

## **BAB 3**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan dari bulan Desember 2023 sampai Mei 2024 di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Farmakologi Farmasi, Program Studi Farmasi Program Sarjana Universitas Bhamada Slawi.

#### **3.2 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **3.2.1 Alat Penelitian**

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu oven (*Yenaco Drying Oven*), *rotary evaporator*, neraca analitik (*ohous*), *moisture Analyzer* (*ohous*), blender (*phillips*), Hotplat (*maspion*), aquarium, stemper dan mortir, toples kaca, stopwatch (*joyko*), tabung reaksi (*pyrex*), beaker glass (*pyrex*), gelas ukur (*pyrex*), gelas ukur (*pyrex*), kandang mencit dan tempat minum, rak tabung reaksi, cawan porselin, botol krus, batang pengaduk, pipet tetes, sonde, spuit 1 ml, pinset, pensil dan penggaris.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun seledri (*Apium graveolens* L.), kulit buah lemon (*Citrus limon* L.), etanol 70%, alumunium foil, kain flanel, kertas label, kertas saring, sarung tangan lateks, caffein anhydrous powder merck, Na CMC 0,5 %, aquadest, serbuk magnesium,  $\text{FeCl}_3$  1%, HCl Pekat, HCl 2N, asam asetat

anhidrat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, asam sulfat encer, pereaksi mayer, Pereaksi wagner, pereaksi dragendroff, makanan hewan uji.

### **3.2.3 Hewan Percobaan**

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan mencit jantan putih berat usia 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram. Diadaptasikan (aklimatisasi) serta diberi makan dan minum selama 7 hari. Setelah 1 minggu mencit diadaptasi pada hari ke terakhir mencit dipuaskan terlebih dahulu selama 8 jam. Selama proses adaptasi dilakukan pengamatan kondisi umum serta dilakukan penimbangan berat badan setiap hari. Tujuan aklimatisasi yaitu agar hewan uji dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan (Fithria, Wulandari & Hidayari, 2018). Proses aklimatisasi dilakukan di Laboratorium Farmakologi Farmasi Program Studi Farmasi S-1 Universitas Bhamada Slawi.

## **3.3 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini dilakukan merupakan penelitian eksperimental menggunakan metode rancangan acak lengkap dengan pendekatan *Pretest-Posttest Control Group Design*, karena dilakukan pengukuran sebelum dan sesudah diberikan perlakuan dengan 5 perlakuan. Perlakuan yang diberikan yaitu 3 dosis berbeda kombinasi ekstrak etanol daun seledri dan kulit buah lemon dan 2 perlakuan sebagai kontrol yang diberikan melalui rute pemberian peroral.

### **3.3.1 Variabel bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini meliputi variasi dosis kombinasi ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens* L.) dan

kulit buah lemon (*Citrus limon* L.) terhadap mencit jantan putih (*Mus musculus*).

### **3.3.2 Variabel Terikat**

Variabel terikat pada penelitian ini meliputi hasil rata - rata lama waktu hewan uji bertahan saat uji renang, setelah diberi perlakuan dengan dosis kombinasi ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens* L. ) dan kulit buah lemon (*Citrus Limon* L.) berbeda setiap kelompok.

### **3.3.3 Variabel Terkontrol**

Variabel terkontrol pada penelitian ini meliputi BB mencit 20 - 30 gram, jenis kelamin mencit putih jantan, suhu air dalam akuarium 30<sup>0</sup>C, aquarium, pelarut ekstraksi etanol 70% dan rute pemberian peroral.

### **3.3.4 Determinasi Tanaman**

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Prodi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi. Determinasi tanaman dilakukan bertujuan untuk memastikan kebenaran tanaman yang nantinya akan digunakan dalam penelitian ini agar tidak terjadi kesalahan dalam proses pengolahan bahan.

### **3.3.5 Pengumpulan Sampel**

#### **1. Tanaman Daun Seledri**

Tanaman Daun Seledri diperoleh dari Desa Kedawung Kecamatan Bojong Kabupaten Tegal. Sebanyak 5000 gram daun seledri dibersihkan dari kotoran dan dicuci bersih, kemudian daun yang telah kering dioven untuk menghilangkan sisa kadar air

dalam suhu 45<sup>0</sup>C selama 3 jam. Daun kering dibuat serbuk dengan diblender dan dilakukan proses maserasi (Hesturini, Vadia & Sari, 2022).

## 2. Tanaman Kulit Buah Lemon

Tanaman kulit buah lemon diperoleh dari Desa Tuwel Kecamatan Bojong Kabupaten Tegal. Sebanyak 3 kg kulit buah lemon dicuci bersih dengan air bersih yang mengalir, kemudian kulit buah lemon dioven pada suhu 40<sup>0</sup>C. Kulit buah lemon yang benar - benar kering ditimbang dan dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk, kemudian diayak menggunakan ayakan (Paat, Fatimawali & Antasionasti, 2022).

### 3.3.6 Pembuatan Ekstraksi

#### 1. Ekstraksi Daun Seledri

Dimasukkan 300 gram serbuk simplisia daun seledri ke dalam bejana maserasi, ditambahkan 1500 ml pelarut etanol 70%. Direndam selama 3 hari di tempat yang terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk, setelah itu disaring dengan kain flanel kemudian dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali. Setelah itu, dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* (Hasnaeni, Wisdawati & Usman S, 2019). Kemudian rendemen ekstrak total dihitung dengan rumus % rendemen sebagai berikut:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Bobot Ekstrak Yang Didapat (g)}}{\text{Berat Sampel Yang Diekstrak}} \times 100\%$$

(Mangirang *et al.*, 2019).

## 2. Ekstraksi Kulit Buah Lemon

Sampel kering kulit buah lemon diekstraksi menggunakan etanol 70%. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi, yaitu sebanyak 400 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam sebuah bejana, masukan etanol 3 liter. Ditunggal dibiarkan selama 3 hari terlindung dari cahaya sambil diaduk sekali, kemudian hasil ekstraksi dilakukan penyaringan. Filtrat kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, hingga didapatkan ekstrak kental (Hasanah & Yulianti, 2018). Kemudian rendemen ekstrak total dihitung dengan rumus % rendemen sebagai berikut:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Bobot Ekstrak Yang Didapat (g)}}{\text{Berat Sampel Yang Diekstrak}} \times 100\%$$

(Mangirang *et al.*, 2019).

### 3.3.7 Standardisasi Ekstrak

#### 1. Uji Parameter Spesifik

Uji parameter spesifik dilakukan secara organoleptis yang melibatkan panca indra dengan mengamati warna, bentuk, bau dan rasa dari ekstrak etanol daun seledri dan kulit buah lemon (Depkes RI, 2000).

## 2. Uji Parameter Non Spesifik

Pada uji parameter non spesifik meliputi :

### a. Penetapan susut pengeringan

Sebanyak 1 gram ekstrak ditimbang dalam cawan yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105<sup>0</sup>C, selama 30 menit dan ditimbang. Ratakan dengan menggoyangkan hingga menjadi lapisan setebal (5-10 mm). Kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu penetapan hingga bobot tetap. Buka tutupnya, biarkan cawan dalam desikator hingga suhu kamar. Kemudian dicatat bobot tetap yang diperoleh (Depkes RI, 2000).

Persyaratan yang baik untuk susut pengeringan adalah kurang dari 10%, karena susut pengeringan juga mewakili kandungan air yang menguap (Maryam, Taebe & Toding, 2020). Berikut ini merupakan rumus yang dipergunakan dalam perhitungan persentase susut pengeringan suatu sampel (Depkes RI, 2000).

$$\text{Susut Pengeringan (\%)} = \frac{\text{Bobot awal (Cawan+Sampel)}}{\text{Bobot Akhir}} \times 100\%$$

### b. Penetapan kadar air

Uji penetapan kadar air dilakukan dengan cara menimbang 1 gram ekstrak etanol dari daun seledri dan kulit buah lemon, kemudian diletakan pada piring alumunium

*moisture analyzer* yang telah diatur pada suhu 105<sup>0</sup>C. Setelah itu, piring ditutup dan pemanas halogen secara otomatis menyala untuk memanaskan ekstrak hingga berat ekstrak menjadi konstan. Berat ekstrak yang sudah konstan dapat diketahui ketika lampu halogen pada *moisture analyzer* mati dan hasil penetapan kadar air muncul pada alat tersebut. Syarat kadar air yang baik tidak lebih dari 10 % (Pambudi *et al.*, 2021). Berikut ini merupakan rumus yang dipergunakan dalam perhitungan persentase penetapan kadar air suatu sampel (Depkes RI, 2000).

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{A}{B} \times 100\%$$

Keterangan :

A : Ekstrak sebelum pemanasan (gram)

B : Ekstrak setelah pemanasan (gram)

c. Penetapan kadar abu total

Sebanyak 1 gram ekstrak ditimbang dan dimasukkan dalam krus silikat yang sebelumnya telah dipijarkan dan ditimbang. Kemudian ekstrak dipijar dengan menggunakan tanur secara perlahan - lahan hingga arang habis. Kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang hingga bobot tetap (Depkes RI, 2000).

Menurut Kristianidi, Rozana & Junardi (2021) Berikut ini merupakan rumus yang digunakan dalam perhitungan persentase kadar abu total suatu sampel:

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{W1-W2}{w} \times 100\%$$

Keterangan :

W1: Bobot wadah + sampel sesudah pengabuan (gram)

W2: Bobot wadah kosong (gram)

W : Bobot sampel sebelum dilakukan pengabuan (gram)

d. Penetapan kadar abu tidak larut asam

Abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu total dididihkan dengan 25 ml asam sulfat encer selama 5 menit. Kemudian dikumpulkan bagian yang tidak larut asam. Kemudian disaring dengan kertas saring bebas abu dan residunya dibilas dengan air panas. Abu yang tersaring dan kertas saringnya dimasukkan kembali ke dalam krus silikat yang sama. Setelah itu, ekstrak dipijar dengan menggunakan tanur secara perlahan-lahan hingga bobot tetap dan ditimbang (Depkes RI, 2000). Berikut ini merupakan rumus yang dipergunakan dalam perhitungan persentase kadar abu larut asam suatu sampel (Depkes RI, 2000).

$$\text{kadar abu larut asam (\%)} = \frac{AI - (C \times 0,076) - Ao}{B} \times 100\%$$

Keterangan :

AI	=	Bobot Krus + Ekstrak Setelah Pemijaran
Ao	=	Bobot Krus Kosong
B	=	Bobot Sampel Awal
C	=	Bobot Kertas Saring
0,0076	=	Bobot Kertas Saring Bila Menjadi Abu

### 3.3.8 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dapat dilakukan melalui reaksi warna dengan menggunakan sejumlah reagen. Skrining fitokimia yang dilakukan meliputi pengujian fitokimia yang dilakukan meliputi pengujian flavonoid, alkaloid, saponin, steroid dan triterpenoid sebagai berikut :

#### 1. Identifikasi uji alkaloid

Masing - masing ekstrak sebanyak 0,5 gram dilarutkan dalam pelarut etanol kemudian hasil yang diperoleh disaring untuk mendapatkan filtratnya. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian masing masing 5 ml kemudian ditambahkan dengan 3 pereaksi (mayer, wagner, dragendrof). Pada penambahan pereaksi mayer, positif mengandung alkaloid jika membentuk endapan putih atau kuning. Pada penambahan pereaksi wagner positif mengandung alkaloid, jika terbentuk endapan coklat pada penambahan pereaksi Dragendrof mengandung alkaloid, jika terbentuk endapan jingga positif alkaloid apabila dua atau tiga bagian terdapat endapan yang dimaksud (Novriyanti, Putri & Rijai, 2022).

#### 2. Identifikasi uji flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan air panas, kemudian dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat

ditambahkan serbuk magnesium dan 1 ml HCl pekat. Kocok larutan dengan kuat. Maka jika hasilnya menunjukkan warna merah, kuning atau jingga, menunjukkan positif terdapat flavonoid dalam sampel tersebut (Surya & Luhurningtyas, 2021)

### 3. Identifikasi uji saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak yang dilarutkan setiap sampel dicampur dengan 10 ml air suling panas dan kemudian dilarutkan dan dipanaskan dalam penangas air. Selanjutnya, campuran tersebut dikocok secara kuat. Jika setelah dikocok tidak ada buih yang terbentuk, menunjukkan hasil negatif. Namun, jika buih tetap ada setelah diam selama 10 menit dan kemudian ditambahkan larutan HCl 2 N dan buih tersebut tidak menghilang, maka menunjukkan keberadaan saponin dalam sampel tersebut (Novriyanti, Putri & Rijai, 2022).

### 4. Identifikasi uji steroid atau triterpenoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun seledri dan kulit buah lemon ditambahkan 10 tetes asam asetat anhidrat dan 2 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Pekat. Larutan dikocok dan didiamkan selama beberapa menit. Jika hasil menunjukkan warna biru atau hijau maka positif mengandung steroid. Jika hasil menunjukkan warna ungu atau merah maka positif mengandung triterpenoid (Alviani *et al.*, 2022).

## 5. Identifikasi uji tanin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak yang dilarutkan dalam 5 ml ditambahkan dengan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  0,1%. Ekstrak yang mengandung tanin akan berwarna biru atau hijau kehitaman (Novriyanti, Putri & Rijai, 2022).

### 3.3.9 Pembuatan Larutan Ekstrak Aktivitas Uji Tonikum

#### 1. Penentuan Kontrol Negatif

Penentuan kontrol negatif dalam uji tonikum ini menggunakan Na CMC Sebagai kontrol negatif. Kemudian ditimbang sebanyak 0,5 gram Na CMC kemudian ditaburkan ke dalam mortir yang telah diisikan air panas sebanyak 20 kali bobot Na-CMC (10 ml ) dan didiamkan selama 15 menit. Selanjutnya diaduk hingga diperoleh mucilago (massa transparan berbentuk gel) dan diencerkan menggunakan sedikit air suling (10 ml ) dan aduk kembali hingga homogen, lalu dipindahkan ke *gelas ukur* atau *beaker glass* dan dicukupkan air hingga 100 ml atau hingga tanda batas (Sianipar *et al.*, 2018).

#### 2. Penentuan Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan dalam uji tonikum merupakan kafein yaitu 100 mg/KgBB. Masukkan ke dalam mortir dan ditambahkan suspensi Na CMC 0,5% sedikit demi sedikit sambil gerus hingga homogen, volume dicukupkan 10 ml (Sianipar *et al.*, 2018).

### 3. Penentuan Dosis Ekstraksi

Penentuan dosis yang digunakan dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dosis paling efektif yang digunakan dalam uji aktivitas tonikum. Perlakuan 1 yaitu dosis kombinasi ekstrak etanol daun seledri 100 mg/KgBB dan kulit buah lemon 40 mg, perlakuan 2 yaitu kombinasi ekstrak etanol daun seledri 200 mg/KgBB dan kulit buah lemon 40 mg, perlakuan 3 yaitu kombinasi ekstrak etanol daun seledri 400 mg/KgBB dan kulit buah lemon 40 mg. Kemudian dimasukkan ke dalam mortir serta ditambahkan 10 ml Na CMC 0,5 % sedikit demi sedikit berikutnya digerus hingga homogen, volume dicukupkan 10 ml (Sianipar *et al.*, 2018).

**Tabel 3.1 Dosis Uji Tonikum**

No.	Kelompok	Perlakuan
1.	Kontrol negatif	Na CMC 0,5%
2.	Kontrol positif	kafein 100 mg/KgBB
3.	Perlakuan 1	EEDS 100 mg/Kg BB kombinasi EEKBL 40 mg
4.	Perlakuan 2	EEDS 200 mg/Kg BB kombinasi EEKBL 40 mg
5.	Perlakuan 3	EEDS 400 mg/Kg BB kombinasi EEKBL 40 mg

Keterangan :

EEDS : Ekstrak etanol daun seledri

EEKBL : Ekstrak etanol kulit buah lemon

#### 3.3.10 Penentuan Aktivitas Tonikum

##### 1. Pengelompokan Hewan Uji

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini merupakan mencit putih jantan yang berusia 2-3 bulan, dengan

berat antara 20 - 30 gram sejumlah 20 ekor, kemudian dibagi secara acak lengkap ke dalam 5 kelompok perlakuan, dengan setiap kelompok terdiri dari 4 mencit. Penentuan jumlah hewan uji dalam setiap kelompok dilakukan dengan menggunakan rumus *Federer*, seperti yang dijelaskan oleh Indratama & Yenita (2019).

## **2. Uji Aktivitas Tonikum**

Hewan uji yang digunakan merupakan hewan mencit jantan sejumlah 20 ekor dan dikelompokkan menjadi 5 setiap kelompok berisi 4 ekor mencit, bobot mencit 20 - 30 gram. Mencit diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu, diberi makan dan kondisi kandang yang terawat agar tidak stress dan memicu gagalnya penelitian. Setelah 1 minggu mencit diadaptasi pada hari terakhir mencit dipuasakan terlebih dahulu selama 8 jam. Sebelum perlakuan mencit direnangkan terlebih dahulu dengan suhu 30<sup>0</sup>C dan dicatat waktu lelah. Timbulnya tanda kelelahan yaitu dengan tidak ada pergerakan dari kaki dan ekor hewan coba selama 7 detik, istirahatkan mencit selama 30 menit. Selanjutnya pada semua mencit diberi perlakuan secara peroral perlakuan kontrol negatif Na CMC 0,5%, kontrol positif yaitu kafein dan kombinasi ekstrak etanol daun seledri dan kulit buah lemon dengan pemberian kelompok perlakuan 1 yaitu kombinasi ekstrak etanol daun seledri 100 mg/KgBB dan kulit buah lemon 40 mg, perlakuan 2 yaitu kombinasi ekstrak etanol daun seledri 200 mg/KgBB dan kulit buah lemon 40 mg, perlakuan 3 yaitu

kombinasi ekstrak etanol daun seledri 400 mg/KgBB ekstrak dan kulit buah lemon 40 mg. Kemudian istirahatkan mencit selama 30 menit setelah pemberian larutan uji, setelah 30 menit direnangkan dan dicatat waktu lelahnya diukur ketahanan berenang (Hesturini, Vadia & Sari, 2022). Dihitung rata - rata waktu berenang kemudian hasil data diolah dengan metode *statistik one way anova* untuk mengetahui data sesudah pemberian dosis terhadap lama waktu berenang. Uji aktivitas tonikum kombinasi ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens* L.) kulit buah lemon (*Citrus limon* L.).

**Tabel 3.2 Kelompok Perlakuan Uji Tonikum**

No.	Kelompok	Hewan uji (ekor)	Perlakuan
1.	Kontrol negatif	4	Pemberian Na CMC 0,5%
2.	Kontrol positif	4	Pemberian kafein 100 mg/KgBB
3.	Perlakuan 1	4	Pemberian kombinasi EEDS 100 mg/Kg BB dan EEKBL 40 mg
4.	Perlakuan 2	4	Pemberian kombinasi EEDS 200 mg/Kg BB dan EEKBL 40 mg
5.	Perlakuan 3	4	Pemberian kombinasi EEDS 400 mg/Kg BB dan EEKBL 40 mg

Keterangan :

EEDS : Ekstrak etanol daun seledri

EEKBL : Ekstrak etanol kulit buah lemon

### **3.4 Analisa Data**

Analisa data dilakukan menggunakan uji *SPSS* untuk mengetahui apakah data yang didapat merupakan data yang akurat atau tidak. Data hasil perhitungan peningkatan efek tonikum dilanjut dengan uji normalitas dan uji *homogeneity* menggunakan uji *statistik One Way Anova* dan untuk mengetahui dosis paling efektif menggunakan uji Duncan.

