

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi dalam penelitian ini adalah daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang diperoleh dari Tawangmangu, Solo Jawa Tengah pada bulan Januari tahun 2019.

##### **2. Sampel**

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang masih segar bebas jamur dan tidak mudah busuk yang diperoleh dari Tawangmangu, Solo Jawa Tengah pada bulan Januari tahun 2019.

#### **B. Variabel Penelitian**

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

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah aktivitas analgesik dari ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana, etil asetat, air daun sirih merah (*Piper crocatum*).

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah golongan senyawa dari ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana, etil asetat, air daun sirih merah (*Piper crocatum*).

Variabel utama ketiga penelitian ini adalah metode *tail flick* dan *Randall Selitto* pada hewan uji.

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

Variabel utama memuat identifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung. Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasi kembali dalam berbagai macam variabel yaitu :

**2.1. Variabel bebas.** Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana, etil asetat, air daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang di induksi pada hewan uji.

**2.2. Variabel tergantung.** Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian dan merupakan akibat dari variabel bebas kriteria penelitian. variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas efek analgesik dari ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana, etil asetat air dari daun sirih merah (*Piper crocatum*) dengan metode *tail flick* dan *Randall Selitto*.

**2.3. Variabel kendali.** Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung selain variabel bebas sehingga perlu ditetapkan kualifikasi nya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh penelitian lain secara tepat. Variabel dalam penelitian ini adalah kondisi peneliti, laboratorium dan kondisi fisik dari hewan uji yang meliputi galur, berat badan, jenis kelamin, usia, lingkungan, tempat hidup.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, tanaman sirih merah yang digunakan adalah daun sirih yang dipetik pada kondisi yang masih segar, berwarna merah, bebas dari hama yang diambil dari daerah Tawangmangu, Solo Jawa Tengah pada bulan Januari tahun 2019.

Kedua, serbuk daun sirih merah adalah serbuk yang diperoleh dari simplisia kering yang dihaluskan dan diayak dengan pengayak nomor 40 *mesh*.

Ketiga, ekstrak daun sirih merah adalah hasil ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Keempat, fraksi *n*-heksana daun sirih merah adalah hasil fraksinasi dari ekstrak etanol daun sirih merah menggunakan pelarut *n*-heksana.

Kelima, fraksi etil asetat daun sirih merah adalah hasil fraksinasi dari residu *n*-heksana dengan pelarut etil asetat.

Keenam, fraksi air daun sirih merah adalah hasil residu dari proses fraksinasi ekstrak etil asetat.

Ketujuh, fraksi teraktif dari ekstrak etanol daun sirih merah adalah fraksi yang memberikan respon hambat nyeri paling tinggi.

Kedelapan, hewan uji dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar, umur 2-3 bulan dengan berat antara 150-200 gram yang diperoleh dari Yuliet White Mouse.

Kelima, aktivitas analgesik dinyatakan sebagai kemampuan dari ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana, etil asetat, air daun sirih merah (*Piper crocatum*) dalam menghambat rasa nyeri ditandai respons nyeri yaitu penarikan ekor hewan uji dengan segera dari hasil metode *tail flick* dan respons penarikan kaki tikus saat pemberian beban dari hasil metode *Randall Selitto*.

### C. Alat, Bahan dan Hewan Uji

#### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik, blender, ayakan nomor 40 *mesh*, seperangkat alat maserasi, fraksinasi dan *strerling bidwell*, *chamber KLT*, *evaporator*, *waterbath*, alat suntik peroral dan *subcutan* seperangkat alat *Tail flick analgesy-meter* dan UGO BASILE 3721 ITALY *analgesy-meter*.

#### 2. Bahan

Bahan sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana, etil asetat, air daun sirih merah (*Piper crocatum*).

Bahan kimia yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah asam mefenamat dan tramadol (kontrol positif), CMC (kontrol negatif), *Saccharomyces cerevisiae* (induksi inflamasi), etanol 70% (sebagai penyari), *n*-heksana, etil asetat, air (pelarut fraksinasi), toluen (pelarut *strerling bidwell*), lempeng KLT silika GF 254, anisaldehyd, amonia pekat, FeCl<sub>3</sub>, Dragendroft, Lieberman-Burchard (preaksi semprot identifikasi senyawa), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COOH (uji esterifikasi)

#### 3. Hewan uji

Hewan uji tikus jantan putih galur wistar dengan berat antara 150-200 gram yang diperoleh dari Yuliet White Mouse. Tikus putih dipilih karena memiliki fisiologi dan anatomi yang hampir sama dengan manusia. Pemilihan

tikus putih jantan karena tubuh tikus jantan lebih stabil dibandingkan betina yang mempunyai siklus menstruasi (Sugiyanto 2010).

#### **D. Jalannya Penelitian**

##### **1. Determinasi tanaman**

Determinasi dilakukan untuk menetapkan kebenaran sampel daun sirih merah berdasarkan ciri-ciri morfologi tanaman terhadap kepustakaan dan dapat dibuktikan kebenarannya. Dalam penelitian ini menggunakan sampel daun sirih merah (*Piper crocatum*) determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium program studi Biologi Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta.

##### **2. Penyiapan bahan**

Daun sirih merah yang digunakan sebanyak 5 kg yang dipilih yaitu daun muda, berwarna merah dan masih segar, dipanen pada usia 2-3 bulan setelah ditanam. Daun yang diperoleh dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan cemaran dan kotoran yang melekat. Daun yang telah dicuci kemudian ditiriskan dan dilakukan pengeringan dibawah sinar matahari hingga daun mengering untuk mengurangi kadar air dan mencegah terjadinya pembusukan.

##### **3. Pembuatan serbuk**

Daun sirih merah yang telah dikeringkan kemudian di serbuk dengan cara diblender kemudian pengayakan serbuk dengan pengayak nomor 40 *mesh*. Serbuk yang diperoleh kemudian ditimbang.

##### **4. Ekstraksi**

Ekstraksi dengan maserasi dibuat dengan cara merendam simplisia sebanyak 1 kg kedalam etanol 70% dengan perbandingan 1:10 dalam wadah botol gelap, biarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya dan lakukan pengocokan berulang. Setelah itu diendapkan selama 2 hari dan saring ampas dengan etanol 70% hingga diperoleh 10 bagian. Perolehan ekstrak pekat dengan cara menyaring campuran ekstrak yang dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50<sup>0</sup>C dan oven 50<sup>0</sup>C hingga diperoleh berat konstan. Perhitungan rendemen ekstrak dinyatakan dalam persen.

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat serbuk}} \times 100\%$$

### 5. Penetapan kadar air

Sebanyak 20 gram ekstrak daun sirih merah dimasukkan dalam labu alas bulat pada alat *Sterling Bidwell* tambahkan toluen sebanyak 100 ml dan panaskan sampai tidak ada tetesan lagi, lihat volume skala tetesan dan hitung % kadar air dari berat sampel (Sudarmadji *et al.* 1995).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{volume terbaca}}{\text{berat bahan}} \times 100\%$$

### 6. Uji bebas etanol

Uji bebas etanol dilakukan untuk mengetahui ekstrak daun sirih merah sudah tidak mengandung etanol, pengujian dengan cara uji esterifikasi etanol dengan penambahan reagen H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan CH<sub>3</sub>COOH lalu dipanaskan. Hasil uji ditandai dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol (Rochman 2016).

### 7. Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan tiga pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya, yaitu *n*-heksana (non polar), etil asetat (semi polar) dan air (polar). Fraksinasi dilakukan dengan menimbang 10 gram ekstrak kental daun sirih merah, kemudian dilarutkan dengan etanol 5 ml dan pelarut air 70 ml hingga terdispersi sempurna. Kemudian difraksinasi dengan *n*-heksana 75 ml menggunakan corong pisah hingga diperoleh larutan jernih, diperoleh fraksi *n*-heksana dan fraksi air (dipisahkan). Fraksi air dipartisi dengan etil asetat 75 ml hingga diperoleh larutan jernih, dipisahkan fraksi air dengan fraksi etil asetat. Fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat dipekatkan dengan oven 50°C, fraksi air dipekatkan dengan *water bath*.

$$\text{Rendemen fraksi (\%)} = \frac{\text{berat fraksi}}{\text{berat ekstrak}} \times 100\%$$

### 8. Identifikasi kandungan kimia

Penyiapan fase diam Silika gel GF254/plat KLT dengan panjang 6 cm dan lebar 5 cm.

**Tabel 1. Identifikasi kandungan kimia (Marlina 2015; Kristanti *et al.* 2008; Astuti 2012; Harbone 2006).**

Senyawa yang Dideteksi	Fase Gerak	Preaksi Deteksi	Hasil Positif
Flavonoid	Asam asetat glasia: butanol: air (1:4:5)	Uap amonia	Bercak kuning coklat pada sinar tampak dan biru pada UV 366nm
Steroid	Kloroform : metanol (9 :1)	Lieberman Buchard	Bercak hijau atau biru pada UV 366
Minyak atsiri	Toluen: etil asetat (8 :1)	Anisaldehyd	Bercak biru atau ungu pada UV 254
Alkaloid	Etil asetat: metanol: air (90:9:1)	Dragendorff	Bercak jingga-coklate pada sinar tampak atau UV 366
Tanin	<i>n</i> -heksana : etil asetat (3 :7)	FeCl <sub>3</sub> 1%	Bercak biru hingga gelap pada sinar tampak atau UV 254 dan 366

## 9. Pembuatan larutan dan penetapan dosis

**9.1 Suspensi CMC 1%.** Pembuatan larutan CMC yaitu sebanyak 500 mg serbuk CMC dikembangkan dengan air panas dalam mortir hangat, digerus hingga terbentuk mucilago ditambahkan aquadestilata sedikit demi sedikit sampai volume 50 ml digerus hingga tersuspensi.

**9.2 Pembuatan suspensi asam mefenamat 1%.** Dosis asam mefenamat ditentukan berdasarkan faktor konversi dosis manusia. Dosis lazim asam mefenamat adalah 500 mg sekali pakai. Konversi dosis manusia ke tikus adalah 0,018. Dari hasil perhitungan dosis asam mefenamat yang diberikan pada tikus adalah  $500 \text{ mg} \times 0,018 = 9 \text{ mg}/200\text{gbb}$ . Pembuatan suspensi asam mefenamat 1%, yaitu dengan menggunakan 1 tablet asam mefenamat dosis 500 mg digerus dan disuspensi dalam CMC 1% hingga volume 50 ml.

**9.3 Pembuatan suspensi tramadol 0,1%.** Penentuan dosis tramadol berdasarkan faktor konversi dosis manusia. Dosis lazim tramadol adalah 50 mg sekali pakai. Konversi dosis manusia dengan berat 70 kg ke tikus adalah 0,018. Dari hasil perhitungan dosis tramadol yang diberikan pada tikus adalah  $50 \text{ mg} \times 0,018 = 0,9 \text{ mg}/200\text{gbb}$ . Pembuatan suspensi tramadol 0,1%, yaitu dengan menggunakan 1 tablet tramadol dosis 50 mg digerus dan disuspensi dalam CMC 1% hingga volume 50 ml.

**9.4 Pembuatan suspensi ekstrak.** Dosis efektif daun sirih merah adalah 14,56 mg/20gbb dalam bentuk ekstrak (Dian *et al.* 2013). Dosis ekstrak di

konversikan ke tikus menjadi  $14,56 \text{ mg}/20\text{gbb} \times 7,0$  adalah  $101,92 \text{ mg}/200\text{gbb}$  dosis ekstrak etanol daun sirih merah yang digunakan adalah 100 mg. Dosis tersebut terlebih dahulu diorientasi untuk menentukan dosis ekstrak etanol daun sirih merah yang efektif sebagai analgesik.

Pembuatan suspensi ekstrak etanol 2% dilakukan dengan cara ditimbang CMC sebanyak 250 mg kemudian dikembangkan dengan air panas dalam mortir hangat hingga terbentuk mucilago ditambahkan ekstrak 500mg digerus hingga tersuspensi ditambahkan aquadestilata hingga volume 25 ml.

**9.5 Pembuatan suspensi fraksi-fraksi.** Penentuan dosis fraksi dihitung berdasarkan hasil perolehan rendemen fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari dosis ekstrak etanol daun sirih merah. Pembuatan sediaan uji fraksi-fraksi dilakukan dengan cara, ditimbang CMC sebanyak 500 mg kemudian dikembangkan dengan air panas dalam mortir hangat hingga terbentuk mucilago ditambahkan fraksi digerus hingga tersuspensi ditambahkan aquadestilata hingga volume 50 ml.

## **10. Pengujian efek analgesik**

**10.1 Prosedur pengujian metode *tail flick*.** Prosedur pengujian terdiri dari enam kelompok masing-masing kelompok menggunakan lima ekor tikus putih jantan galur wistar. Sebelum diberi perlakuan uji analgesik tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 18 jam namun tetap diberi minum. Tikus diadaptasi dengan alat selama 2-3 menit, hewan uji di uji *tail flick* terlebih dahulu untuk menentukan T<sub>0</sub>. Masing-masing kelompok uji diberikan perlakuan dosis tunggal peroral, setelah 30 menit barulah dilakukan pengujian rangsang nyeri dengan alat *tail flick analgesy-meter*. Pastikan tikus dalam keadaan tenang agar dapat beradaptasi dengan alat uji. Rangsang panas diatur hingga suhu mencapai 50<sup>0</sup>C, catat waktu tikus mulai menarik atau menjentikan ekornya. Pengujian dilakukan pada menit ke-30 menit, 60 menit, 90 menit dan 120 menit.

**10.2 Prosedur pengujian metode *Randall Selitto*.** Prosedur pengujian terdiri dari enam kelompok masing-masing kelompok menggunakan lima ekor tikus putih jantan galur wistar. Sebelum diberi perlakuan uji analgesik, tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 18 jam namun tetap diberi minum. Tikus

diadaptasi dengan alat selama 2-3 menit. Masing-masing kelompok diinduksi inflamasi dengan 20% suspensi *Saccharomyces cerevisiae* volume 0,1 ml pada telapak kaki tikus, setelah 30 menit dilakukan pengujian dengan alat *Ugo Basile analgesy-meter* untuk menentukan T0. Masing-masing kelompok uji diberikan perlakuan dosis tunggal peroral, setelah 30 menit barulah dilakukan pengujian rangsang nyeri. Beban dijalankan dan dihentikan bila tikus memberikan respons berupa penarikan kaki. Pencatatan waktu terhadap pengujian berupa peningkatan beban dalam gram. Waktu pengujian 30 menit, 60 menit, 120 menit, 180 menit dan 240 menit.

## 11. Perhitungan persen daya analgesik

**11.1 Metode *tail flick*.** Pengaruh pemberian fraksi *n*-heksana, etil asetat, air ekstrak etanol daun sirih merah, dilakukan dengan menghitung waktu respons ekor menarik atau menjentik, dengan rumus :

$$W_u = W_t - W_0 \dots\dots\dots 1$$

Keterangan :

$W_u$  = Waktu respons tiap waktu  
 $W_t$  = Waktu respons setelah diberi perlakuan  
 $W_0$  = Waktu respons sebelum diberi perlakuan

Setelah menghitung data waktu respons, kemudian buat kurva perbandingan waktu respons ekor mengibas versus waktu uji. Selanjutnya hitung AUC (*area under the curve*). AUC adalah luas rata-rata dibawah kurva yang merupakan hubungan rata-rata waktu respons ekor tikus menjentik tiap satuan waktu, dengan rumus :

$$AUC_n^n = \frac{(W_{tn-1}) + W_{tn}}{2} [n - (tn - 1)] \dots\dots\dots 2$$

Keterangan :

$W_{t_{n-1}}$ : waktu respons data per ekor pada  $t_{n-1}$   
 $W_{t_n}$  : waktu respons data per ekor pada  $t_n$

Pengukuran efektivitas analgesik metode *tail flick* dinyatakan dengan PHN (persentase hambat nyeri), dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Peningkatan hambat nyeri} = \frac{AUC_p - AUC_k}{AUC_p} \times 100 \dots\dots\dots 3$$

Keterangan :

$AUC_p$  = AUC kurva respons rata-rata terhadap waktu kelompok perlakuan  
 $AUC_k$  = AUC kurva respons rata-rata terhadap waktu kelompok kontrol negatif.



**11.2 Metode *Randall Selitto*.** Pengaruh pemberian fraksi *n*-heksana, etil aasetat, air ekstrak etanol daun sirih merah, dilakukan dengan menghitung daya tahan beban penarikan kaki hewan uji, dengan rumus :

$$Fu = Ft - F0 \dots\dots\dots 1$$

Keterangan :

Fu = Daya tahan beban tiap waktu (gram)

Ft = Daya tahan beban setelah diberi perlakuan (gram)

F0 = Daya tahan beban sebelum diberi perlakuan (gram)

Setelah perhitungan daya tahan beban (beban) yang terukur, kemudian buat data kurva perbandingan daya tahan terukur versus waktu uji. Langkah selanjutnya menghitung AUC (*area under the curve*). AUC adalah luas rata-rata dibawah kurva yang merupakan hubungan rata-rata daya tahan beban terukur tiap satuan waktu, dengan rumus :

$$AUC_n^n = \frac{(F_{t_{n-1}}) + F_{t_n}}{2} [t_n - (t_{n-1})] \dots\dots\dots 2$$

Keterangan :

F<sub>t<sub>n-1</sub></sub> = Daya tahan beban rata-rata pada t<sub>n-1</sub> (gram)

F<sub>t<sub>n</sub></sub> = Daya tahan beban rata-rata pada t<sub>n</sub> (gram)

Pengukuran efektivitas analgesik metode *Randall Selitto* dinyatakan dengan persentase peningkatan abang nyeri yang dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Peningkatan hambat nyeri} = \frac{AUC_p - AUC_k}{AUC_p} \times 100 \dots\dots\dots 3$$

Keterangan :

AUC<sub>p</sub> = AUC kurva daya tahan beban rata-rata terhadap waktu kelompok perlakuan

AUC<sub>k</sub> = AUC kurva daya tahan beban rata-rata terhadap waktu kontrol negatif

## 12. Hewan uji

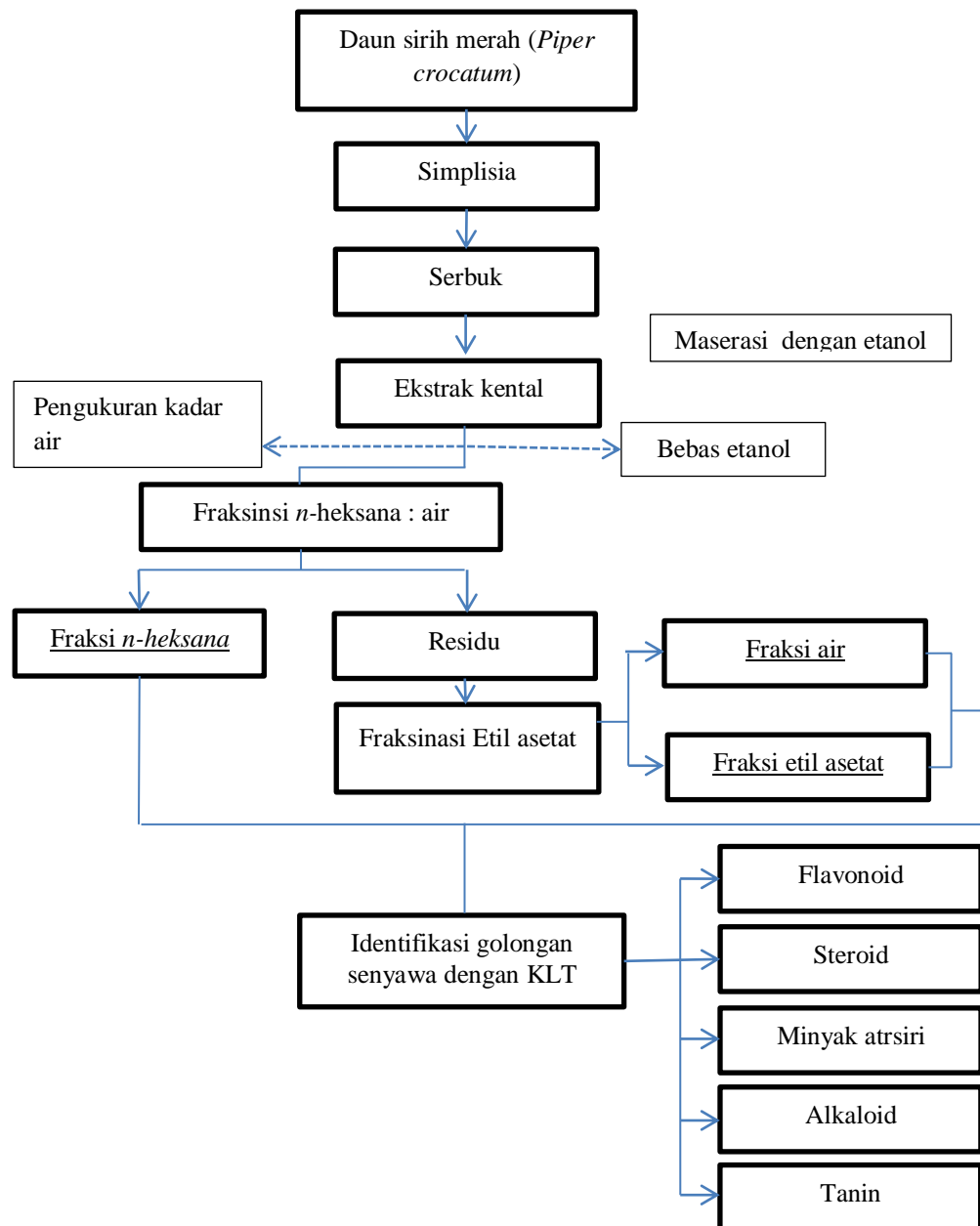
Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar yang diperoleh dari Yuliet White Mouse. Usia 2-3 bulan dengan berat 150-200 g sebanyak 30 ekor.

**12.1 Pemeliharaan.** Sebelum dilakukan pengujian terhadap tikus, maka tikus terlebih dahulu diadaptasi selama 7 hari dalam kandang yang diberi alas gabah padi untuk menyerap kotoran tikus. Penutup kandang terbuat dari anyaman kawat dengan lubang 1x1 cm berbentuk persegi. Pakan tikus berupa pelet yang diberikan pada pagi dan sore hari dan air matang untuk minum tikus diberikan melalui botol gelas/kaca pipet. Ruang pemeliharaan tikus diberi lampu fluoresens

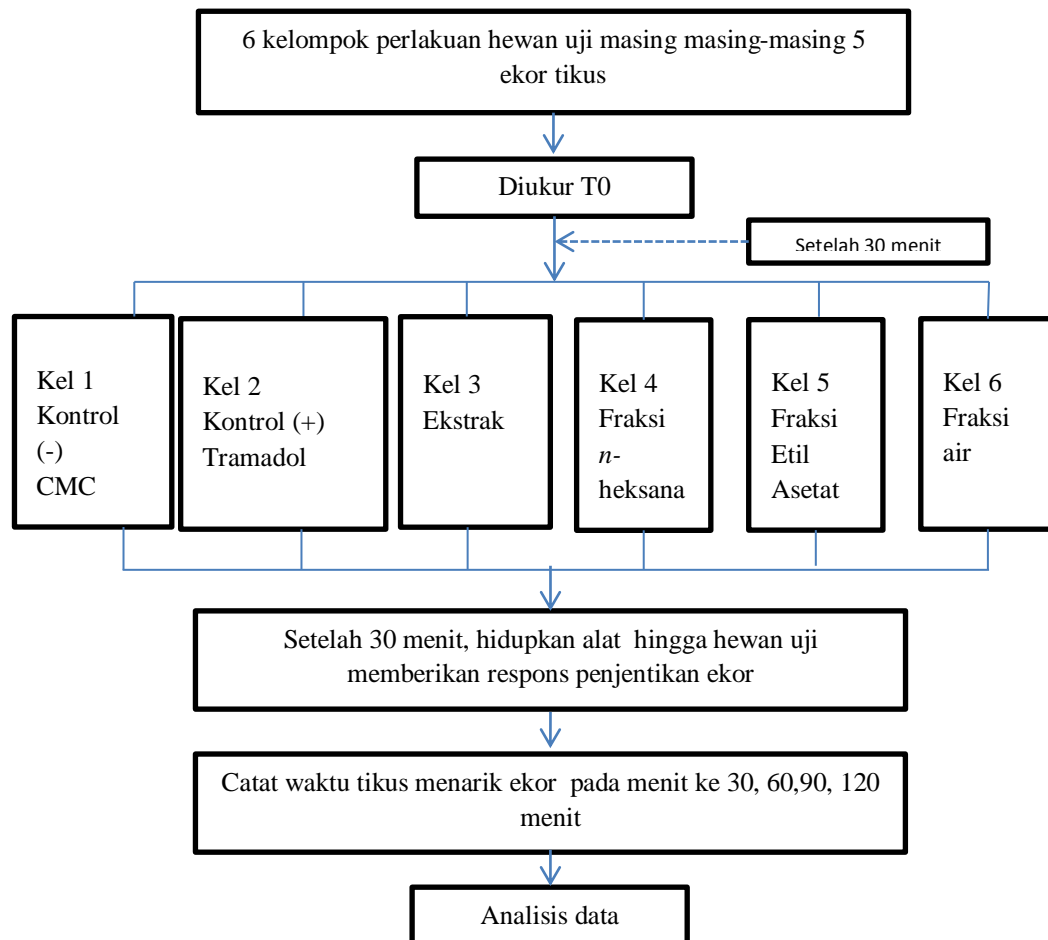
12 watt, aliran udara dalam ruang, kandang tikus dibersihkan minimal dua kali seminggu.

**12.2 Perlakuan.** Setelah tikus diadaptasi selama 7 hari, selanjutnya tikus dibagi kedalam 6 kelompok masing-masing terdiri dari 5 tikus yang dipilih secara acak. Sebelum tikus mendapatkan perlakuan, terlebih dahulu tikus dipuaskan tidak diberi makan tetapi tetap diberi minum selama 18 jam. Tikus diberikan perlakuan secara peroral.

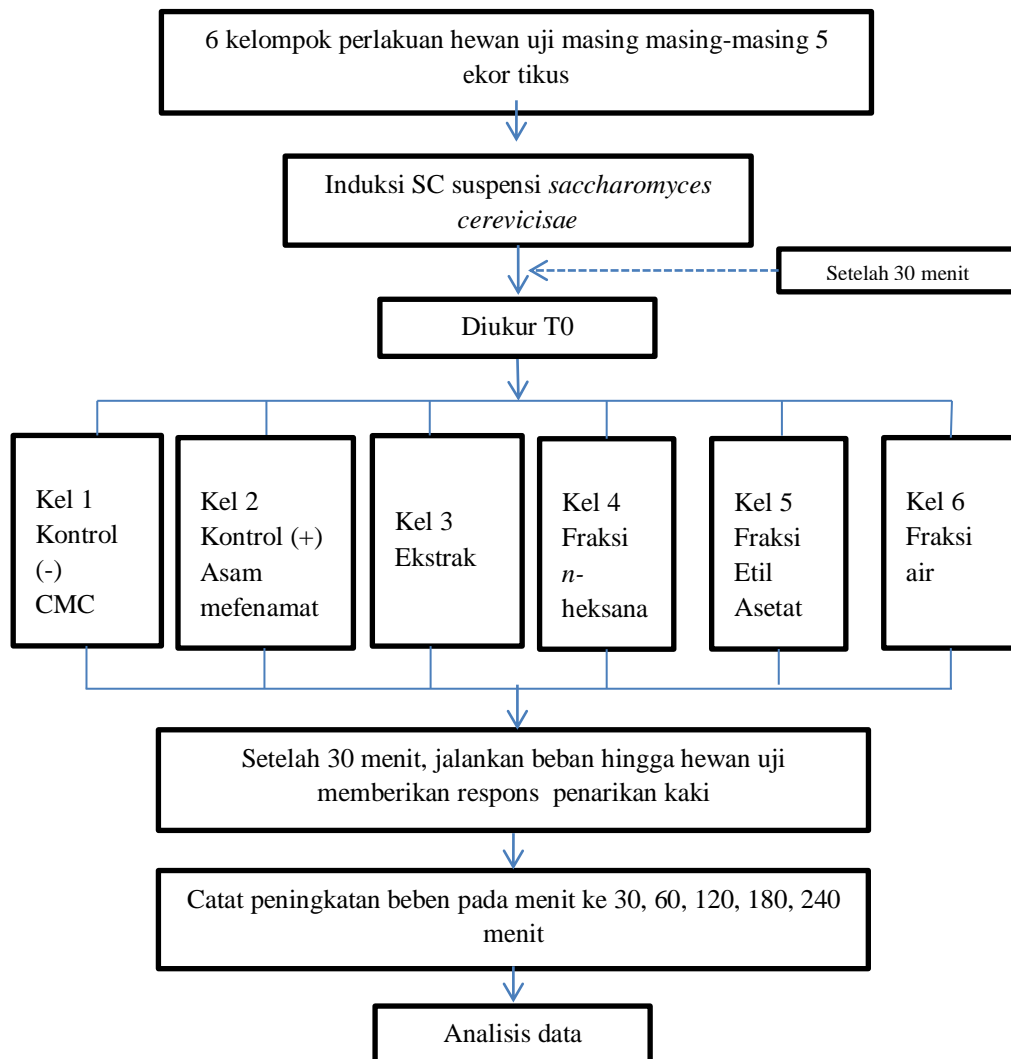
**12.3 Perlakuan setelah penelitian.** Pada akhir penelitian hewan uji dimusnahkan dengan cara dikorbankan dan jasad hewan uji dikubur dengan membuat lubang dengan kedalaman minimal setengah meter untuk menghindari terbongkarnya tempat penguburan dan bau yang ditimbulkan. Hewan uji yang telah dimusnahkan dikubur di tempat yang telah disediakan di Universitas Setia Budi.



**Gambar 5. Bagan jalannya penelitian pembuatan fraksi-fraksi sirih merah**



**Gambar 6.** Bagan pengujian analgesik metode *tail flick*



**Gambar 7.** Alur pengujian analgesik metode *Randall Selitto*

### E. Analisis Data

Analisis data metode *Randall Selitto* dan *tail flick* dengan uji *Shapiro-Wilk* atau *Kolmogorov-Smirnov* untuk mengetahui data terdistribusi normal serta uji *Levene* untuk mengetahui homogenitas data. Apabila data terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji statistik menggunakan *one way Anova*, namun apabila terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. *Post hoc test* digunakan uji *LSD* apabila pada pengujian *Anova*  $H_0$  ditolak atau terdapat perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan.

Analisis data tidak terdistribusi normal dan homogen maka analisis data dilanjutkan dengan metode non parametrik yaitu uji *Mann-Whitney* dengan perbedaan nilai signifikan  $>0,05$  dengan taraf kepercayaan 95%.