

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dari tanaman kenikir yang terdapat di daerah Karangpandan, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun kenikir segar, tidak busuk, berwarna hijau, dan belum berubah warna yang diperoleh dari daerah Kecamatan Karangpandan, Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan April 2024.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

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

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

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

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang diidentifikasi dan diklasifikasikan ke dalam beberapa macam variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol.

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas adalah suatu variabel yang variasinya mempengaruhi variabel lain. Variabel bebas dapat dimanipulasi agar efeknya terhadap variabel lain dapat diamati dan dapat diukur. Dalam penelitian ini variabel bebasnya adalah dosis ekstrak etanol daun kenikir yang diinduksi pada hewan uji.

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung adalah suatu variabel yang variasinya dipengaruhi oleh beberapa variabel lain. Variabel tergantung yang dimaksudkan dalam penelitian ini adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dari penelitian ini adalah daya analgetik ekstrak etanol daun kenikir yang diuji dengan metode *tail flick*.

2.3 Variabel terkontrol. Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat, sehingga variabel tersebut perlu ditetapkan kualifikasi lain. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah jenis kelamin, kondisi fisik maupun lingkungan, kondisi laboratorium dan kondisi peneliti.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun kenikir adalah daun yang dipetik dalam keadaan masih segar, berwarna hijau, tidak busuk, bebas dari hama diambil dari desa Doplang, Kecamatan Karangpandan, Karanganyar pada bulan April 2024.

Kedua, serbuk daun kenikir adalah serbuk yang didapat dari daun kenikir yang dicuci bersih, dan dikeringkan oven pada suhu 50°C kemudian diserbuk, diblender dan diayak dengan ayakan nomor 60.

Ketiga, ekstrak etanol daun kenikir adalah ekstrak hasil maserasi serbuk daun kenikir menggunakan pelarut etanol 96%, kemudian diuapkan dengan evaporator sampai kental.

Keempat, hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan dengan berat antara 20 – 30 gram dan berumur 2 – 3 bulan.

Kelima, daya efek analgetik adalah penghilangan rasa nyeri yang diuji dengan metode *tail flick*.

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

Ketujuh, dosis efektif adalah dosis terkecil yang sudah dapat menimbulkan efek terapeutik dan sebanding dengan kontrol pembanding.

C. Bahan dan Alat

1. Alat

Alat yang digunakan untuk membuat simplisia adalah neraca analitik, blender, ayakan nomor 60 dan oven. Alat yang digunakan untuk membuat ekstrak etanol 96% adalah botol maserasi, batang pengaduk, *rotary evaporator*, gelas ukur, *moisture balance* dan kain flanel. Alat untuk pengkajian aktivitas analgetik yaitu timbangan mencit, neraca analitik, *tail flick analgesy-meter*, spuit injeksi, jarum sonde oral, *beaker glass*, sarung tangan dan *stopwatch*.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan adalah daun kenikir yang segar dari daerah Karangpandan, Karanganyar, Jawa Tengah.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 96% sebagai cairan penyari, tramadol sebagai kontrol positif dan Na-CMC sebagai kontrol negatif, dan aquadest.

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

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk menetapkan kebenaran sampel daun kenikir dengan mencocokkan ciri-ciri makroskopis dan mikroskopis daun kenikir dengan acuan buku, serta dibuktikan di Laboratorium Biologi Universitas Setia Budi, Surakarta.

2. Pengambilan bahan

Daun kenikir segar, berwarna hijau, tidak busuk, yang diambil dari daerah Karangpandan, Karanganyar, Jawa Tengah.

3. Pembuatan serbuk daun kenikir

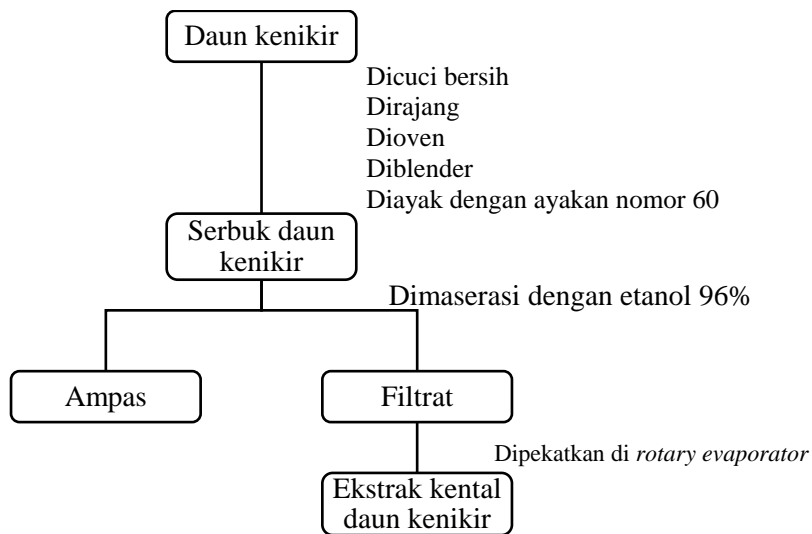
Tanaman daun kenikir yang sudah dipanen \pm 5 kg dibersihkan dari cemaran kotoran atau air mengalir, dirajang, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C sampai kering. Serbuk kemudian diblender dan diayak menggunakan ayakan nomor 60 sehingga diperoleh derajat kehalusan yang diinginkan.

4. Pembuatan ekstrak etanol serbuk daun kenikir

Serbuk kering daun kenikir diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan bahan pelarut 1:10 bagian. Serbuk daun kenikir ditimbang sebanyak 250 gram kemudian dimasukkan ke dalam botol kaca berwarna gelap, ditambahkan 10 bagian pelarut etanol 96% kemudian ditutup dan direndam, selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Kumpulkan semua maserat kemudian uapkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak daun

kenikir kental (Depkes, 2008). Rendemen yang dihitung adalah persentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot simplisia yang digunakan dalam penimbangan.

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



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak

5. Penetapan susut pengeringan daun kenikir

Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun kenikir dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta dengan menggunakan *moisture balance*. Serbuk dan ekstrak daun kenikir ditimbang masing-masing sebanyak 2 gram, dimasukkan ke dalam alat *moisture balance* pada suhu 105°C dan dihitung sampai memberikan tanda atau bunyi. Angka yang tertera pada alat *moisture balance* adalah persen kadar lembab yang dihasilkan oleh serbuk dan ekstrak daun kenikir selama proses pemanasan, kadar kelembaban dalam serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10% (Depkes RI, 2008).

6. Identifikasi kandungan senyawa kimia daun kenikir

6.1 Flavonoid. Sebanyak 0,1 g ekstrak ditambahkan 10 mL aquadest, kemudian dipanaskan dalam penangas air sampai mendidih. Saring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditambah 100 mg serbuk Mg, 1 mL HCL pekat dan 1 mL amil alkohol kemudian dikocok dengan kuat. Uji positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Nugrahani *et al.*, 2016).

6.2 Alkaloid. Sebanyak 0,1 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 1 mL HCl 2N. Larutan yang didapat lalu dibagi menjadi 2 tabung reaksi. Tabung pertama ditambah pereaksi Dragendroff sebanyak 3 tetes dan tabung ketiga ditambah pereaksi Mayer sebanyak 3 tetes. Terbentuknya endapan jingga pada tabung pertama dan endapan putih hingga kekuningan pada tabung kedua menunjukkan adanya alkaloid (Ismiyarto, 2009).

6.3 Saponin. Sebanyak 0,1 g ekstrak ditambahkan 10 mL aquades dididihkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat dimasukkan dalam tabung reaksi dan dikocok kuat selama 10 detik dan biarkan selama 10 menit, tambahkan 1 mL HCl 2M. Adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil (Nugrahani *et al.*, 2016).

6.4 Tanin. Sebanyak 0,1 g ekstrak ditambahkan 10 mL aquadest, dididihkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat yang didapat ditambahkan FeCl₃ 1%, terbentuknya warna biru/hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin (Nugrahani *et al.*, 2016).

6.5 Steroid/triterpeneoid. Sebanyak 0,1 g ekstrak dilarutkan dengan etanol kemudian diuapkan di atas *waterbath*. Filtrat digerus dan dilarutkan dengan kloroform dalam tabung reaksi lalu ditambahkan dengan anhidra asetat sebanyak 10 tetes dan H₂SO₄ pekat sebanyak 3 tetes. Adanya steroid ditandai dengan munculnya warna hijau dan adanya triterpen ditandai dengan adanya cincin kecoklatan atau violet (Nugrahani *et al.*, 2016).

6.6 Terpenoid. Identifikasi dilakukan dengan cara 1 mL ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan kloroform dan asam sulfat pekat. Warna coklat kemerahan menunjukkan adanya terpenoid (Kalaiselvi, 2016).

7. Penetapan dosis dan pembuatan larutan

7.1 Na CMC. Larutan Na CMC 0,5% terdiri dari 500 mg serbuk Na CMC dalam 100 mL aquadest. Larutan dibuat dengan cara menimbang serbuk Na CMC sebanyak 500 mg kemudian ditaburkan di cawan penguap yang sudah berisi air panas 50 mL sedikit demi sedikit hingga mengembang. Setelah mengembang dimasukkan ke dalam mortir dan digerus dengan menambahkan sedikit demi sedikit aquadest hingga 100 mL, diaduk hingga homogen.

7.2 Tramadol. Dosis tramadol ditentukan berdasarkan faktor konversi dosis manusia. Dosis lazim tramadol sekali pakai adalah 50

mg. Konversi dosis manusia dengan berat badan 70 mg/kg ke mencit 20 g adalah 0,0026, maka dosis tramadol yang diberikan adalah $50 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,13 \text{ mg}/20 \text{ g BB mencit} = 6,5 \text{ mg/kgBB mencit}$. Larutan stok yang digunakan yaitu 0,025%. Larutan ini dibuat dengan cara satu kapsul tramadol dengan dosis 50 mg diambil setengah bagian isi kapsul dan dilarutkan dalam aquadest. Larutan dimasukkan ke dalam mortir yang berisi larutan Na CMC yang telah dikembangkan sambil menambahkan sedikit demi sedikit aquadest hingga 100 mL, diaduk hingga homogen.

7.3 Ekstrak etanol daun kenikir. Berdasarkan penelitian ekstrak etanol daun kenikir menggunakan metode *writhing test* dengan dosis 150 mg/kgBB dapat memberikan aktivitas analgetik pada mencit, maka diperoleh dosis awal sebagai dosis orientasi yang selanjutnya akan digunakan untuk penetapan dosis ekstrak daun kenikir dalam tiga peringkat dosis yang berbeda, yaitu 75 mg/kgBB, 150 mg/kgBB, dan 300 mg/kgBB. Larutan ini dibuat dengan cara menimbang ekstrak etanol daun kenikir, kemudian dilarutkan dalam aquadest. Larutan dimasukkan ke dalam mortir yang berisi larutan Na CMC yang telah dikembangkan sambil menambahkan sedikit demi sedikit aquadest hingga 100 mL, diaduk hingga homogen.

8. Uji aktivitas analgetik

Sebanyak 25 ekor mencit dilakukan aklimatisasi selama ± 18 jam dan dibagi menjadi 5 kelompok secara acak. Kelompok uji tersebut adalah sebagai berikut:

8.1 Kelompok I. Kontrol negatif yang diberikan per oral larutan Na CMC 0,5% dengan volume pemberian 0,5 mL/kgBB mencit.

8.2 Kelompok II. Kontrol positif yang diberikan per oral larutan tramadol 0,5% dengan dosis 6,5 mg/kgBB mencit.

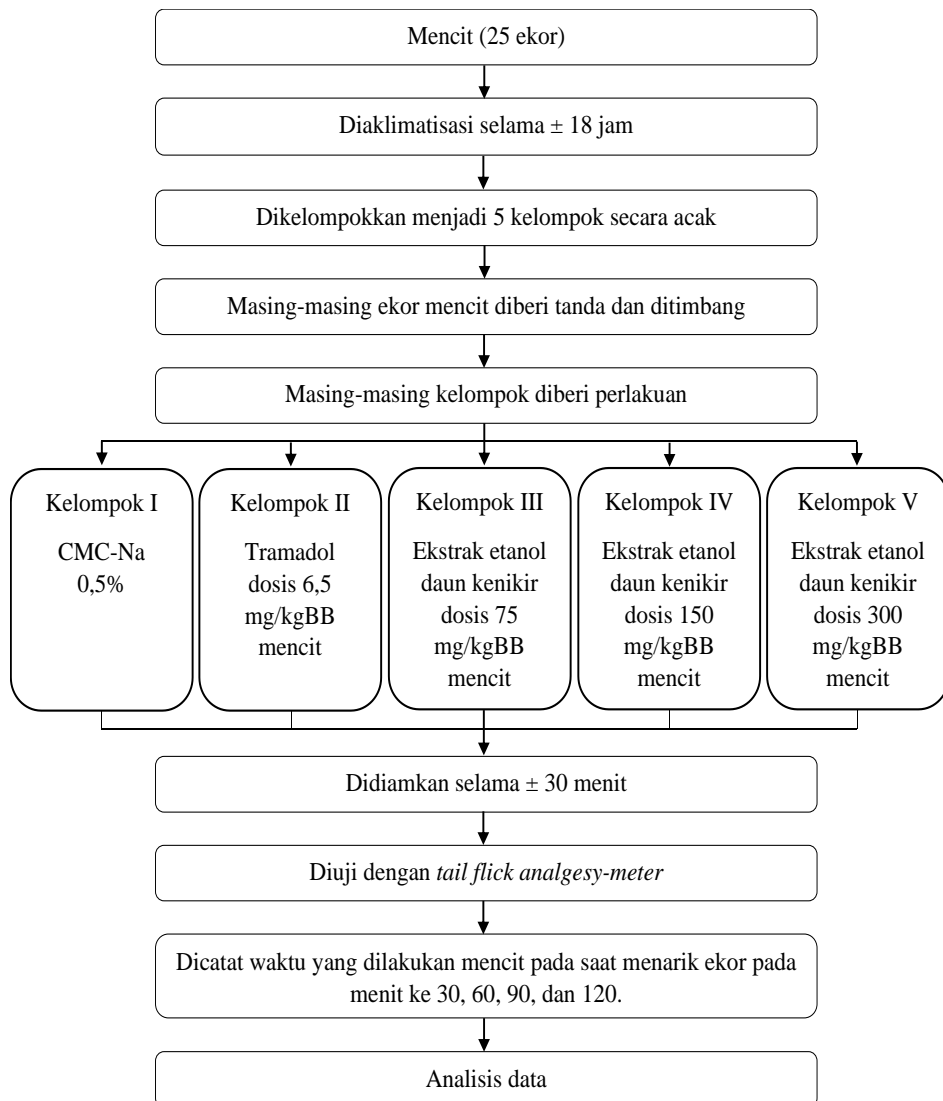
8.3 Kelompok III. Pemberian ekstrak daun kenikir dengan dosis 75 mg/kgBB yang diberikan per oral pada mencit.

8.4 Kelompok IV. Pemberian ekstrak daun kenikir dengan dosis 150 mg/kgBB yang diberikan per oral pada mencit.

8.5 Kelompok V. Pemberian ekstrak daun kenikir dengan dosis 300 mg/kgBB yang diberikan per oral pada mencit.

Hewan uji setelah diberi larutan uji sesuai kelompok, 30 menit kemudian mencit diberi rangsangan termal berupa panas pada temperatur 50°C yang diperoleh dari *infra-red* pada alat uji, alat ini

yaitu *tail flick analgesy-meter*. Pengujian ini dilakukan selama 2 jam dengan rentan waktu tercatat, yaitu 30 menit, 60 menit, 90 menit dan 120 menit.



Gambar 4. Skema uji analgetik metode *tail flick*

9. Perhitungan persen hambat nyeri metode *Tail flick*

Menurut Rochma (2016) perhitungan persen daya analgetik metode *tail flick* dinyatakan dengan persen hambat nyeri (% PHN)

yang dihitung dengan rumus : $\% \text{ PHN} = \frac{T_2 - T_1}{T_1} \times 100\%$

Keterangan :

T_1 = Rata-rata waktu respon (detik) pada pemberian kelompok kontrol negatif.

T_2 = Rata-rata waktu respon (detik) pada pemberian bahan uji.

E. Analisis Hasil

Data yang akan diperoleh pada penelitian ini adalah adalah waktu reaksi respon hewan uji (dalam detik). Data disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Harga rata-rata (*Mean*) dan standar 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*. Apabila data tidak homogen, maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney test* sehingga akan diketahui perbedaan antar kelompok.