

## **BAB III METODE PENELITIAN**

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

#### **1. Populasi**

Populasi merupakan seluruh bagian pada sarana penelitian. Populasi yang di pakai dalam penelitian ini yaitu daun sirsak (*Annona muricata L.*) diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

#### **2. Sampel**

Sampel yang dipakai dalam penelitian ini adalah daun sirsak (*Annona muricata L.*) yang diambil secara acak dan dipilih daun yang berwarna hijau segar, dan terbebas dari serangga. Daun didapatkan dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah pada bulan Agustus 2023.

### **B. Variasi Penelitian**

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

Variabel utama yang dalam penelitian ini adalah aktivitas analgetik sediaan tablet dengan konsentrasi PVP yang berbeda dari ekstrak daun sirsak terhadap mencit jantan.

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah uji mutu fisik pada tablet ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*)

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

Variabel utama mencakup identifikasi semua variabel yang diteliti secara langsung. Variabel utama yang akan diidentifikasi meliputi faktor independen, variabel kontrol, dan variabel dependen.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk diteliti dampaknya terhadap variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi PVP dan amilum.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat, sehingga perlu dilakukan penilaian terhadap kualifikasinya. hasilnya konsisten, memungkinkan untuk direplikasi oleh peneliti lain, dan dianggap sesuai. Dalam penelitian ini faktor yang dikontrol meliputi parameter fisik mencit, seperti jenis kelamin, berat badan, pakan yang diberikan, kondisi lingkungan, pengaturan laboratorium, dan prosedur pembuatan ekstrak dan tablet.

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat karena adanya variabel bebas. Variabel dalam penelitian ini adalah penilaian kualitas fisik tablet.

### 3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, Daun sirsak (*Annona muricata L.*) merupakan daun tanaman sirsak yang berada di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*) adalah hasil ekstraksi dari simplisia daun sirsak (*Annona muricata L.*) dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.

Ketiga, sediaan tablet ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*) adalah tablet yang diformulasikan dengan perbedaan konsentrasi PVP.

Keempat, mutu fisik tablet ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*) yaitu pengujian organoleptis, waktu hancur, kekerasan, kerapuhan, dan keseragaman bobot.

Kelima, aktivitas analgetik dari sediaan tablet ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*) dapat dilihat dari jumlah kumulatif geliat pada hewan uji.

## C. Bahan dan Alat, dan Hewan Uji

### 1. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya daun sirsak (*Annona muricata L.*), PVP, explotab, laktosa, mg stearat, paracetamol (kontrol positif), aquadest (kontrol negatif), asam asetat, etanol 70%, dan *aquadest*.

### 2. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya gelas ukur, tabung reaksi, erlenmeyer, neraca digital, corong kaca, mortir, stamper, sudip, batang pengaduk, cawan porselin, seperangkat alat homogenizer, pengayak, oven, *single punch*, *hardness tester*, *friabilator*, *disintegration*, dan sonde.

### 3. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit putih berjenis kelamin jantan, galur wistar.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Pembuatan *ethical clearance*

*Ethical Clearance* (Klirens etik) adalah keterangan tertulis yang digunakan untuk mengukur akseptabilitas atau keberterimaan etik rangkaian penelitian yang diterbitkan oleh Komite Etik Penelitian untuk riset yang berkaitan dengan makhluk hidup. Berdasarkan surat

keterangan ethical clearance untuk melakukan uji analgetik pada mencit dengan nomor 955/IV/HREC/2024 dapat dilihat pada lampiran 2.

## **2. Persiapan hewan uji**

Hewan uji yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) putih jantan yang sehat dengan umur 35 hari dan mempunyai bobot 20-30 gram sejumlah 25 ekor terbagi dalam 5 kelompok berbeda, di tiap kelompok terdapat 5 ekor mencit.

## **3. Determinasi tanaman**

Tahap ini merupakan tahap pertama pada penelitian yaitu determinasi daun sirsak (*Annona muricata L.*). Pada tahap ini dilakukan untuk membuktikan bahwa sampel yang dipakai sesuai dengan ciri-ciri mikroskopis dan makroskopis tanaman tersebut serta menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan. Determinasi tanaman dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Karanganyar.

## **4. Pengambilan bahan**

Pengambilan daun sirsak diambil dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah, pada bulan November tahun 2023. Dengan memilih yang berwarna hijau segar dan terbebas dari serangga. Daun sirsak yang sudah terkumpul digunakan untuk tahap selanjutnya agar dihasilkan serbuk yang halus.

## **5. Pembuatan serbuk daun sirsak (*Annona muricata L.*)**

Daun yang sudah dipanen lalu dipilih yang didapatkan di daerah Tawangmangu, Karanganyar. Daun sirsak yang sudah didapat kemudian dilakukan sortasi dan pencucian untuk membersihkan dari bahan-bahan pengotor. Daun dikeringkan selama beberapa hari pada suhu kamar dan tidak terkena sinar matahari. Daun yang telah kering dihaluskan dengan blender lalu diayak menggunakan ayakan no 40. Kemudian serbuk disimpan di dalam wadah yang tertutup dan tidak lembab untuk digunakan penelitian selanjutnya.

## **6. Penetapan susut pengeringan serbuk**

Penetapan susut pengeringan serbuk daun sirsak (*Annona muricata L.*) ditentukan dengan sampel yang dipanaskan pada oven suhu 105°C. Dipanaskan krus dengan tutup dan ditara. Lalu krus digunakan sebagai wadah penimbangan sebanyak 2 gram. Simplisia dalam krus diseragamkan dengan menggoyangkan wadah. Lalu dimasukkan dalam ruang pengering dengan kondisi terbuka. Proses pengeringan dilakukan pada suhu yang ditetapkan hingga konstan dan

dilakukan triplikasi (Kemenkes, 2017). Pengukuran susut pengeringan serbuk sirsak ini dilakukan di laboratorium Universitas Setia Budi.

## **7. Pembuatan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*)**

Daun sirsak diekstraksi melalui proses maserasi dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Sebanyak 700 gram serbuk daun sirsak dimasukkan ke dalam wadah gelap dan kemudian dicampur dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan yang telah ditentukan. Selanjutnya, perendaman dilakukan selama 24 jam, dengan 6 jam pertama dilakukan secara intermiten, diikuti dengan periode statis selama 18 jam. Filtrat diisolasi dari pulp dengan menggunakan penyaringan. Prosedur ini diulangi dengan menggunakan jenis pelarut yang sama, dengan volume pelarut setengah dari 3,5 liter awal. Semua filtrat dikumpulkan, dipekatkan menggunakan rotary evaporator, dan dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C untuk menghasilkan ekstrak kental daun sirsak (*Annona muricata L.*). Rendemen ekstrak ditentukan dengan menimbang ekstrak kental, membaginya dengan serbuk daun sirsak, dan kemudian mengalikannya dengan 100%.

## **8. Skrining Fitokimia**

**8.1 Uji alkaloid.** Identifikasi kandungan alkaloid dilakukan dengan memasukkan 0,5 gram ekstrak daun sirsak ke dalam tabung reaksi, menambahkan 10 ml amonia, 2 ml kloroform, dan kemudian menambahkan 10 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Cairan tersebut diaduk untuk menciptakan dua lapisan yang berbeda. Lapisan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dipartisi ke dalam tiga tabung, masing-masing berisi volume 2,5 mL. Tiga larutan dievaluasi menggunakan reagen Wagner, Mayer, dan Dragendorff. Larutan menunjukkan reaksi yang baik dengan pereaksi Wagner, menghasilkan perubahan warna menjadi coklat. Reaksi positif dengan pereaksi Mayer menghasilkan pembentukan endapan putih. Endapan berwarna merah jingga dihasilkan dengan pereaksi Dragendorff, menunjukkan adanya alkaloid (Surbakti, 2018).

**8.2 Uji flavonoid.** Timbang ekstrak daun sirsak 0,5 gram, berikan 5 mL pelarut etanol dan serbuk magnesium kemudian tambahkan 2-3 tetes HCl 2N. jika muncul warna kuning hingga merah berarti positif flavonoid (Melaningsih, 2022).

**8.3 Uji tanin.** Timbang ekstrak daun sirsak 0,5 gram, tambahkan 2 sampai 3 tetes larutan FeCl<sub>3</sub> Jika muncul warna hitam kehijauan berarti positif tanin (Melaningsih, 2022).

**8.4 Uji saponin.** Timbang ekstrak daun sirsak 0,5 gram,

berikan air hangat dan masukkan kedalam tabung reaksi lalu dikocok sampai berbentuk busa. Dikatakan positif saponin jika terdapat busa tinggi selama 10 menit dan cukup stabil pada ketinggian busa 1 sampai 10 cm, serta ketika diberikan asam klorida 2N busa tidak hilang (Melaningsih, 2022).

**8.5 Uji triterpenoid/steroid.** Timbang ekstrak daun sirsak 0,5 gram kemudian letakkan diatas plat tetes. Tambahkan asetat anhidrida hingga semua sampel terendam seluruhnya, ditunggu selama kurang lebih 15 menit. Kemudian larutan dipindahkan sebanyak 6 tetes lalu dimasukkan di tabung reaksi 2 hingga 3 tetes  $H_2SO_4$  ditambahkan. Jika terjadi warna biru/hijau di larutan maka dinyatakan positif steroid, tetapi jika ada warna merah, jingga, ataupun ungu pada larutan berarti hasil positif triterpenoid (Melaningsih, 2022).

## 9. Formula tablet ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*)

**9.1 Formula.** Formula sediaan tablet terdiri dari bahan pengikat, pengisi, penghancur, dan pelicin. Pada rancangan formula bahan pengikat yang digunakan PVP dengan berbagai konsentrasi, kemudian untuk bahan pengisi menggunakan laktosa dan amylum. Explotab digunakan untuk bahan penghancur dan bahan pelicin pada formula ini menggunakan mg stearat. Bahan aktif pada rancangan formula tablet ini adalah ekstrak daun sirsak.

**Tabel 1. Formula tablet ekstrak daun sirsak**

Bahan	Formula 1	Formula 2	Formula 3
Ekstrak	136	136	136
PVP	1%	3%	5%
Amylum	28	16,8	5,6
Laktosa	301,8	301,8	301,8
Explotab	55	55	55
Mg Stearat	5,6	5,6	5,6
Aerosil	28	28	28
Bobot Tablet	560	560	560

**9.2 Pembuatan tablet.** Menyiapkan alat dan timbang semua bahan secara akurat sesuai dengan formula. Ekstrak awalnya dikeringkan dengan aerosil, setelah itu dikombinasikan dengan laktosa, amylum, dan explotab, dan dihomogenisasi dalam gelas kimia selama 15 menit. Larutkan PVP dalam air suling. Bahan-bahan dasar digabungkan dalam mortar, dan PVP terlarut secara bertahap dimasukkan sampai diperoleh massa butiran yang kohesif dan elastis; jika perlu, air suling dapat ditambahkan untuk memfasilitasi proses ini. Selanjutnya, massa butiran diayak dengan ayakan No. 16 dan

ditempatkan dalam oven pada suhu 50-60°C. Keluarkan dari oven dan saring kembali butiran tersebut dengan menggunakan ayakan 18 mesh. Setelah diayak, pindahkan ke dalam gelas kimia, tambahkan magnesium stearat, dan lakukan penilaian kualitas fisik butiran, termasuk uji sudut diam dan uji impermeabilitas. Buatlah tablet dengan menggunakan alat cetak, khususnya tablet single punch dengan skala tekanan mesin 0, dengan masing-masing tablet seberat 560 mg. Menilai karakteristik fisik tablet, termasuk evaluasi organoleptis, konsistensi bobot, kerapuhan, kekerasan, dan waktu hancur.

## **10. Pengujian sifat fisik dan stabilitas granul ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*)**

**10.1 Uji sudut diam.** Granul yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam corong dengan bagian bawahnya tertutup kemudian granul akan mengalir bebas setelah penutupnya dibuka lalu dilakukan pengukuran diameter kerucut dan tinggi granul menggunakan jangka sorong. granul memenuhi persyaratan dengan nilai sudut diam  $\leq 30^\circ$  menunjukkan sifat alir yang sangat baik (Kalalo *et al.*, 2019). Sudut diam dihitung dengan rumus :

$$\text{tengen } \alpha = \frac{H (\text{tinggi kerucut})}{R (\text{jari-jari kerucut})}$$

**10.2 Uji pengetapan (*Carr's index*).** Sejumlah 50 gram granul dimasukkan ke dalam gelas ukur 100 mL (V<sub>0</sub>). Pastikan gelas ukur terpasang pada volumenometer dan dilakukan pengetapan menggunakan *tapping device* kemudian catat sebagai volume awal (V<sub>0</sub>). Kemudian dimampatkan sampai volume konstan dan dicatat sebagai volume akhir (V<sub>t</sub>). Granul yang baik memiliki sifat alir bila indeks pemampatan (T%) yang dihasilkan kurang dari 20% (USP, 2018). Hasil pengetapan dapat dihitung dengan nilai Tap (%) :

$$\text{Tap } (\%) = \frac{(V_0 - V_t)}{V_0} \times 100\%$$

## **11. Pengujian sifat fisik dan stabilitas tablet ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*)**

**11.1 Organoleptik.** Pemeriksaan sifat fisik yang dapat dinilai menggunakan mata tanpa bantuan alat yaitu dengan cara mengamati tablet ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*) meliputi pemeriksaan pengamatan pada warna, bau, dan rasa (BPOM, 2019).

**11.2 Uji keseragaman bobot.** Menimbang tablet sebanyak 20 tablet satu persatu, kemudian bobot rata-rata tiap tablet dihitung. Tidak boleh lebih dari 2 tablet yang masing-masing bobotnya menyimpang

dari bobot rata-ratanya lebih besar dari harga yang ditetapkan kolom A dan tidak satu tablet pun yang bobotnya menyimpang dari bobot rata-ratanya lebih besar dari harga yang tertera pada kolom B (BPOM, 2019).

**11.3 Uji kekerasan.** Tablet diambil dengan jumlah 10 tablet, kemudian tekan tombol on, skala pada hardness tester diubah pada satuan kg jika satuan sebelumnya newton dan diposisikan pada angka nol (0) Kemudian letakkan satu tablet ditengah pada alat pengukur kekerasan tablet (hardness tester) lalu putar sekrup kedepan sampai tablet pecah. Kekerasan tablet ditunjukkan dengan skala (kg) yang tertera pada alat saat tablet pecah. Kekerasan tablet yang baik adalah 4-10 kg (Ira dan Dwi, 2019).

**11.4 Uji kerapuhan.** Tablet yang digunakan untuk diuji sebanyak 20 tablet, terlebih dahulu dibersihkan dari debu lalu ditimbang, kemudian tablet dimasukkan dalam alat friability tester dan diputar sebanyak 100 putaran (4 menit), setelah itu tablet dibersihkan kembali dari debu. Kemudian ditimbang kembali dan dihitung prosentase kehilangan bobot sebelum dan sesudah perlakuan, tablet dikatakan baik jika nilai kerapuhan < 1% (Arulkumaran & Padmapreetha, 2014).

**11.5 Uji waktu hancur.** Lima tablet dimasukkan dalam tabung yang berbentuk keranjang, lalu dinaik turunkan secara teratur 30 kali setiap menit dalam medium air dengan suhu 37°C. Tablet dikatakan hancur apabila tidak ada bagian tablet yang tertinggal diatas kasa. Syarat uji waktu hancur untuk tablet tidak bersalut adalah kurang dari 30 menit (BPOM, 2019).

## **12. Uji aktivitas analgetik tablet ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*)**

**12.1 Pengujian sediaan tablet daun sirsak.** Suspensikan masing-masing tablet menggunakan CMC-Na sebelum dioralkan ke mencit dengan cara digerus bersama CMC-Na hingga 10 ml. Sebelum diuji ditimbang terlebih dahulu untuk menentukan dosisnya. Hewan uji diberi perlakuan per oral dalam bentuk larutan yaitu :

Kelompok 1 (kontrol positif)	Diberikan paracetamol 65 mg / 20 KgBB mencit.
Kelompok 2 (kontrol negatif)	Diberikan CMC-Na.
Perlakuan 1	Diberikan tablet ekstrak daun sirsak (formula 1) 17,68 mg/KgBB mencit

---

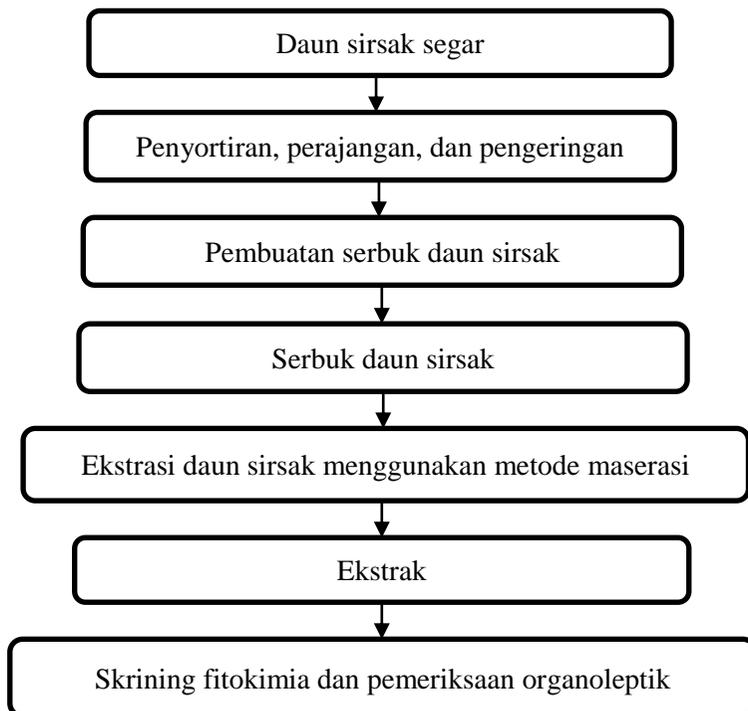
Perlakuan 2	Diberikan tablet ekstrak daun sirsak (formula 2) 17,68 mg/KgBB mencit
Perlakuan 3	Diberikan tablet ekstrak daun sirsak (formula 3) 17,68 mg/KgBB mencit

---

**12.2 Pengujian hewan uji.** Setelah mencit putih jantan diaklimatisasi terlebih dahulu 7 hari. Sewaktu proses aklimatisasi hewan uji diberi makan serta minum sebagaimana biasanya. Kemudian hewan uji dibagi menjadi 5 kelompok, dengan kriteria berat badan mencit dewasa 20-40 gram (jantan) dan umur sekitar 35 hari dan selama masa aklimatisasi serta tidak menunjukkan terdapat gejala tidak normal secara visual. Ketika semua kelompok sudah melakukan perlakuan hewan uji maka diinduksi secara intra peritonial Asam Asetat 75 mg/kgBB mencit selama 15-30 menit, hewan uji tersebut akan menggeliat. Kemudian mencatat jumlah kumulatif yang ada pada setiap selang waktu 5 menit selama 60 menit.

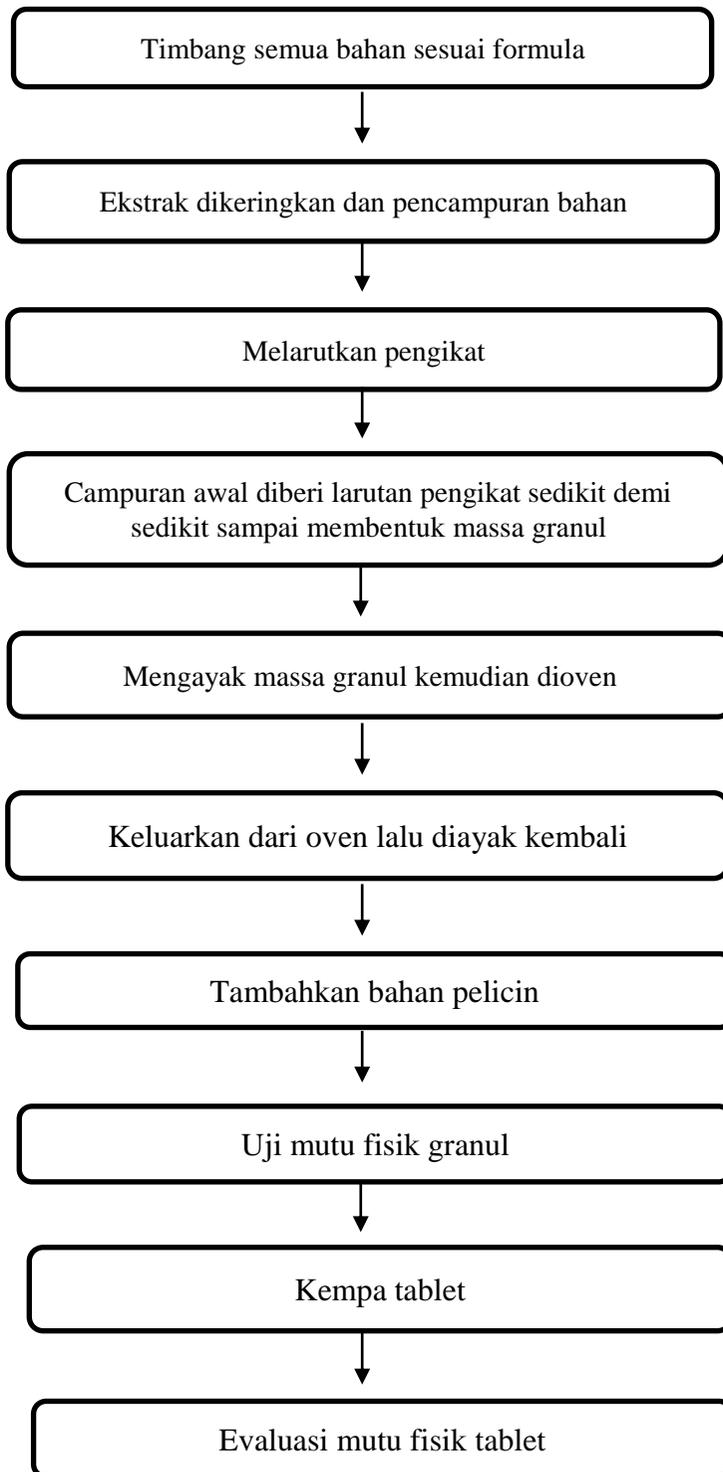
## E. Skema Penelitian

### 1. Pembuatan ekstrak



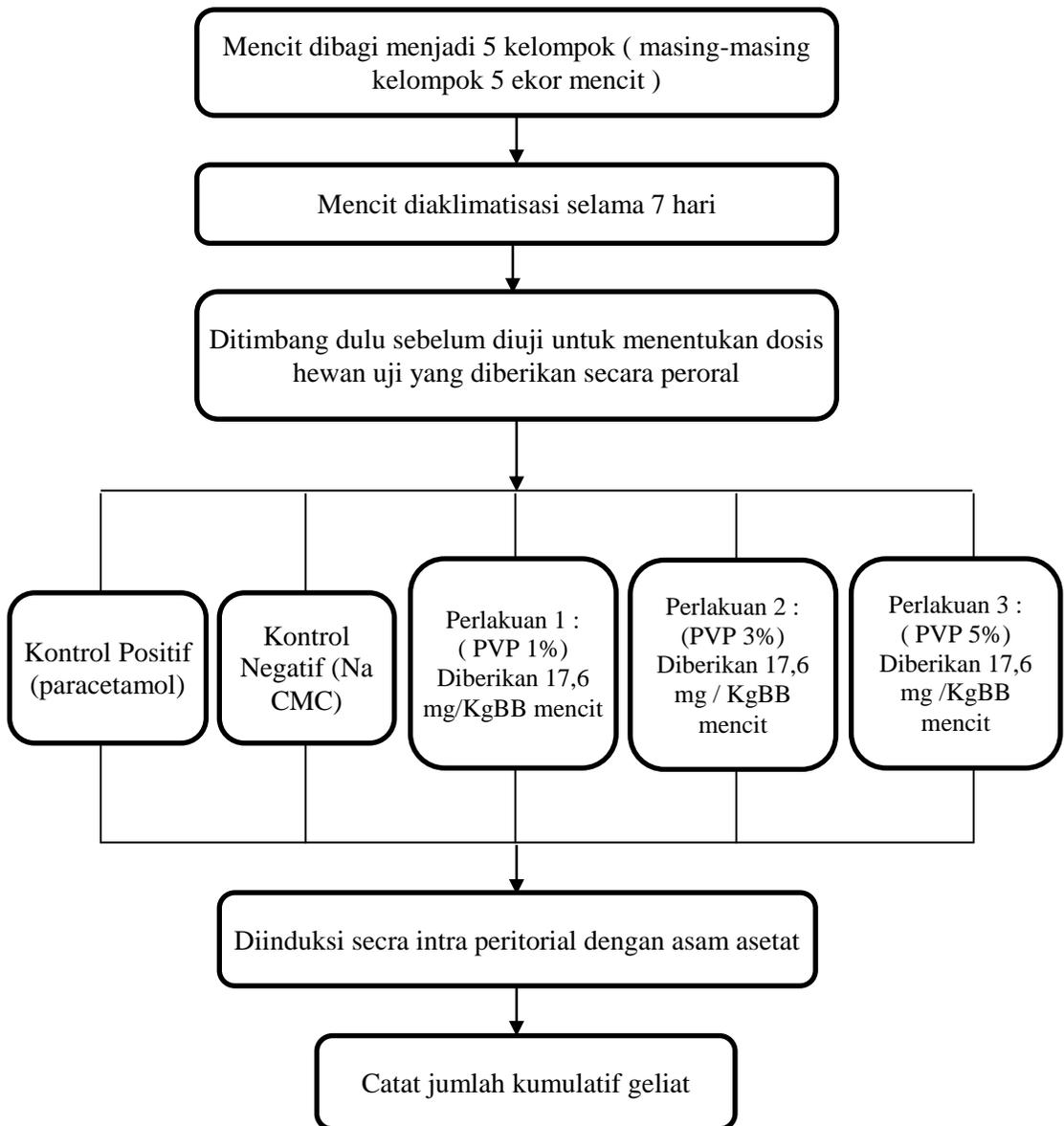
**Gambar 4. Skema Pembuatan Ekstrak daun sirsak**

## 2. Pembuatan tablet



Gambar 5. Skema Pembuatan Tablet

### 3. Pengamatan perlakuan uji



**Gambar 6. Skema Perlakuan Hewan Uji**

### F. Analisis Hasil

Tablet dari setiap formula diuji dengan uji mutu fisik tablet meliputi organoleptic, keseragaman bobot, kerapuhan, dan waktu hancur tablet.

Data uji analgetik hewan uji diberi perlakuan per oral dengan control positif, negative, perlakuan 1, 2 dan 3. Setelah itu diinduksi secara intra peritoneal asam asetat selama 15 – 30 menit hewan uji akan menggeliat. Kemudian catat jumlah kumulatif pada setiap selang waktu 5 menit selama 60 menit.

Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas untuk mengetahui normal tidaknya data. Uji normalitas akan menggunakan *Kolmogorov Smirnov* dengan menggunakan pendekatan metode *asymptotic*. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dengan pendekatan *levene* untuk mengetahui data terdistribusi secara homogen.

Analisis parametris dilakukan menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) *one-way* dengan menggunakan taraf kepercayaan 95%. Tujuan dilakukannya metode ANOVA yaitu untuk mengetahui adanya pengaruh variasi konsentrasi PVP terhadap masing-masing formula dilihat dari signifikan pada output.