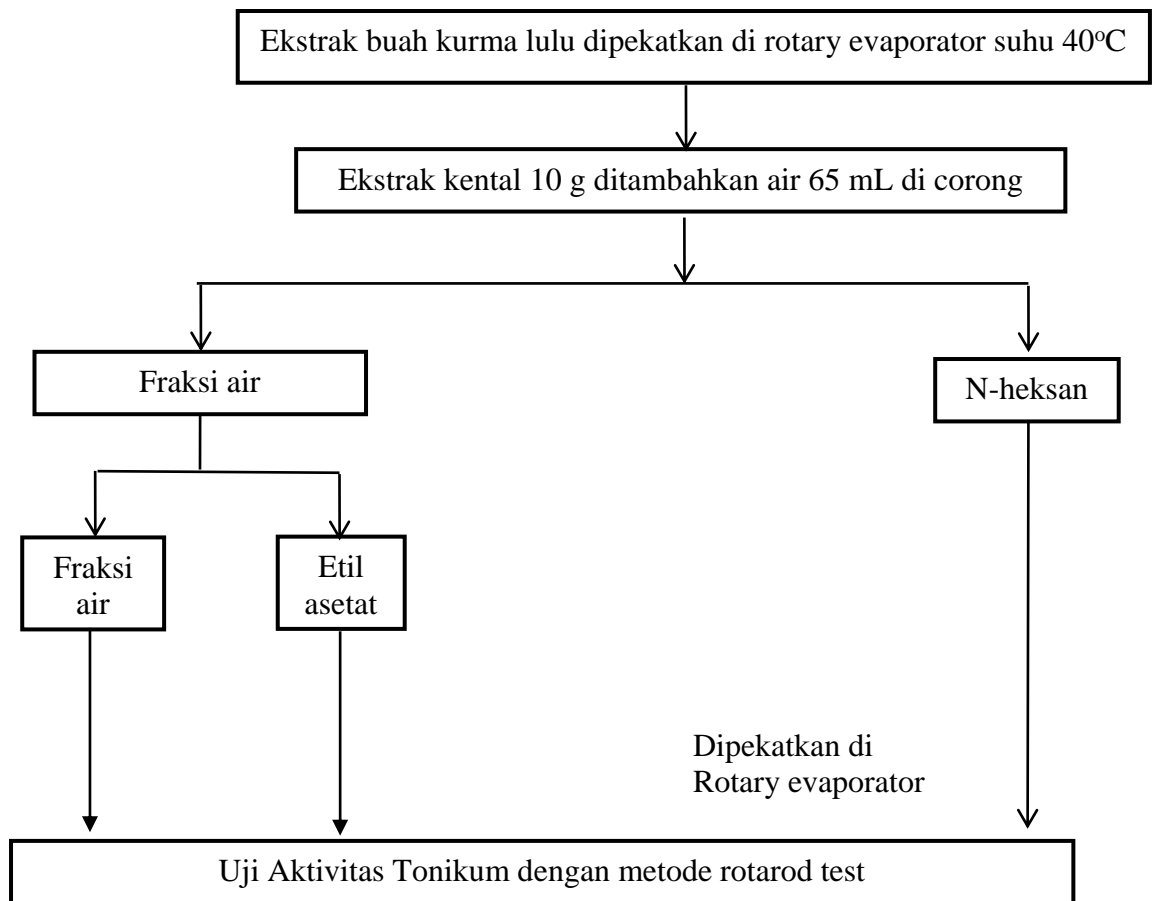
Analisis data yang diperoleh pada penelitian berupa data peningkatan daya tahan tubuh pada mencit putih (*Mus musculus*) jantan. Data analisis dengan menggunakan perangkat lunak SPSS. Data hasil pengukuran pada hari pertama T1, pada hari kedua T2, pada hari ketiga T3 dianalisis uji Shapiro-Wilk Test 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 e(Hariyati, 2018).

## 1. Alur Pembuatan Ekstrak



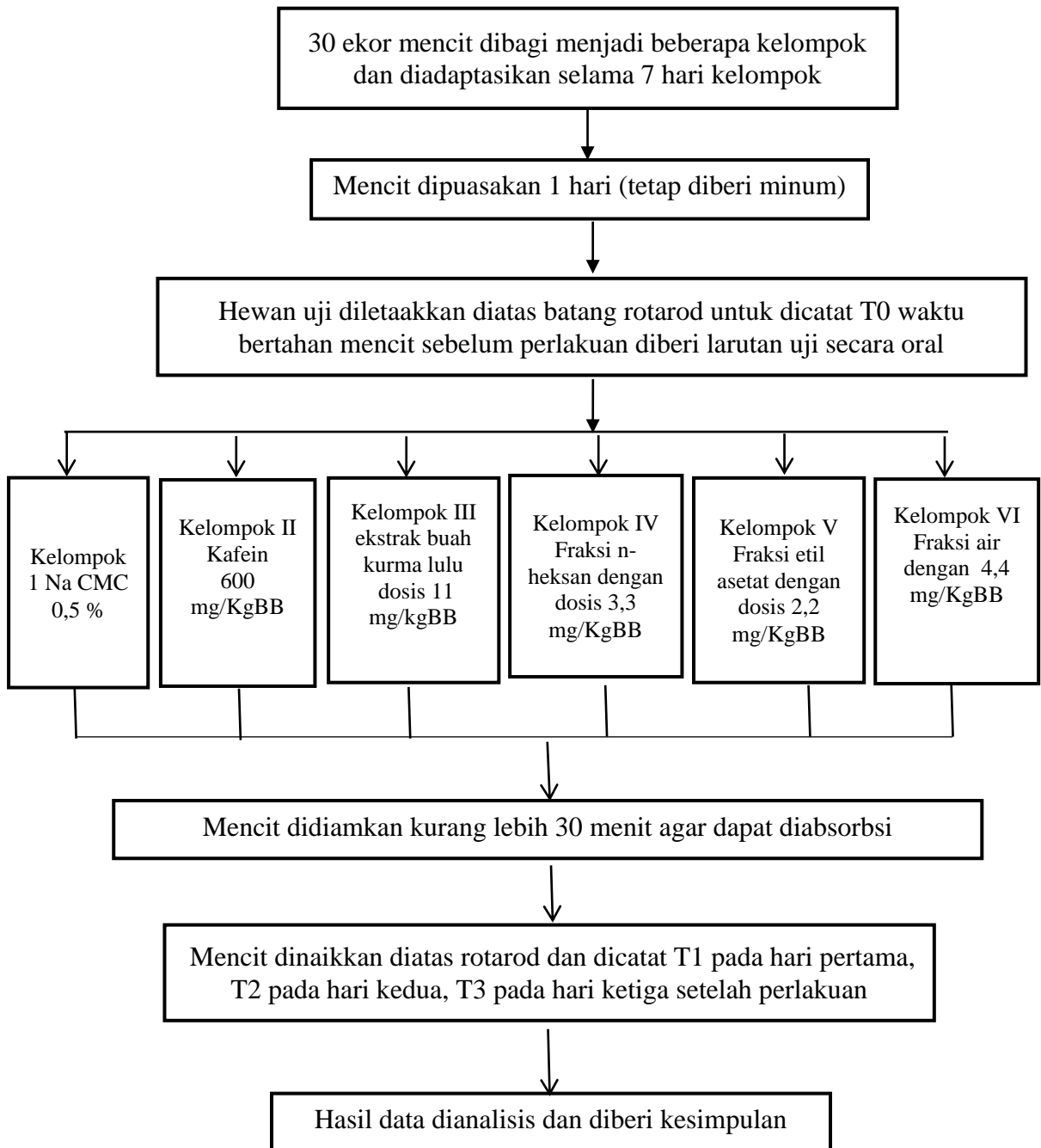
**Gambar 2. Alur Pembuatan Ekstrak**

## 2. Skema Fraksinasi



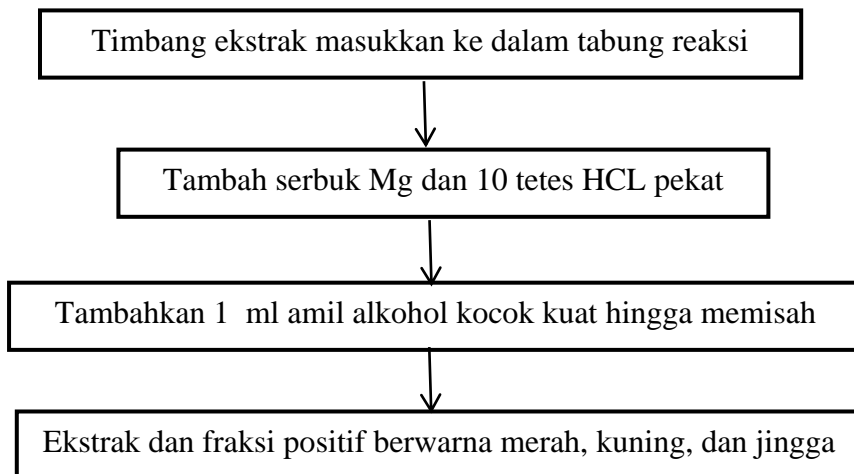
Gambar 3. Skema fraksinasi

### 3. Alur Penelitian



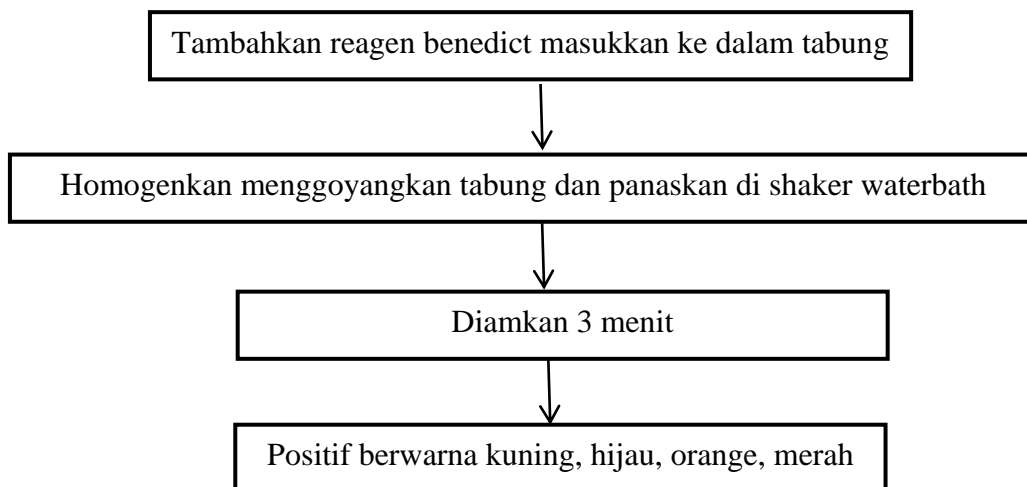
Gambar 4. Alur penelitian

#### 4. Uji fitokimia flavonoid



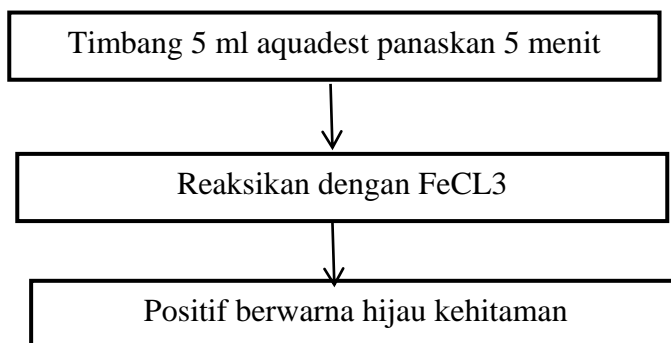
Gambar 5. Uji fitokimia flavonoid

#### 5. Uji fitokimia glukosa dan fruktosa



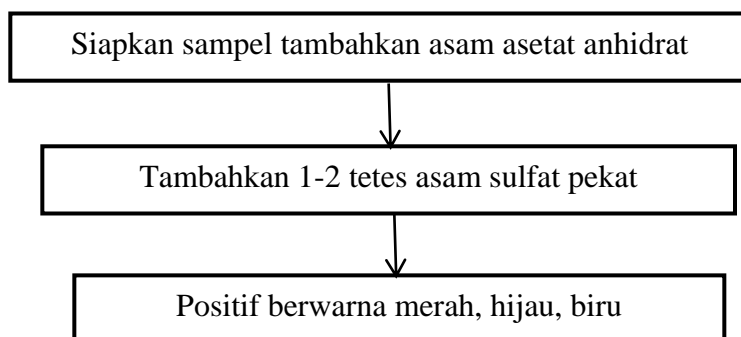
Gambar 6. Uji fitokimia glukosa dan fruktosa

## 6. Uji fitokimia tanin



**Gambar 7. Uji fitokimia tanin**

## 7. Uji fitokimia triterpenoid



**Gambar 8. Uji fitokimia triterpenoid**