

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan dan Jenis Penelitian

Jenis penelitian adalah eksperimental dengan hewan uji mencit putih jantan galur balb-C, berumur 2-3 bulan serta berat badan 20-30 gram dengan metoda uji aktivitas antidiare menggunakan *castrol oil induced diarrhea*.

3.2 Sampel

Daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*) digunakan sebagai sample penelitian yang diperoleh di sekitar hutan Tangkahan Taman Nasional Gunung Leuser, Kabupaten Langkat, Sumatera Utara yang banyak di huni Suku Karo. Daun Cep-cepan dalam serbuk *simplisia* diekstraksi dan di fraksinasi kemudian dilakukan uji *skrining fitokimia*.

3.3 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut:

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan yaitu timbangan analitik, alat-alat gelas, *blender*, cawan penguap, batang pengaduk, spuit 1cc, *stopwatch*, *water bath*, *rotatory evaporator*, corong pisah, pipet, kandang hewan uji mencit, *sonde oral*.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah mencit jantan galur Balb-C sehat dengan berat badan 20 – 30 g, umur 2 – 3 bulan, daun cep-cepan, Etanol 70%, dan n-heksan (Brataco) untuk menyiapkan fraksi ekstrak etanol daun cep-cepan. Uji aktivitas antidiare menggunakan *castor oil* (*Sigma-Aldrich*), *loperamid* HCl (PT. Sanbe Farma).

3.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang dan Labolatorium Balito Bogor dari bulan Februari 2021 sampai Agustus 2021.

3.5 Prosedur Percobaan

Prosedur percobaan dilakukan untuk memaksimalkan hasil dan proses pengambilan data selama penelitian berlangsung. Adapun langkah-langkah prosedur percobaan sebagai berikut:

3.5.1 Penyiapan hewan uji

Mencit jantan galur Balb-C yang di aklimatisasikan selama 7 hari yang bertujuan untuk beradaptasi dengan kondisi laboratorium, diberi makan pelet dan air minum *ad libitum* (Steyleynes *et al.*, 2019).

3.5.2 Pembuatan simplia

Daun Cep-cepan dibersihkan menggunakan air mengalir sebanyak dua kali, kemudian dikeringkan dengan mesin oven pada suhu 40-50° atau jemur dibawah sinar matahari. Bahan yang sudah kering diblender dan di ayak hingga mendapat serbuk halus.

3.5.3 Pembuatan ekstrak etanol daun *C.costata*

Ekstraksi dingin diperoleh dengan merendam bubuk simplisia (500 g) dalam etanol 70% pada suhu kamar selama tiga hari. Pemisahan residu dan filtratnya dilakukan setiap satu hari. Ekstrak pekat yang diperoleh dikeringkan pada suhu 40°C sebelum digunakan untuk percobaan. Ekstrak yang telah kering kemudian dilarutkan dalam aquadest untuk pembuatan berbagai dosis. Kemudian ekstrak dilarutkan pada campuran etanol dan air perbandingan (1:3), setelah itu difraksinasi dengan praktisi cair-cair menggunakan etli asetat dan N-heksana masing-masing dilakukan 4 kali pengulangan sebanyak 150 mL (4 x 150 mL) menggunakan alat corong pisah dengan cara dikocok kuat berkali-kali secara searah untk mendapatkan hasil fraksi etil asetat, air dan fraksi N-heksana (Alkandahri *et al.*, 2019).

3.5.4 Pembuatan Larutan GOM 1%

Membuat 1% larutan gom arab dengan menimbang 1 g gom arab kemudian dicampur 100 mL aquadest lalu di panaskan menggunakan *hot plate* agar homogen, setelah itu didinginkan, sehingga perbandingan aquadest dan gom grab adalah 100 : 1 (Steyleynes *et al.*, 2019).

3.5.5 Uji Aktivitas Antidiare Daun *C.costata*

Aktivitas Antidiare dari Fraksi daun Cep-cepan kepada 32 mencit yang memenuhi kriteria inklusi dikelompokkan secara random ke dalam 8 kelompok perlakuan yang masing-masing kelompok terdapat 4 mencit:

- Kelompok 1 kontrol negatif yaitu mencit di beri minum saja.
- Kelompok 2 kontrol positif di beri Loperamid HCl Dosis untuk manusia = 2mg. Dikonversikan untuk mencit menjadi : $2 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,0052 \text{ mg} / 20 \text{ g} = 0,26 \text{ mg/kgBB}$.
- Kelompok 3 diberi fraksi air dosis 50mg.
- Kelompok 4 diberi fraksi air dosis 100mg.
- Kelompok 5 diberi fraksi n-Hexan 50mg.
- Kelompok 6 diberi Fraksi n-Hexan 100mg.
- Kelompok 7 diberi fraksi Etil asetat 50mg.
- Kelompok 8 diberi fraksi Etil asetat 100mg.

Setelah 30 menit, semua mencit diberikan 0.5 mL castrol iol per-oral kemudian letakan dikandang terpisah. Kemudian dilakukan pengamatan terhadap waktu mulai diare, waktu berhenti diare dan berat fase cair tidak terbentuk selama 6 jam. Rumus menghitung % efek anti diare menggunakan rumus sebagai berikut (Kalyani, dkk., 2010):

$$\% \text{ efek anti diare} = \frac{k - p}{k} \times 100\%$$

Keterangan:

P = berat fases cair dan tidak berbentuk pada mencit kelompok kontrol positif (loperamid) serta fraksi daun cep-cepan.

K = berat fases cair dan tidak berbentuk pada mencit kelompok kontrol negatif.

3.6 Skrining Fitokimia daun Cep-cepan

Ada beberapa tahapan proses skrining Fitokimia daun Cep-cepan dibawah ini:

3.6.1 Pemeriksaan Flavonoid

Pengecekan flavonoid dengan merefluks simplisia serta metanol dilanjutkan penyaringan, kemudian di encerkan menggunakan air, selanjutnya ditambah eter minyak tanah serta dikocok lalu diamkan, lapisan metanol dan uapkan pada suhu 40°. Fitratnya digunakan untuk uji flavonoid dengan diaupkan sampai kering, ditambah asam klorida pekat. Dalam 2-5 menit terjadi warna merah intensif menunjukkan bahwa adanya flavonoid (glikosida 3 flavonol).

3.6.2 Pemeriksaan Glikosida

Serbuk simplisia ditambah campuran etanol 96% dengan air (7:3) dan HCl 2 N sampai terendam, direfluks selama 1 jam, didinginkan dan disaring. Fitrat ditambahkan air suling dan timbaki (II) asetat 0.4 M diaduk dan di diamkan sampai endapan turun dan di saring dengan campuran kloroform dan isoppropanol (2:3) di dalam corong.

3.6.3 Pemeriksaan Glikosida Antrakuinon

Sedikit simplisia dimasukan kedalam erlenmeyer ditambah etanol sampai terendam, ditambah asam sulfat 2 N, dipanaskan kemudian di dinginkan, dimasukan ke dalam corong pisah ditambahkan 10 ml benzene, dikocok dan didiamkan. Lapisan NaOH berwarna merah (merah muda/merah) menandakan adanya glikosida antrakuinon (Salim *et al.*, 2017).

3.6.4 Pemeriksaan Steroida/Triterpenoida

Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 1 g dimaserasi dengan 20 ml n- heksana selama 2 jam, disaring. Apabila warna ungu atau merah berubah menjadi biru ungu atau biru hijau menandakan adanya steroida/triterpenoida (Salim *et al.*, 2017).

3.6.5 Pemeriksaan Saponin

Sebanyak 0,5 g serbuk simplisia dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 menit jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil tidak kurang dari 10 menit dan buih tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Salim *et al.*, 2017).

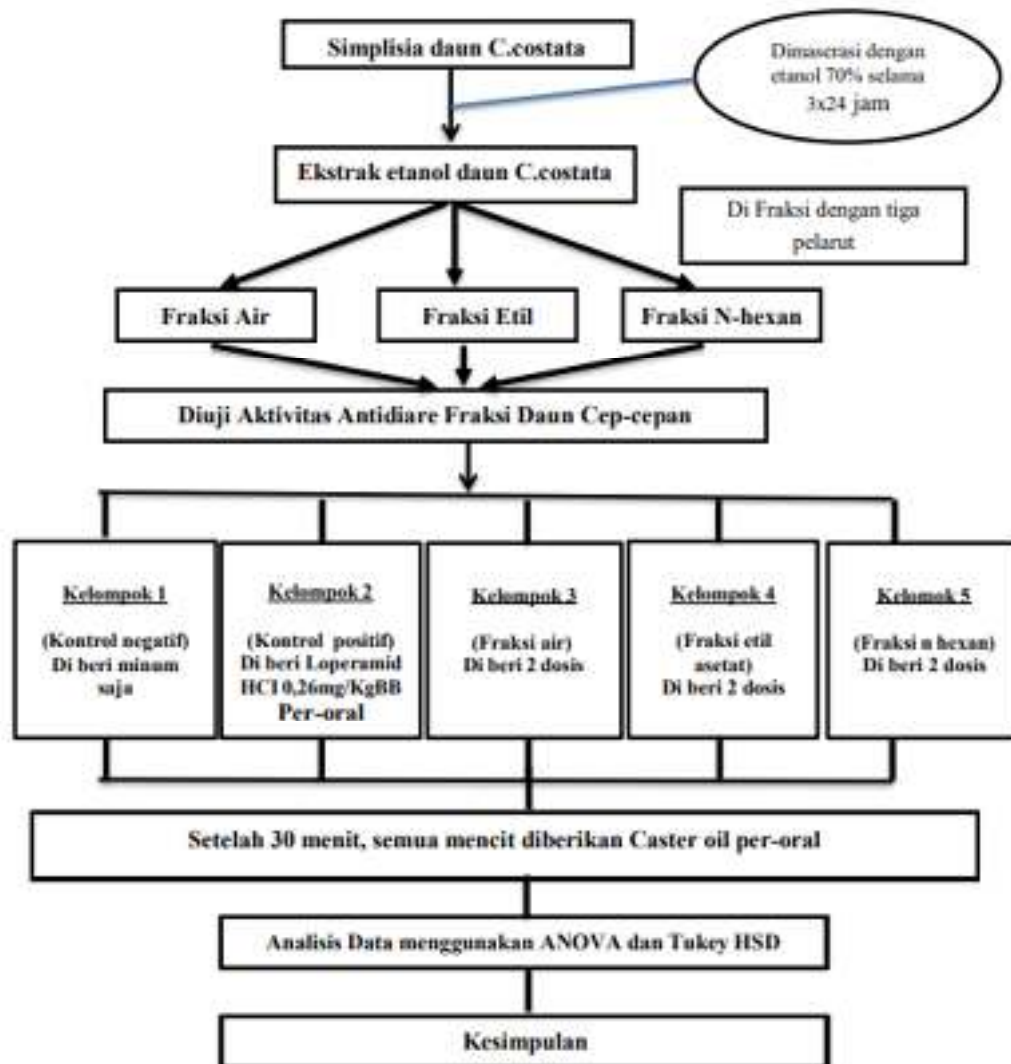
3.6.6 Pemeriksaan Tanin

Sebanyak 0,5 g serbuk simplisia disari dengan 10 ml air suling lalu disaring, filtratnya diencerkan air suling sampai tidak berwarna. Larutan diambil sebanyak 2 ml dan ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Jika terjadi warna biru , kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin



3.7 Skema Penelitian

Berikut merupakan skema penelitian yang dapat dilihat pada gambar 3.1 dibawah ini:



Gambar 3. 1 Skema Penelitian

3.8 Pemeriksaan Kadar Air

Dalam menentukan kadar air dilakukan dengan metode gravimetri secara tidak langsung dari bobot sampel yang di peroleh sebelum dan sesudah di panaskan menggunakan oven. Selama satu jam cawan porselen dipanaskan di dalam oven dan di dinginkan selama 15 menit dalam eksikator. Selama 3 jam Sebanyak 1,0 gram sampel dimasukan ke dalam cawan porselen dan dipanaskan 105°C menggunakan oven dan di dinginkan menggunakan eksikator selama 15 menit lalu di timbang.

Hasil kadar air yang diperoleh kemudian di ukur. Panaskan kembali sampel dalam oven 105°C selama satu jam. Selanjutnya didinginkan dalam eksikator selama 15 menit dan ditimbang. Hasil kadar air yang diperoleh kembali di ukur. Ulangi pemanasan selama 1 jam hingga diperoleh bobot yang konstan (yakni selisih hasil bobot pemanasan sampel pertama dan pemanasan selanjutnya $\geq 0,01$ gram) (AOAC, 2005).

3.9 Analisis Data

Analisa data disajikan secara deskriptif dengan menilai hasil pemeriksaan kadar Antidiare total pada hewan uji dengan kontrol normal, pasif, negatif, kelompok terapi fraksi air, etil asetat serta fraksi N-heksana. Analisa data menggunakan program SPSS dengan uji ANOVA dan Tukey guna melihat perubahan kadar antidiare sebelum serta sesudah perlakuan $p < 0.05$.

