

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi merupakan keseluruhan unit atau individu yang digunakan sebagai ruang lingkup yang ingin diteliti. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang diperoleh dari Kelurahan Mojosongo, Kecamatan Jebres, Kota Surakarta, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel merupakan sebagian kecil dari populasi yang ingin diteliti. Sampel penelitian ini adalah daun melinjo yang diambil dari populasi tersebut. Pengambilan sampel dilakukan secara acak dengan mempertimbangkan keadaan daun melinjo. Kriteria daun melinjo yang diambil pada penelitian ini adalah daun melinjo segar berwarna hijau tua. Pengambilan sampel dilakukan pada siang hari dalam keadaan kering agar tidak terjadi pembusukan.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun melinjo dengan menggunakan pelarut etanol 96%.

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas analgetik sentral dari ekstrak etanol daun melinjo.

Variabel utama yang ketiga dalam penelitian ini adalah metode *tail flick* pada hewan uji.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama memuat identifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung. Variabel yang diteliti terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

2.1. Variabel bebas. Variabel bebas yang dimaksud pada penelitian ini adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun melinjo dengan variasi dosis yang diberikan pada hewan uji mencit.

2.2. Variabel tergantung. Variabel tergantung yang dimaksud pada penelitian ini adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian dan merupakan akibat dari variabel bebas kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas analgetik dari ekstrak etanol daun melinjo dengan metode *tail flick*.

2.3. Variabel terkendali. Variabel terkendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung selain variabel bebas sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh penelitian lain secara tepat. Variabel dalam penelitian ini, yaitu kondisi pengukur atau peneliti, laboratorium, dan kondisi fisik dari hewan uji yang meliputi berat badan, usia, lingkungan, tempat hidup, dan jenis kelamin.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun melinjo adalah daun segar yang berwarna hijau tua diperoleh dari Kelurahan Mojosongo, Kecamatan Jebres, Kota Surakarta, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun melinjo adalah serbuk yang didapat dari daun melinjo yang telah dicuci bersih, dirajang, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu $\pm 55^{\circ}\text{C}$ sampai kering lalu diblender dan diayak.

Ketiga, ekstrak etanol daun melinjo adalah ekstrak hasil maserasi serbuk daun melinjo dengan menggunakan pelarut etanol 96% yang kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Keempat, hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan usia 2-3 bulan dengan berat antara 20-30 gram.

Kelima, aktivitas analgetik adalah kemampuan ekstrak etanol daun melinjo dalam mengurangi nyeri dengan respon penarikan ekor saat pemberian rangsang termal panas yang dihasilkan dari metode *tail flick*.

Keenam, dosis efektif adalah dosis terkecil yang sudah dapat memberikan efek terapeutik dan sebanding dengan kontrol pembanding obat analgetik

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan untuk membuat simplisia meliputi neraca analitik, pisau untuk merajang, oven, blender, ayakan. Alat yang

digunakan untuk membuat ekstrak etanol 96% meliputi bejana maserasi, batang pengaduk, kain flanel, kertas saring, *rotary evaporator*, alat-alat gelas, cawan porselen, *water bath*, *moisture balance*. Alat yang digunakan untuk pengkajian *tail flick analgesiometer*, kandang mencit, jarum sonde oral, alat-alat gelas, timbangan mencit, sarung tangan.

2. Bahan

2.1. Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang masih segar dan daunnya berwarna hijau tua diperoleh dari Kelurahan Mojosongo, Kecamatan Jebres, Kota Surakarta, Jawa Tengah.

2.2. Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 96% yang digunakan sebagai pelarut dalam ekstraksi, tramadol sebagai kontrol positif, CMC-Na 0,5% sebagai kontrol negatif. Terdapat bahan-bahan yang digunakan untuk skrining fitokimia yaitu alkohol, amil alkohol, serbuk Mg, HCl pekat, FeCl₃ 1%, akuadet, HCl 1N, HCl 2%, reagen dragendorff, reagen mayer.

2.3. Hewan uji. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan usia 2-3 bulan dengan berat antara 20-30 gram. Hewan tersebut diperlihara pada Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Sebelum dilakukan penelitian mengenai aktivitas analgetik dari daun melinjo terlebih dahulu dilakukan determinasi. Determinasi merupakan langkah awal dalam penelitian untuk mengetahui kebenaran mengenai tanaman yang akan diujikan dengan maksud agar menghindari kesalahan dalam pengumpulan berdasarkan ciri-ciri morfologi tanaman terhadap kepustakaan dan dapat dibuktikan. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang diperoleh dari Kelurahan Mojosongo, Kecamatan Jebres, Kota Surakarta, Jawa Tengah. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Penyiapan dan pengumpulan bahan

Pengumpulan bahan baku daun melinjo diambil Bulan April 2024 saat masih segar sebanyak 3 kg, diperoleh di Kelurahan Mojosongi, Kecamatan Jebres, Kota Surakarta, Jawa Tengah. Daun

melinjo yang telah terpilih kemudian dilakukan pencucian pada air mengalir untuk menghilangkan cemaran atau kotoran yang masih melekat. Daun melinjo dirajang setelah dirajang daun melinjo dikeringkan menggunakan oven $\pm 55^{\circ}\text{C}$ hingga mengering dengan tujuan untuk mengurangi kadar air dan mencegah terjadinya pembusukan oleh mikroorganisme yaitu bakteri setelah daun kering dihaluskan menggunakan blender dan diayak hingga didapatkan serbuk halus.

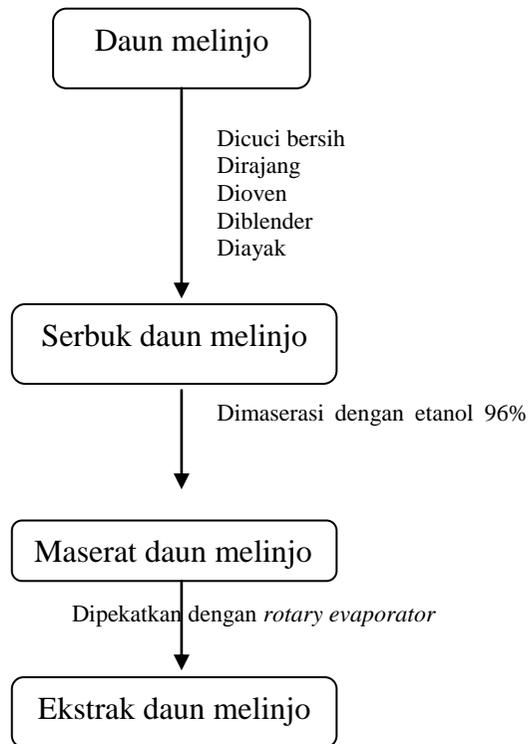
3. Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun melinjo dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*, dengan cara menimbang serbuk daun melinjo ± 2 gram dan dimasukkan dalam wadah. Suhu diatur 105°C dan tunggu sampai pemanasan berhenti. Dicatat hasil susut pengeringan pada alat dalam satuan persen (%). Penetapan susut pengeringan dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Susut pengeringan yang memenuhi syarat jika kadar air suatu serbuk simplisia tidak lebih dari 10% (Depkes, 2010).

4. Pembuatan ekstrak etanol daun melinjo

Serbuk daun melinjo diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:10 bagian. Serbuk daun melinjo ditimbang sebanyak 250 gram kemudian dimasukkan ke dalam botol kaca berwarna gelap, ditambahkan dengan 10 bagian etanol 96% kemudian ditutup dan digojok, setelah itu dидiamkan pada ruangan yang terhindar dari sinar matahari, setelah dидiamkan lalu disaring dengan kain flanel kemudian disaring lagi dengan kertas saring. Ampas yang telah disaring ditambahkan 50% dari total pelarut awal diamkan selama 2 hari, kemudian disaring menggunakan kain flanel dan kertas saring hasil filtrat awal dan akhir dijadikan satu dan diupkan dengan *rotary evaporator* dilanjutkan dengan menggunakan *water bath* sampai dihasilkan ekstrak kental (FHI edisi II, 2017). Rendemen yang dihitung adalah presentasi bobot (b/b) antara rendemen dan bobot simplisia yang digunakan dalam penimbangan. Dihitung rendemen dengan rumus berikut :

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



Gambar 6. Skema pembuatan ekstrak etanol daun melinjo.

5. Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak

Uji ini dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan dalam ekstrak daun melinjo. Identifikasi kandungan senyawa kimia bertujuan untuk menetapkan keberadaan senyawa kimia dalam ekstrak daun melinjo. Identifikasi kandungan senyawa kimia dalam serbuk dan ekstrak etanol meliputi senyawa flavonoid, tanin, saponin dan alkaloid.

5.1. Flavonoid. Menimbang serbuk atau ekstrak daun melinjo ditimbang sebanyak 5 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml air panas, ditambah 0,1 gram serbuk Mg, 2 ml larutan alkohol: HCl (1:1) dan pelarut amil alkohol, kemudian dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Reaksi hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes, 1995).

5.2. Saponin. Menimbang sebanyak 0,5 g serbuk atau ekstrak daun melinjo dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml air panas kemudian didinginkan, dikocok kuat-kuat selama 10 detik, jika terbentuk buih yang menetap ± 10 menit, setinggi 1-10 cm dan dengan penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Depkes, 1980).

5.3. Alkaloid. Ekstrak atau serbuk secukupnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi dilarutkan dengan aquadest 10 ml dan diteteskan 3 tetes HCl pekat lalu dipanaskan hingga mendidih kemudian dibagi ke dalam dua tabung reaksi yang masing-masing ditambahkan 3 tetes Mayer dan 3 tetes Dragendrof. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih pada Mayer dan endapan jingga pada Dragendrof menunjukkan positif alkaloid (Sari, 2010).

5.4. Tanin. Ekstrak atau serbuk secukupnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian larutkan dengan 2 ml aquadest, kemudian ditambahkan 1-2 tetes FeCl₃ 1%. Terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan positif tanin (Safitri, 2013).

6. Penetapan dosis

6.1. Penetapan dosis tramadol. Dosis tramadol ditentukan berdasarkan faktor konversi manusia. Dosis lazim tramadol adalah 50 mg sekali pakai. Konversi dosis manusia dengan berat badan 70 mg/kg ke mencit 20 gram adalah 0,0026, maka dosis tramadol yang diberikan adalah $50 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,13 \text{ mg}/20\text{gBB}$ mencit.

6.2. Penetapan dosis ekstrak etanol daun melinjo. Landasan untuk penentuan dosis ekstrak menggunakan acuan dari jurnal (Adikusuma *et al*, 2016) “Aktivitas analgetik ekstrak etanol daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.) pada mencit putih (*Mus musculus*) jantan”. Jurnal tersebut menggunakan tiga variasi dosis yaitu 6,48 mg/kgBB, 25,92 mg/kgBB, dan 51,84 mg/kgBB, dosis tersebut didapatkan dari dosis empiris penggunaan daun melinjo yaitu 2,494 yang kemudian dikonversi ke dalam dosis mencit. Dosis 51,84 mg/kgBB digunakan sebagai dosis orientasi karena dinilai paling efektif. Dosis yang telah ditetapkan setelah orientasi akan digunakan untuk penentuan dosis untuk ekstrak etanol daun melinjo dengan dosis bertingkat yaitu 1 kali dosis efektif ekstrak etanol daun melinjo, empat kali dosis efektif ekstrak etanol daun melinjo, dan delapan kali dosis efektif ekstrak etanol daun melinjo.

7. Pembuatan larutan

7.1. Larutan CMC Na 0,5%. CMC Na dibuat dengan konsentrasi 0,5% yang digunakan sebagai pembawa yang diberikan perlakuan pada kontrol negatif. Ditimbang CMC Na sebanyak 0,5 gram CMC Na, lalu dimasukkan air panas ke dalam mortir taburkan CMC Na secara merata tunggu hingga mengembang, jika CMC Na sudah mengembang gerus hingga homogen sambil menambahkan

akuades sedikit demi sedikit hingga 100 mL dan kemudian diaduk hingga homogen (Andriyani, 2017).

7.2. Pembuatan suspensi tramadol 0,25%. Ditimbang 250 mg serbuk tramadol dimasukkan ke dalam mortir ditambah CMC-Na 0,5%, dan ditambah aquadest panas. Selanjutnya digerus sampai mengembang dan menambahkan sedikit demi sedikit aquadest panas hingga 100 ml, diaduk hingga homogen. Larutan ini digunakan sebagai kontrol perbandingan.

7.3. Pembuatan suspensi sediaan uji 1%. Ditimbang CMC Na sebanyak 500 mg kemudian ditaburkan ke dalam cawan penguap yang berisi air panas secukupnya dan diaduk hingga mengembang. Ekstrak etanol daun melinjo ditimbang 1 gram, lalu digerus dalam mortir setelah itu ditambahkan mucilago CMC Na sampai volume 100 mL dan aduk sampai homogen.

8. Pengujian efek analgetik

Prosedur pengujian efek analgetik ekstrak etanol daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhadap mencit putih jantan yaitu, 25 ekor mencit percobaan terlebih dahulu diadaptasikan dengan lingkungan penelitian, dipuaskan selama 18-24 jam tetapi tetap diberikan air minum, kemudian mencit ditimbang bobotnya dan dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok, masing masing kelompok 5 ekor tikus setiap kelompok diberikan perlakuan sebagai berikut:

Kelompok I : Kontrol negatif yang diberikan per oral larutan CMC-Na 0,5%

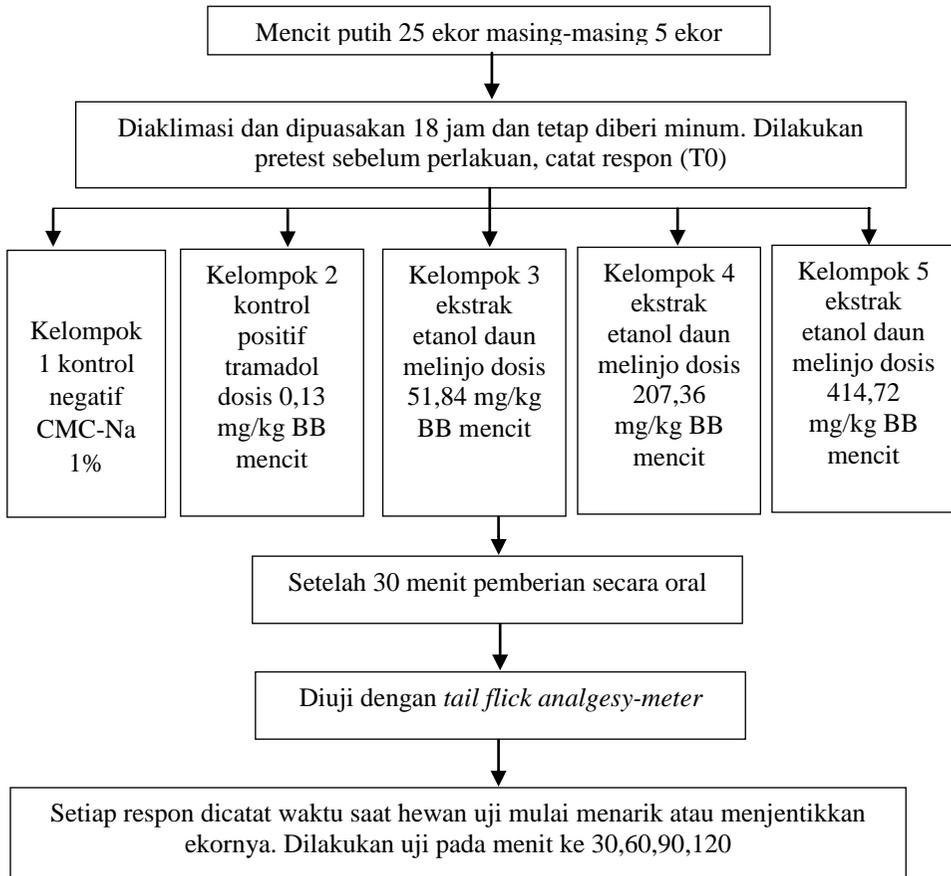
Kelompok II : Kontrol positif yang diberikan per oral larutan tramadol dengan dosis 0,13 mg/ kg BB mencit.

Kelompok III : Dosis ekstrak etanol daun melinjo 51,84 mg/ kg BB mencit

Kelompok IV : Dosis ekstrak etanol daun melinjo 207,36 mg/kg BB mencit

Kelompok V : Dosis ekstrak etanol daun melinjo 414,72 mg/kg BB mencit

Setelah diberi perlakuan dosis tunggal peroral, selanjutnya setelah 15 menit ekor tikus (1-2 cm dari ujung) diletakkan di bawah *phototransistor*, disinari dengan inframerah fokus 40. Waktu yang dicatat adalah respon mencit mengibaskan ekor (Kakoti, 2013).



Gambar 7. Skema uji analgetik ekstrak etanol daun melinjo.

9. Perhitungan aktivitas analgetik

Menurut Rochma (2016) perhitungan persen daya analgetik metode *tail flick* dinyatakan dengan persen hambatan nyeri (PHN) yang dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\%PHN = t_2 - t_1 / t_1 \times 100\%$$

Keterangan :

t_1 = rata-rata waktu respon (detik) pada pemberian kelompok kontrol negatif.

t_2 = rata-rata waktu respon (detik) pada pemberian bahan uji.

Setelah didapat data waktu respon, kemudian dibuat kurva pembandingan waktu respon ekor mengibas versus waktu uji. Kemudian dihitung AUC (*Area under the curve*) yaitu luas daerah rata-rata di bawah kurva yang merupakan hubungan rata-rata waktu respon ekor tikus mengibas tiap satuan waktu. Dengan rumus

$$AUC_{t_{n-1}}^{t_n} = \frac{V_{t_n} + V_{t_{n-1}}}{2} (t_n - t_{n-1})$$

Keterangan :

V^{t_n} = Waktu respon data perekor pada t_n

$V^{t_{n-1}}$ = Waktu respon data perekor pada t_{n-1}

E. Analisis Hasil

Data yang akan diperoleh pada penelitian ini adalah waktu reaksi respon hewan uji (dalam detik). Data disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Harga rata-rata (Mean) dan *standart deviasi* (SD) setiap kelompok dicatat. Dianalisa dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui data terdistribusi normal dan uji *Levene* untuk mengetahui homogenitas data. Jika data terdistribusi normal dan homogen maka dapat dilanjutkan dengan uji statistik menggunakan analisis variasi satu arah (*one way anova*) dan uji *Post Hoc Tukey*. Apabila data tidak homogen, maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney test* sehingga akan diketahui perbedaan antar kelompok.