

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun singkong (*Manihot utilissima*) yang diambil dari desa Wonorejo, Kecamatan Gondang, Kabupaten Sragen, Provinsi Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun singkong (*Manihot utilissima*) yang diambil secara acak dalam kondisi segar, tidak terkena hama, tidak busuk dan diperoleh dari Desa Wonorejo, Kecamatan Gondang, Kabupaten Sragen, Provinsi Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun singkong (*Manihot utilissima*) dan efek analgetik yang ditunjukkan sebagai respon geliat oleh mencit.

2. Klasifikasi variabel utama

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas adalah variabel utama yang direncanakan untuk diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak etanol daun singkong (*Manihot utilissima*).

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek analgetik yang ditunjukkan dengan jumlah respon geliat pada hewan uji (mencit).

2.3 Variabel kendali. Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kondisi fisik dari hewan uji yang meliputi berat badan, lingkungan, tempat hidup, jenis kelamin, dan galur.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun singkong (*Manihot utilissima*) adalah suatu daun yang diambil dari Desa Wonorejo, Kecamatan Gondang, Kabupaten Sragen, Provinsi Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak daun singkong yang didapat dari proses maserasi adalah sediaan cair yang dibuat dengan cara menyari simplisia dengan etanol 70% selama 3-5 hari.

Ketiga, efek analgetik ekstrak etanol 70% daun singkong (*Manihot utilissima*) adalah kemampuan yang dimiliki untuk mengurangi rasa nyeri dengan ditandai adanya penurunan jumlah geliat pada hewan uji yang telah diinduksikan asam asetat.

Keempat, asam asetat adalah suatu zat kimia yang digunakan untuk yang digunakan sebagai induktor nyeri yang diberikan dengan cara diinduksi melalui rongga perut (*Intra Peritoneal*).

Kelima, Na CMC (Carboxy Methyl Cellulose) adalah bahan kimia yang digunakan untuk mengemulsi aspirin dan sediaan uji sekaligus kontrol negatif.

Keenam, aspirin adalah obat yang digunakan sebagai pembanding sediaan uji.

Ketujuh, hewan uji yang digunakan adalah mencit putih jantan (*Mus musculus*) dengan berat sekitar 20-30 gram yang berumur 2-3 bulan.

Kedelapan, nyeri yang timbul pada mencit adalah berupa geliat atau respon yang ditandai dengan abdomen mencit menyentuh dasar tempat berpijak dan kedua pasang kaki ditarik ke belakang.

C. Bahan dan Alat

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu yang pertama untuk pembuatan simplisia meliputi timbangan, blender, oven, dan ayakan dengan mesh nomor 40. Peralatan untuk ekstraksi yaitu bejana maserasi, kain flanel, *rotary evaporator*, corong kaca. Peralatan yang digunakan untuk uji farmakologi yaitu batang pengaduk, Beaker glass, stopwatch, gelas ukur, sarung tangan, kandang

mencit, timbangan untuk mencit, neraca analitik, spuit injeksi dengan jarum oral (ujung tumpul).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun singkong yang diambil dari Desa Wonorejo, Kecamatan Gondang, Kabupaten Sragen, Provinsi Jawa Tengah. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol, aspirin, asam asetat, Na CMC, dan aquadest. Hewan uji yang digunakan adalah mencit putih jantan dengan berat antara 20-30 gram dan berumur sekitar 2-3 bulan, dan hewan uji tersebut diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

D. Jalannya Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Determinasi tanaman

Tahap awal dalam penelitian ini yaitu melakukan determinasi daun singkong terhadap kepastakaan untuk mengetahui kebenaran dan keakuratan sampel daun singkong yang digunakan dalam penelitian. Identifikasi dilakukan di Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Penyiapan bahan yang digunakan

2.1 Pengumpulan bahan baku. Daun singkong segar sebanyak 3 kg yang sudah melalui sortasi basah dan diambil pada Bulan Desember 2018

dari Desa Wonorejo, Kecamatan Gondang, Kabupaten Sragen, Provinsi Jawa Tengah.

2.2 Pembuatan serbuk simplisia. Pembuatan ekstrak sebelumnya yaitu, daun singkong yang telah dilakukan pengeringan dengan cara di oven 40° C lalu dilakukan sortasi kering terlebih dahulu lalu dilakukan penimbangan, kemudian dilakukan penyerbukan yang selanjutnya diayak dengan ayakan nomor 40, hasil serbuk yang diperoleh lalu ditimbang dan disimpan dalam wadah yang aman, kering, dan rapat.

3. Penetapan kelembaban serbuk daun singkong

Penetapan kelembaban serbuk daun singkong dilakukan dengan alat *moisture balance*. Menimbang serbuk daun singkong dahulu sebanyak 2 gram di dalam alat *moisture balance* pada suhu 105 °C dan tunggu sampai alarm alat berbunyi yang menandakan bahwa pengujian telah selesai dan hasil akan muncul pada layar *moisture balance*.

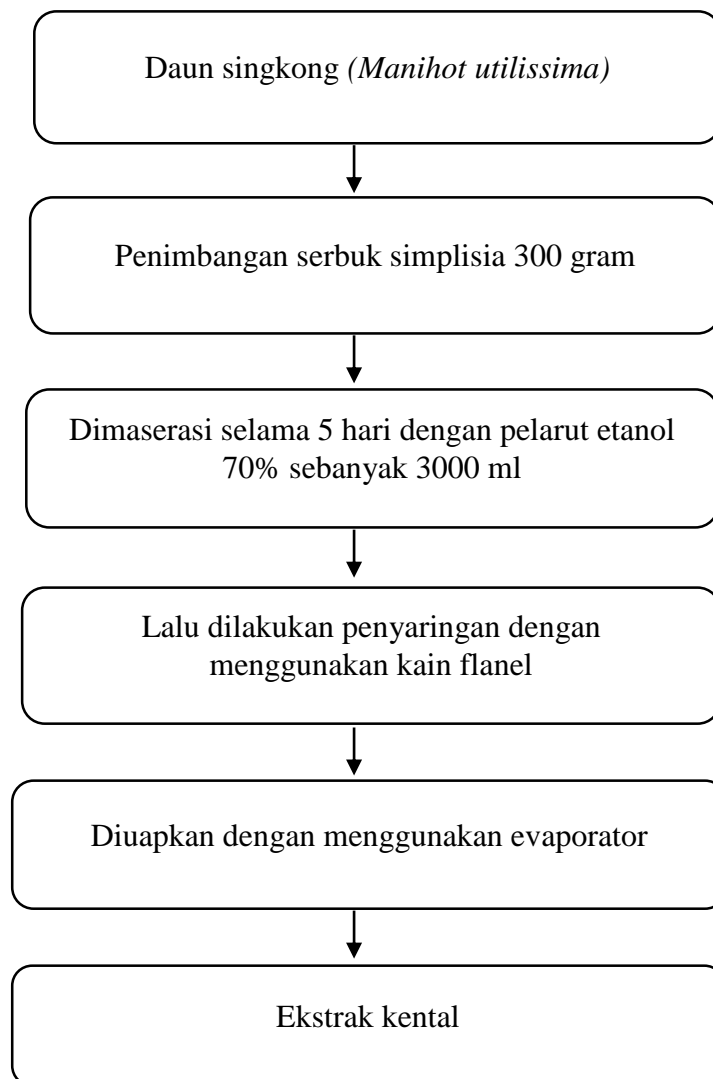
4. Pembuatan ekstrak daun singkong

Pembuatan ekstrak daun singkong dilakukan dengan cara maserasi. Metode ini digunakan karena sederhana, mudah dalam pengerjaan, efisien, dan hasil yang diperoleh baik. Maserasi ini dilakukan dengan cara merendam 300 gram serbuk simplisia dalam cairan penyari yaitu etanol 70% sebanyak 3000 ml selama 5 hari. Kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Agar pelarut dapat

menguap sehingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi yang pekat. Selanjutnya dilakukan perhitungan % rendemen dengan rumus:

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

Skema pembuatan ekstrak etanol 70 % daun singkong



Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol 70 % daun singkong (*Manihot utilissima*).

5. Identifikasi kandungan kimia

5.1 Identifikasi flavonoid

Sebanyak 0,1 gram ekstrak atau serbuk dimasukkan ke dalam gelas piala kemudian ditambahkan 10 ml air panas dan dididihkan. Setelah itu disaring dan filtratnya dimasukkan dalam tabung reaksi tambahkan 0,5 g serbuk Mg, 1 ml amil alkohol dan kocok dengan kuat. Positif flavonoid ditandai terbenuknya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Harbone, 1987).

5.2 Identifikasi saponin

Identifikasi saponin dilakukan dengan cara 1 ml ekstrak atau serbuk dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 ml air panas dan dibiarkan mendingin, setelah itu dikocok kuat-kuat selama 10 detik maka akan terbentuk busa atau buih yang stabil (Depkes RI, 1980).

E. Penelitian Efek Analgetik

1. Pembuatan larutan Na CMC 0,5%

Serbuk Na CMC ditimbang sebanyak 2,5 gram, kemudian dilarutkan dalam sebagian aquadest hangat, diaduk dan ditambah aquadest sambil terus diaduk. Setelah larut semua sisa aquadest ditambahkan sampai didapatkan volume larutan Na CMC 500 ml dan Na CMC 0,5 % yang dioralkan yaitu 0,5 ml/20 g BB mencit.

2. Pembuatan larutan asam asetat 1 %

Pembuatan Larutan asam asetat 1% (v/v) yang berarti 1 ml larutan asam asetat dengan konsentrasi 100% diambil dengan pipet volume, kemudian dilarutkan

dalam aquadest steril hingga volume 100 ml. Pemberian asam asetat diberikan secara intra peritoneal. Dosis asam asetat yang digunakan untuk mencit adalah 100 mg/kg BB.

3. Pembuatan larutan suspensi aspirin

Aspirin ditimbang sesuai perhitungan kemudian di suspensi dengan larutan Na CMC 0,5% sedikit demi sedikit sambil dikocok dan dosis yang akan digunakan yaitu sediaan lazim aspirin 500 mg sekali pakai Konversi dosis manusia dengan berat badan 70 kg ke mencit adalah 0,0026. Jika berat badan mencit misalkan 20 gram, maka dosis aspirin yang diberikan = $500 \text{ mg} \times 0,0026 = 1,3 \text{ mg}/20 \text{ g BB}$ mencit

4. Pembuatan larutan sediaan uji

Ekstrak daun singkong ditimbang sesuai dosis yang direncanakan kemudian dilarutkan dengan Na CMC 0,5% yang telah dibuat sebelumnya dan diaduk hingga homogen.

5. Uji efek analgetik

Sebelum digunakan untuk penelitian mencit terlebih dahulu dipelihara kurang lebih selama dua minggu, hal ini bertujuan untuk mengadaptasi terhadap lingkungan tempat tinggalnya, dan selalu mengontrol makanan mencit agar kesehatan juga berat badan mencit selalu terjaga. Dalam penelitian ini mencit dibagi

menjadi 5 kelompok yang dimana masing-masing kelompok terdiri dari 5 mencit, yang selanjutnya mencit diberikan obat sesuai dengan pengelompokan dosis yang telah ditentukan dan diamkan selama 30 menit hal tersebut bertujuan agar obat dapat diabsorpsi dengan baik, yang selanjutnya diberikan rangsangan kimia berupa asam asetat 1% untuk menimbulkan efek nyeri pada mencit, nyeri timbul berupa respon geliat yang dilakukan oleh mencit. Hitung jumlah kumulatif geliat mencit tiap selang waktu 10 menit selama 1 jam.

Berikut ini adalah pembagian kelompok hewan uji dalam penelitian :

Tabel 1. Pembagian kelompok hewan uji

No	Kelompok perlakuan	Jumlah mencit	Perlakuan
1	Kontrol negatif	5 ekor	Diberikan perlakuan Na CMC 0,5 %. 0,5 ml/20 g BB mencit secara peroral dan diberikan juga asam asetat 100 mg/kg BB dengan cara disuntikkan melalui intra peritoneal.
2	Kontrol positif	5 ekor	Diberikan perlakuan larutan aspirin 1,3 mg/20 g BB mencit dalam Na CMC 0,5 % secara peroral dan asam asetat secara intra peritoneal
3	Ekstrak I (ekstrak etanol daun singkong dengan dosis 25,65 mg/kg BB)	5 ekor	Larutan ekstrak etanol daun singkong dengan dosis 25,65 mg/kg BB dalam Na CMC 0,5% secara peroral dan asam asetat secara intra peritoneal.
4	Ekstrak II (ekstrak etanol daun singkong dengan dosis 38,4 mg/kg BB)	5 ekor	Larutan ekstrak etanol daun singkong dengan dosis 38,4 mg/kg BB dalam Na CMC 0,5% secara peroral dan asam asetat secara intra peritoneal.
5	Ekstrak III (ekstrak etanol daun singkong dengan dosis 51,2 mg/kg BB).	5 ekor	Larutan ekstrak etanol daun singkong dengan dosis 51,2 mg/kg BB dalam Na CMC 0,5% secara peroral dan asam asetat secara intra peritoneal.

Perhitungan persentase daya analgetik pada masing masing kelompok dapat ditentukan setelah didapat jumlah kumulatif geliat mencit selama 1 jam dengan menghitung presentase daya analgetiknya masing kelompok dengan rumus : (%)

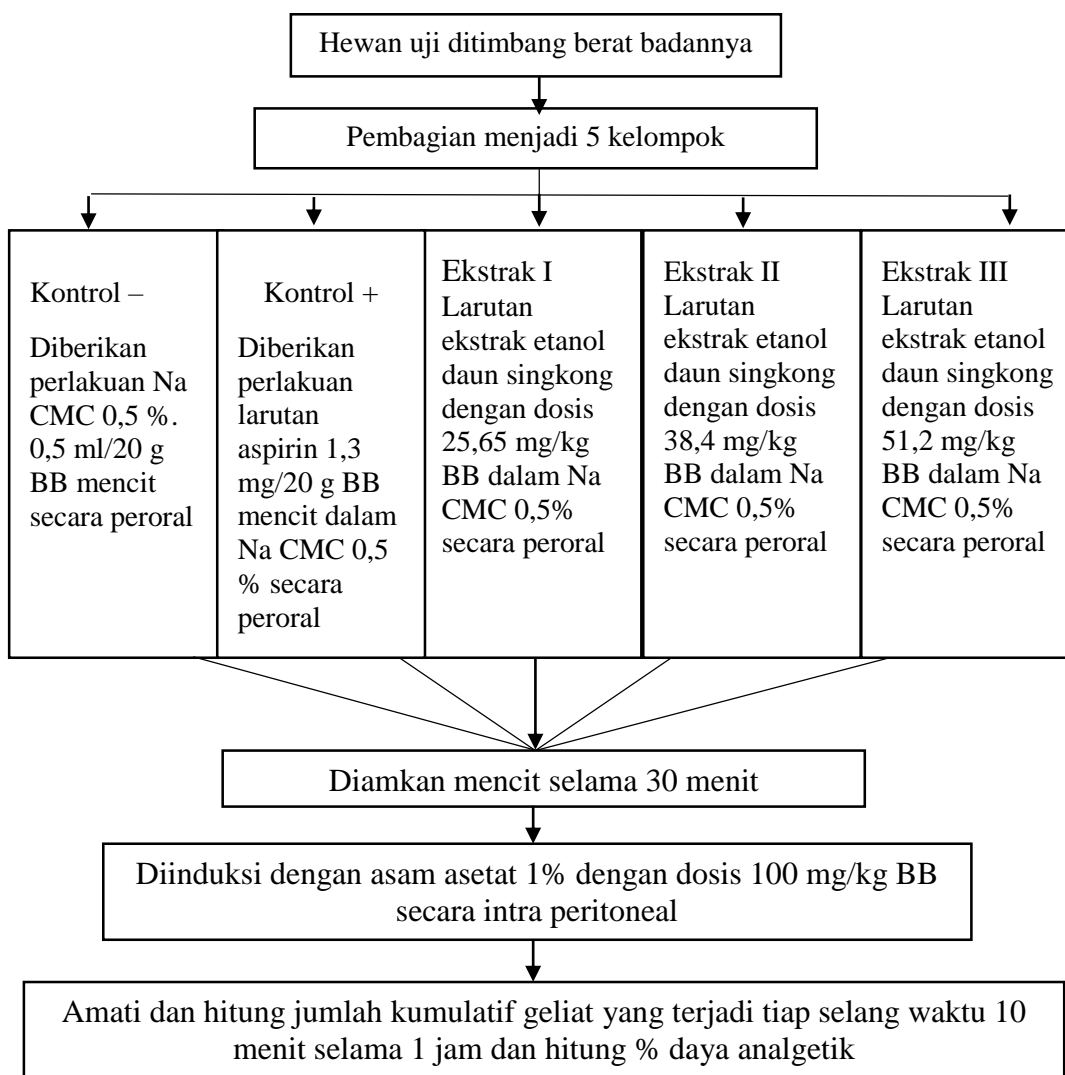
$$\text{daya analgetik} = 100 - \left(\frac{P}{K} \times 100 \% \right)$$

Keterangan:

P= Jumlah kumulatif geliat mencit kelompok perlakuan

K= Jumlah kumulatif geliat mencit kelompok kontrol negatif (Andani *et al.*, 2016).

F. Alur Uji Analgetik



Gambar 2. Alur uji analgetik ekstrak etanol daun singkong (*Manihot utilissima*) pada mencit jantan (*Mus musculus*).

G. Analisis Hasil

Hasil data yang diperoleh dalam pengamatan terhadap geliat mencit selama 60 menit pada tiap-tiap kelompok yang diberi perlakuan lalu data tersebut dianalisis dengan menggunakan uji statistik yaitu dengan analisis varian (ANAVA) pada taraf kepercayaan 95% untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antara kelompok. Dilakukan uji awal menggunakan *kolmogorof- Smirnov* untuk mengetahui data yang diteliti terdistribusi normal, setelah data terdistribusi normal dilanjutkan dengan *Test of Homogeneity of Variances* untuk mengetahui data itu homogen atau tidak. Kemudian dilanjut dengan uji (ANAVA) mengetahui apakah data tersebut ada perbedaan yang signifikan. Jika data tersebut memiliki perbedaan yang bermakna kemudian dilakukan uji Duncan.