

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah objek yang menjadi sasaran pada penelitian. Populasi yang dipakai pada penelitian ini adalah leunca (*Solanum nigrum* L.) yang didapatkan di daerah Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel adalah bagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel yang dipakai pada penelitian ini adalah daun leunca (*Solanum nigrum* L.) yang diambil bagian tanaman meliputi daun yang muda dan segar, berwarna hijau tua dan tidak busuk.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun leunca (*Solanum nigrum* L.) dan efek analgesik dengan banyak geliat yang dihasilkan oleh mencit dan efek antipiretik dengan melihat penurunan suhu pada mencit.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama adalah variabel dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung.

2.1 Variabel Bebas. Variabel bebas pada penelitian ini ialah variasi dosis ekstrak daun leunca.

2.2 Variabel Terkontrol. Variabel terkontrol pada penelitian ini ialah hewan uji seperti jenis kelamin, usia mencit, jenis mencit, jenis pakan mencit serta berat badan mencit.

2.3 Variabel Tergantung. Variabel tergantung pada penelitian ini ialah efektivitas analgesik dengan menunjukkan banyaknya geliat pada mencit dan efektivitas antipiretik dengan menunjukkan penurunan suhu pada mencit.

3. Definisi Operasional

Pertama, ekstrak daun leunca ialah sediaan kental yang diperoleh dari ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut yang digunakan yaitu etanol 96%.

Kedua, demam ialah suatu kondisi dimana terjadi peningkatan suhu tubuh yaitu di atas 37°C dan dapat dijadikan sebagai gejala awal dari suatu infeksi.

Ketiga, suhu ialah derajat celcius yang diperoleh pengukuran suhu melalui rektal menggunakan termometer digital.

Keempat, nyeri adalah perasaan sensorik dan emosional yang tidak nyaman yang berkaitan dengan kerusakan jaringan.

Kelima, respon nyeri pada mencit ialah ketika adanya geliat yaitu perut menempel ke lantai dan tarikan kedua kaki ke belakang (Audrey *et al.*, 2021).

keenam hewan uji yang digunakan pada penelitian ini yaitu mencit putih jantan galur *swiss webster*, yang berumur 2 – 3 bulan dengan berat diantara 20 gram – 40 gram.

Ketujuh, pepton ialah senyawa yang dapat menimbulkan demam. Pepton digunakan sebagai induksi demam pada mencit.

Kedelapan, aktivitas analgesik ialah kemampuan ekstrak etanol daun leunca untuk mengatasi nyeri.

Kesembilan, aktivitas antipiretik ialah kemampuan ekstrak etanol daun leunca untuk menurunkan suhu mencit.

Kesepuluh, dosis efektif ialah dosis yang mampu memberikan efek analgesik-antipiretik yang sebanding dengan kontrol positif.

C. Alat, Bahan dan Hewan Uji

1. Alat

Peralatan untuk membuat simplisia yaitu, penggilingan, blender, ayakan no 40, corong, kain flanel, kertas saring dan botol reagen, beaker glass, erlenmeyer, stopwatch, gelas ukur, timbangan analitik, timbangan hewan, jarum dan spuit injeksi, jarum berujung tumpul, Bunsen, thermometer digital, dan wadah pengamat geliat.

2. Bahan

Bahan yang dipakai pada penelitian ini yaitu, daun leunca, etanol 96%, aquadest, pepton, 10%, asam asetat 1%, CMC Na 0,5%, serbuk Mg, HCl pekat, FeCl₃ 5%, amoniak, amil alcohol, asam klorida 2N, asetat anhidrat, asam sulfat, wagner, dragendroff, mayer, dan vaselin.

3. Hewan Uji

Hewan uji yang dipakai pada penelitian ini ialah mencit putih jantan (*Mus Musculus*) dengan usia 2 – 3 bulan dan rata – rata berat badan 20 gram – 40 gram.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Sebelum dilakukan penelitian, simplisia yang digunakan akan dilakukan determinasi. Tujuan dari determinasi yaitu untuk memastikan kebenaran tentang tanaman dan untuk mencegah kesalahan dalam pengumpulan data. Sampel yang dipakai pada penelitian ini adalah daun leunca (*Solanum nigrum* L.) yang dilakukan determinasi di B2P2TOOT Tawangmangu, Jawa Tengah.

2. Pengumpulan Bahan

Daun leunca di ambil dalam keadaan segar yang diperoleh dari B2P2TOOT Tawangmangu, Jawa Tengah.

3. Pembuatan Simplisia Daun Leunca

Daun leunca setelah dikumpulkan, dibersihkan dari kotoran kemudian dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Selanjutnya dilakukan perajangan pada daun leunca lalu diletakkan di atas loyang kemudian dikeringkan dalam oven 50°C sampai kering kemudian blender sampai halus dan diayak menggunakan ayakan no 40 (Kemenkes, 2017).

4. Uji Susut Pengeringan Serbuk Simplisia Daun Leunca

Ditimbang sebanyak 1 – 2 g serbuk daun leunca, masukan ke dalam wadah yang sudah dipanaskan dan ditara. kemudian keringkan pada suhu 105°C selama 1 jam dan ditimbang. Lanjutkan pengeringan dan timbang pada selang waktu 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut – turut tidak boleh lebih dari 0,25% (Kemenkes, 2017).

5. Pembuatan Ekstrak Daun Leunca

Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 600 gram, kemudian dimasukkan kedalam botol reagen berwarna hitam atau gelap dan dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 6 liter. Botol maserasi diletakkan pada suhu ruang, hindarkan dari sinar matahari langsung dan diaduk. Setelah proses maserasi selesai, dilakukan penyarian yaitu dengan pengulangan dua kali menggunakan pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah dari jumlah pelarut pertama. Maserat disaring untuk memisahkan filtrat dengan ampas menggunakan kain flannel. Filtrat dikumpulkan kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C.

Kemudian dihitung (%) rendemen dengan rumus :

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

6. Uji Kadar Air Ekstrak Daun Leunca

Uji kadar air ekstrak daun leunca dilakukan dengan metode gravimetri dengan cara ditimbang 10 gram sampel, lalu dimasukkan kedalam wadah yang sudah ditara. Keringkan sampel selama 5 jam pada suhu 105°C. Kemudian timbang dan keringkan kembali sampai mendapatkan bobot yang sesuai dengan jeda waktu 1 jam, dengan perbedaan antara dua penimbangan berturut – turut tidak lebih dari 0,25% (Kemenkes,2017). Susut pengeringan dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ kadar air} = \frac{\text{Bobot sampel sebelum dikeringkan} - \text{bobot sampel setelah dikeringkan}}{\text{Bobot sampel sebelum di keringkan}} \times 100\%$$

7. Identifikasi Kandungan Kimia

7.1 Identitas flavonoid. Menimbang 0,5 gram ekstrak daun leunca, lalu tambahkan serbuk Mg 0,1 gram, amil alkohol 1 – 2 tetes, dan HCl 2 tetes kemudian dikocok dan didiamkan beberapa saat hingga terjadi perubahan. Dinyatakan positif flavonoid jika warna berubah menjadi kuning, merah atau jingga pada lapisan amil alkohol. (Fauziah *et al.*, 2021).

7.2 Identitas saponin. Menimbang 0,5 gram ekstrak daun leunca masukan kedalam tabung reaksi yang telah berisi 10 ml aquades kemudian dikocok dan ditambahkan 1 tetes larutan asam klorida 2N. Amati sampel ada busa yang stabil atau tidak. Jika terbentuk busa stabil pada ketinggian 1 – 3 cm selama 30 detik, maka ekstrak mengandung saponin (Rizkita *et al.*, 2021).

7.3 Identifikasi alkaloid. Untuk mengidentifikasi mayer, wagner dan dragendroff, ditimbang 0,5 gram ekstrak daun leunca tambahkan 1 ml HCl 2 N dan 9 ml aquadest, lalu dipanaskan di atas tangas air selama 2 menit, kemudian dinginkan dan saring. Kemudian filtrat dibagi menjadi 3 bagian dan masing – masing ditetesi pereaksi yaitu mayer, wagner dan dragendroff. Pada pereaksi mayer menunjukkan hasil positif alkaloid dengan terbentuknya endapan putih atau kuning. Pada pereaksi wagner menunjukkan hasil positif alkaloid dengan terbentuknya endapan berwarna coklat kemerahan. Pada pereaksi dragendroff menunjukkan hasil positif alkaloid dengan terbentuknya endapan berwarna orange atau jingga (Bhayu, 2020)

7.4 Identifikasi steroid/triterpenoid. Menimbang sebanyak 0,5 gram ekstrak daun leunca, kemudian dilarutkan dalam aquadest

sebanyak 2 ml. Residu yang didapatkan dilarutkan dalam kloroform, ditambahkan asam asetat anhidrat sebanyak 0,5 ml, selanjutnya ditambahkan 2 ml asam sulfat (HCl) melalui dinding tabung, biarkan selama beberapa menit. Amati, hasil positif steroid jika terbentuknya cincin biru kehijauan atau cincin biru kehitaman dan hasil positif terpenoid ditandai dengan terbentuknya cincin violet, kecoklatan atau hijau kehitaman. (Bhayu, 2020).

7.5 Identifikasi tanin. Menimbang 0,5 gram ekstrak daun leunca, tambahkan FeCl_3 Sebanyak 5 tetes dan H_2SO_4 , sebanyak 1-2 tetes. Kemudian dikocok. Jika terjadi perubahan warna hitam kekuningan, maka ekstrak positif tanin (Fauziah *et al.*, 2021).

8. Pembuatan Dosis

8.1 Pembuatan pepton. Larutan pepton 10% dengan dosis 0,01 ml/ 20 gram BB mencit, larutan pepton dibuat dengan cara ditimbang 10 gram pepton. Kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquadest steril untuk injeksi.

8.2 Pembuatan asam asetat. Induksi asam asetat 1% dengan dosis 0,2 ml /20 gram BB mencit dibuat dengan mengencerkan asam asetat sebanyak 1 ml dalam 100 ml aquades dalam labu takar.

8.3 Pembuatan kontrol negatif. Membuat larutan CMC 0,5% dengan menimbang 0,5 gram Na CMC ke dalam erlenmeyer yang berisi air suling panas sebanyak 100 ml, sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan kecepatan tinggi dan dengan air panas sampai terjadi larutan koloidal yang homogen. Selanjutnya tambahkan air suling hingga 100 ml.

8.4 Penetapan dosis paracetamol. Dosis paracetamol untuk orang dewasa adalah 500 – 1.000 mg, diberikan setiap 4-6 jam sekali. Dosis maksimal sehari 4.000 mg/hari.

8.5 Penetapan dosis ekstrak daun leunca. Dosis daun leunca diambil dari dosis ekstrak etanol 96% daun leunca. Pada penelitian kali ini ekstrak daun leunca memiliki dosis efektif 350 mg/ kg BB tikus. Dosis akan diberikan pada mencit yaitu $\frac{1}{2}$ dosis efektif, 1 dosis efektif dan 2 dosis efektif.

$\frac{1}{2}$ Dosis 350 mg/Kg BB tikus = 175 mg/kg BB tikus = 245 mg/kg BB mencit

1 Dosis 350 mg/Kg BB tikus = 350 mg/kg BB tikus = 490 mg/kg BB mencit

2 Dosis 350 mg/Kg BB tikus = 700 mg/Kg BB tikus = 980 mg/kg BB mencit

9. Perlakuan dan Pengelompokan Hewan Uji

9.1 Uji efek antipiretik. Pada uji efek antipiretik dilakukan dengan menggunakan mencit putih jantan sebanyak 25 ekor. Setiap mencit ditimbang dan diberi tanda kemudian dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dimana tiap kelompok terdapat 5 ekor mencit. Sebelum dilakukan perlakuan mencit diadaptasi dalam ruangan selama 1 minggu, lalu dipuasakan selama 18 jam dan tetap diberi makan dan minum. Kemudian diukur suhu rektal untuk mengetahui suhu awal. Selanjutnya diinduksi dengan pepton 10%, setelah diinduksi ukur kembali suhu rektal pada mencit, untuk mengetahui kenaikan suhu setelah induksi pepton 10%. Setelah diukur kembali suhunya tiap – tiap kelompok diberi perlakuan yakni :

Kelompok 1 diberi CMC Na 0,5 % sebagai kontrol negatif.

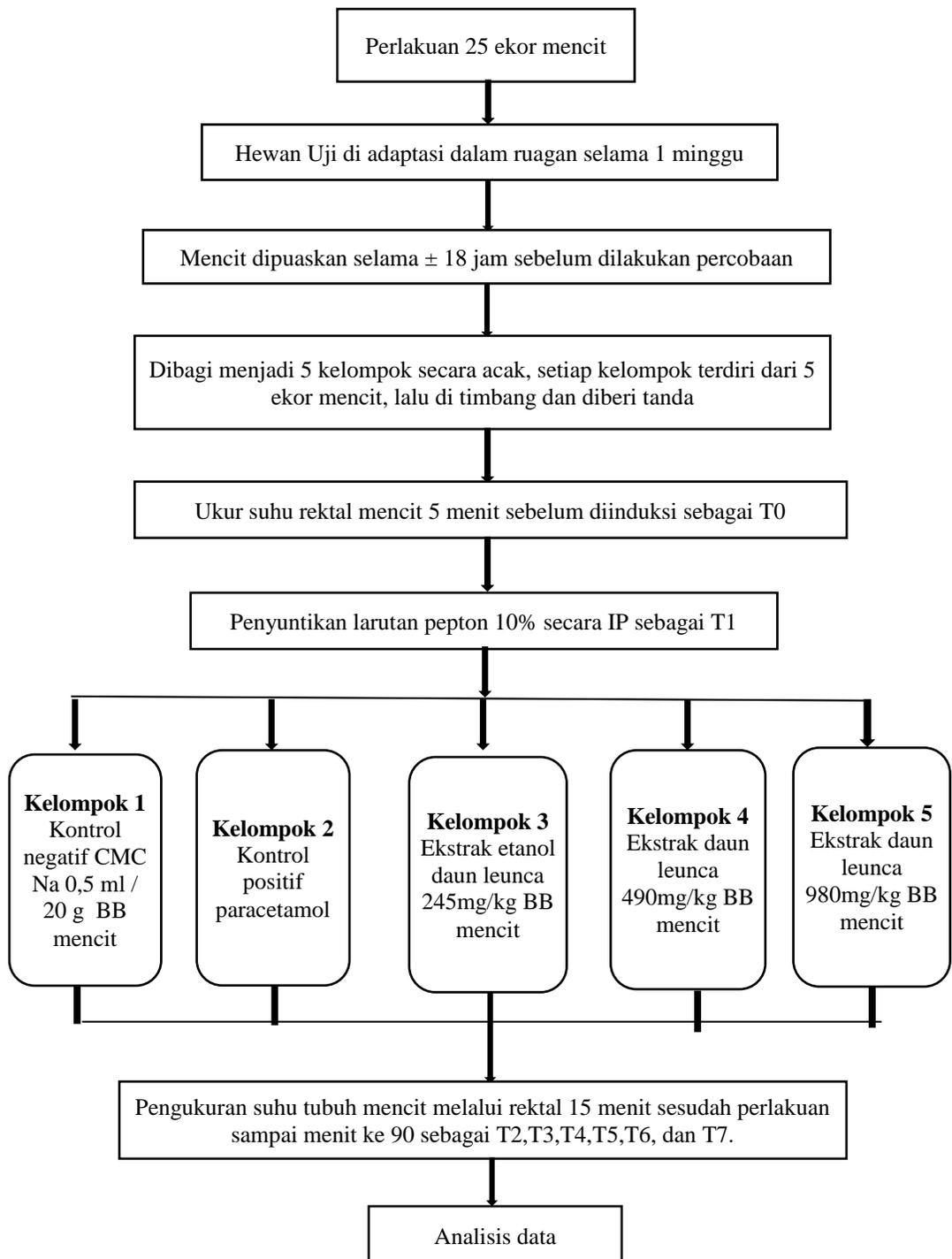
Kelompok 2 diberi parasetamol sebagai kontrol positif

Kelompok 3 diberi ekstrak daun leunca dengan dosis 245mg/kgBB mencit.

Kelompok 4 diberi ekstrak daun leunca dengan dosis 490 mg/kgBB mencit.

Kelompok 5 diberi ekstrak daun leunca dengan dosis 980 mg/kg BB mencit.

Untuk menunjukkan pengaruh pada setiap kelompok perlakuan, suhu tubuh langsung diukur setiap 15 menit hingga 90 menit menggunakan termometer digital. Alur penelitian uji antipiretik ditunjukkan dalam skema berikut.



Gambar 9. Alur uji Antipiretik

9.2 Uji efek analgesik. Pada uji efek analgesik, dilakukan dengan menggunakan mencit putih sebanyak 25 ekor. Setiap mencit ditimbang dan diberi tanda kemudian dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, dimana tiap kelompok terdapat 5 ekor mencit. Sebelum dilakukan perlakuan mencit diadaptasi selama 1 minggu di dalam ruangan, kemudian dipuaskan selama 18 jam dan tetap diberi makan dan minum. Setelah itu, diinduksi larutan asam asetat 1% secara intraperitoneal, kemudian letakan mencit di atas papan pengamatan selama maksimal 5 menit untuk melihat geliat pada mencit. Setelah melihat geliat kelompok diberi perlakuan yakni :

kelompok 1 diberikan kontrol negatif yang diberikan CMC Na 0,5%.

Kelompok 2 diberikan kontrol positif paracetamol

Kelompok 3 diberikan ekstrak daun leunca 245 mg/kgBB mencit

Kelompok 4 diberikan ekstrak daun leunca 490 mg/kgBB mencit

Kelompok 5 diberikan ekstrak daun leunca 980 mg/kgBB mencit

Untuk melihat efek dari masing – masing kelompok perlakuan dilihat dengan jumlah geliat selama maksimal 5 menit, setiap 15 menit sampai ke menit 90. Alur penelitian uji analgesik ditunjukkan pada skema berikut.

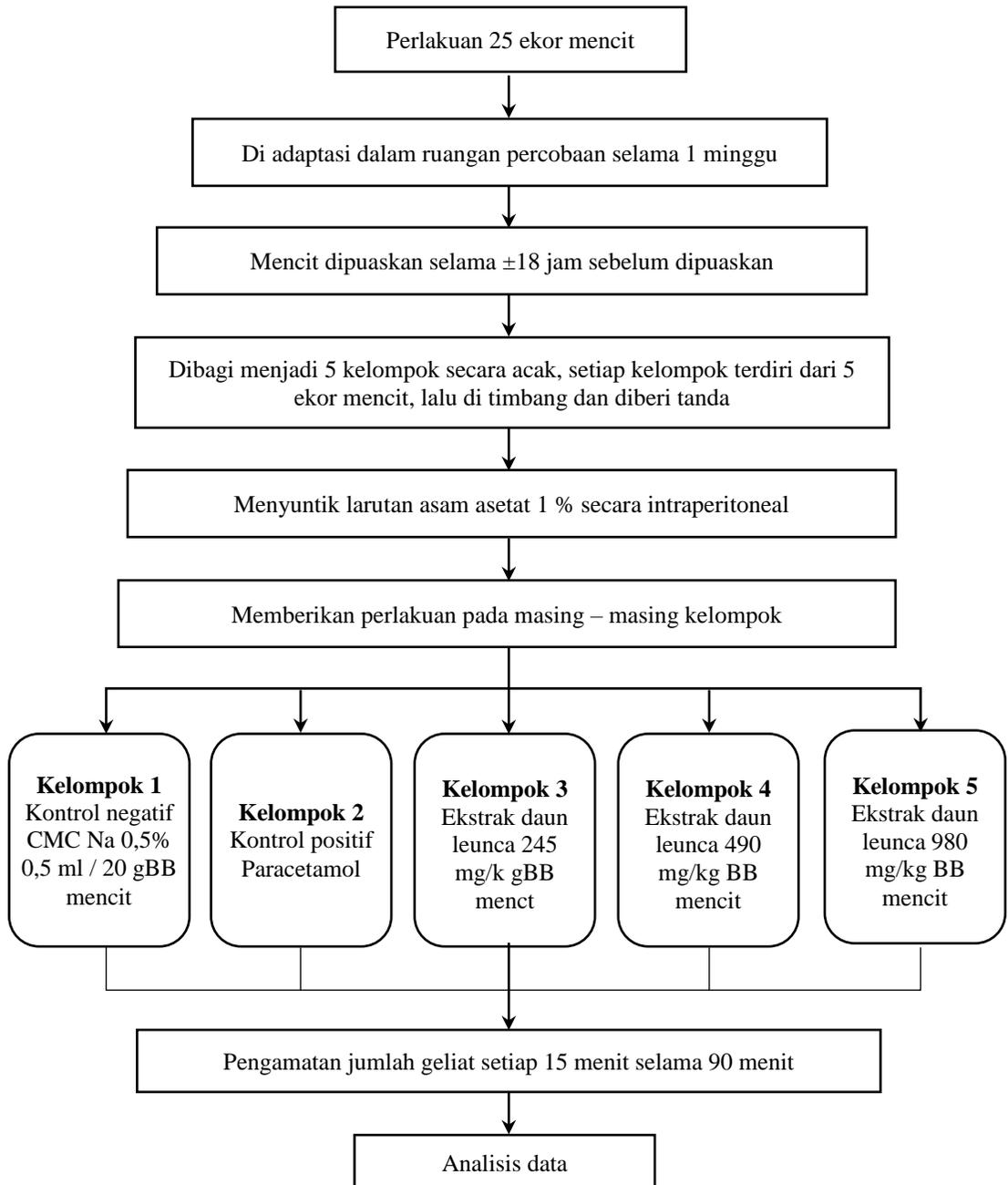
Perhitungan persentase daya analgesik, pada masing – masing kelompok dapat ditentukan setelah didapatkan jumlah kumulatif geliat mencit selama 90 menit dengan menghitung persentase daya analgesiknya pada masing – masing kelompok dengan rumus besar penghambat jumlah geliat dihitung berdasarkan persamaan *Handerson* dan *Forsait* yaitu :

$$\% \text{ Proteksi} = 100 - \left[\frac{\text{Jumlah kumulatif geliat hewan uji setelah pemberian obat}}{\text{Jumlah kumulatif geliat kel kontrol negatif}} \right] \times 100 \%$$

(Winarti dan Wantiyah, 2011).



Gambar 10. Papan pengamat uji analgesik



Gambar 11. Alur uji Analgesik

E. Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam mengolah data pada penelitian ini dimulai dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk menguji normalitas data. Bila hasil yang didapatkan normal ($\geq 0,05$), maka uji dapat diteruskan menggunakan pengujian homogenitas data, kemudian uji One Way ANOVA untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar sampel, lalu diteruskan ke uji *Post hoc* Tukey, maupun dilanjutkan menggunakan *Repeated Measured* guna melihat adanya korelasi hubungan antara waktu dengan variabel tergantung yang diamati.