

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah obyek yang menjadi sumber pengambilan sampel. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dari tanaman koro (*Phaseolus lunatus L.*) yang diperoleh dari Fatusene, Nusa Tenggara Timur.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang dibuat sebagai informasi untuk menyelesaikan permasalahan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun koro yang diperoleh dengan pengambilan random dalam keadaan bersih, segar dan tidak busuk dan dikumpulkan pada bulan Januari 2019.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama.

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

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas analgesik dari ekstrak etanol daun koro.

Variabel utama yang ketiga dalam penelitian ini adalah metode yang digunakan pada hewan uji adalah metode *Tail flick* dan *Writhing test*.

2. Klasifikasi variabel utama

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

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 koro 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 analgesik ekstrak etanol daun koro yang diuji dengan metode *Tail flick* dan *Writhing test*.

2.3 Variabel terkendali. Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga variabel tersebut perlu ditetapkan kualifikasi lain. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah jenis kelamin galur hewan coba, kondisi fisik maupun lingkungan, kondisi Laboratorium dan kondisi peneliti.

3. Definisi operasional variabel utama

Daun koro (*Phaseolus lunatus* L.) adalah daun yang diambil dalam keadaan segar, tidak busuk, berwarna hijau dan bebas hama yang diperoleh dari Fatusene, Nusa Tenggara Timur.

Serbuk daun koro adalah daun koro yang segar dicuci bersih dengan air mengalir, dirajang lalu dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C, kemudian diblender dan diayak dengan ayakan nomor 60.

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

Hewan percobaan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan dengan berat antara 20-30 gram dan berumur 2-3 bulan.

Daya efek analgesik adalah penghilangan rasa nyeri yang diuji dengan metode *Tail flick* dan metode *Writhing test* pada mencit putih jantan.

Aktivitas analgesik adalah kemampuan ekstrak etanol daun koro dalam mengurangi nyeri dengan respon penarikan ekor saat pemberian rangsang termal panas yang dihasilkan dari metode *Tail flick* dan respon geliat yang ditunjukkan dengan penarikan kedua kaki kebelakang dan abdomen kebawah yang dihasilkan setelah pemberian asam asetat yang dihasilkan dari metode *Writhing test*.

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

C. Alat dan Bahan

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 bejana maserasi, alat-alat gelas, *rotary evaporator*, gelas ukur, *beaker glass*, *moisture balance* dan kain flanel. Alat untuk pengkajian efek analgesik yaitu timbangan mencit, neraca analitik, *Tail flick analgesy-meter*, sput injeksi, jarum sonde oral, alat-alat gelas, sarung tangan dan *stopwatch*.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan adalah daun koro yang segar diambil dari Fatusene, Nusa Tenggara Timur.

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

2.3 Hewan uji. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan dengan berat antara 18-30 gram dan berumur 2-3 bulan (Smith & Mangkoewidjaja 1988). Hewan tersebut dipelihara di Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk menetapkan kebenaran sampel daun koro (*Phaseolus lunatus* L.) dengan mencocokkan ciri-ciri makroskopis dan mikroskopis daun koro dengan acuan buku, serta dibuktikan di Laboratorium Biologi Universitas Setia Budi, Surakarta.

2. Pengambilan bahan

Daun koro (*Phaseolus lunatus* L.) segar, berwarna hijau, tidak busuk, yang diambil dari Fatusene, Nusa Tenggara Timur.

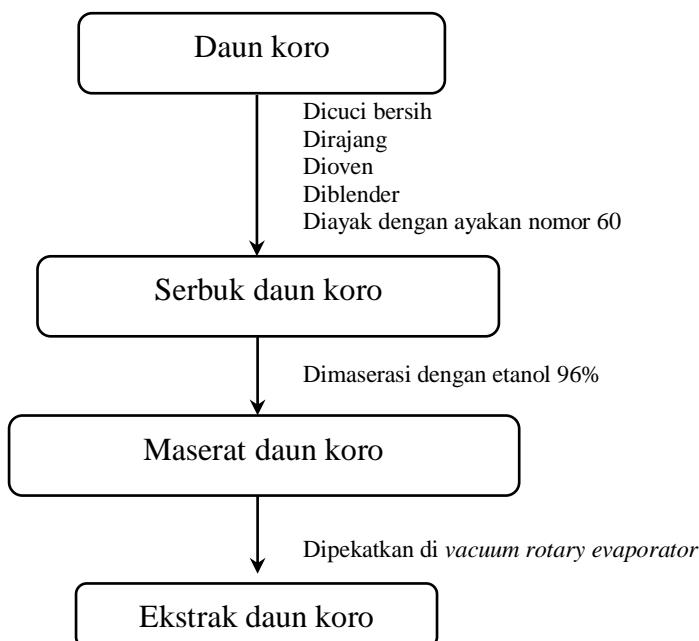
3. Pembuatan serbuk daun koro

Tanaman daun koro yang sudah dipanen ± 3 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 koro

Serbuk kering daun koro diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan bahan pelarut 1:10 bagian. Serbuk daun koro ditimbang sebangak 500 gram kemudian dimasukkan ke dalam botol kaca berwarna gelap, ditambahkan 10 bagian pelarut etanol 96% kemudian ditutup dan digojok, setelah itu botol didiamkan selama 5 hari sambil sering digojok, setelah 5 hari, saring dengan kain flanel kemudian disaring lagi dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C sehingga diperoleh ekstrak daun koro kental (Depkes RI 1986). Rendemen yang dihitung adalah presentasi bobot (b/b) antara rendemen dan bobot simplisia yang digunakan dalam penimbangan.

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



Gambar 12. Skema pembuatan ekstrak

5. Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun koro

Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun koro dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta dengan menggunakan *Moisture balance*. Serbuk dan ekstrak ditimbang masing-masing 2 gram, dimasukkan kedalam alat *Moisture balance* pada suhu 105⁰C dan dihitung sampai memberikan tanda dan bunyi. Angka yang tertera pada alat *Moisture balance* adalah persen kadar susut pengeringan yang dihasilkan oleh serbuk dan ekstrak daun koro selama proses pemanasan, kadar kelembapan tidak lebih dari 10% (Depkes RI 2008).

6. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun koro

Penetapan kadar air ekstrak dilakukan dengan cara destilasi menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Serbuk daun koro ditimbang sebanyak 20 gram dan ekstrak daun koro ditimbang sebanyak 5 gram kemudian masing-masing bahan dimasukkan kedalam tabung destilasi, ditambahkan pelarut toluen jenuh air sebanyak 200 ml (Zainab *et al.* 2016). Nyalakan penangas dan ditunggu sampai mendidih, selanjutnya pelarut toluen akan ditampung pada *stahel*. Perhatikan adanya pemisahan antara toluen dengan air pada *stahel*. Catat berapa volume air yang ditampung dan hitung kadar airnya dalam persen dengan rumus :

$$\% \text{ kadar air} = \frac{V}{b} \times 100\%$$

Keterangan :

V= volume air yang terdestilasi

b = jumlah sampel yang diambil (gram) (Depkes RI 2008).

7. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun koro

7.1 Alkaloid. Sebanyak 0,1 gram ekstrak dilarutkan dalam 10 ml CHCl₃ (kloroform) dan 4 tetes NH₄OH kemudian disaring dan filtratnya dimasukkan dalam tabung reaksi. Filtrat dikocok dengan menambahkan 10 tetes H₂SO₄ 2 M, sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan asam yang berada di atas di pisahkan dalam tabung reaksi yang lain dan ditambahkan pereaksi Mayer, Dragendorff dan Bouchardat. Pada pereaksi Mayer akan menghasilkan endapan warna putih sedangkan pada penambahan pereaksi Dragendorff menghasilkan endapan merah

jingga (Nugrahani *et al.* 2016) dan endapan coklat sampai hitam untuk reagen Bouchardat (Wardani 2013).

7.2 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 tambahkan pita Mg, 1 ml HCL pekat dan 1 ml amilalkohol kemudian dikocok dengan kuat. Uji positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah,kuning atau jingga pada lapisan amilalkohol (Nugrahani *et al.* 2016).

7.3 Tanin. Sebanyak 0,1 g ekstrak ditambahkan 10 ml aquadest, didihkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat yang didapat ditambahkan FeCl_3 1%, terbentuknya warna biru/hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin (Nugrahani *et al.* 2016).

7.4 Saponin. Sebanyak 0,1 g ekstrak ditambahkan 10 ml aquades didihkan 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).

7.5 Steroid/triterpeneoid. Sebanyak 0,1 g ekstrak dilarutkan dengan metanol kemudian diuapkan diatas waretbath. Filtrat digerus dan dilarutkan dengan kloroform dalam tabung reaksi lalu ditambahkan dengan anhidra asetat sebanyak 10 tetes dan H_2SO_4 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).

8. Penetapan dosis dan pembuatan larutan

8.1 Penetapan dosis ekstrak etanol daun koro. Berdasarkan penggunaan empiris di masyarakat digunakan 7-8 tangkai daun koro untuk mendapatkan 1 gelas minuman sebagai minuman kesehatan untuk menurunkan demam dan gangguan panas. Penetapan dosis pada penelitian ini peneliti menggunakan dosis sesuai dengan dosis empiris yang digunakan di masyarakat yaitu 7-8 tangkai daun koro dengan berat \pm 20 g dengan faktor konversi 0,0026 dan didapatkan hasil 130 mg/kgBB mencit, maka dosis awal yang selanjutnya

akan digunakan untuk penetapan variasi dosis ekstrak etanol daun koro dalam tingkat variasi konsentrasi dosis yang berbeda yaitu $\frac{1}{2}$ dosis ($130 \text{ mg/kgBB mencit} = 65 \text{ mg/kgBB mencit}$, $1 \times \text{dosis} (130 \text{ mg/kgBB mencit}) = 130 \text{ mg/kgBB mencit}$ dan $2 \times \text{dosis} (130 \text{ mg/kgBB mencit}) = 260 \text{ mg/kgBB mencit}$.

8.2 Penetapan dosis 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 $50 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,13 \text{ mg/20 g BB mencit}$.

8.3 Penetapan dosis asam mefenamat. Dosis asam menamat ditentukan berdasarkan faktor konversi dosis manusia. Dosis lazim asam mefenamat sekali pakai adalah 500 mg. Konversi dosis manusia dengan berat badan 70 mg/kg ke mencit dengan berat badan 20 g adalah 0,0026, jika berat badan mencit rata-rata 20 gram, maka dosis asam mefenamat yang diberikan adalah $500 \text{ mg} \times 0,0026 = 1,3 \text{ mg/20gBB mencit}$.

8.4 Pembuatan induksi asam asetat 1%. Induksi asam asetat 1% dibuat dengan mengencerkan asam asetat sebanyak 1 ml dalam 100 ml aquadest kedalam labu takar. BJ asam asetat 1040 - 1042 g (Depkes RI 1979).

8.5 Pembuatan larutan Na-CMC 1%. Larutan Na-CMC dibuat dengan menimbang Na-CMC 1 g dan dilarutkan dalam cawan penguap yang berisi air panas 50 ml sedikit demi sedikit hingga mengembang, setelah mengembang dimasukkan dalam mortir dan digerus dengan menambahkan aquadest sedikit demi sedikit *ad* 100 ml dan dihomogenkan.

8.6 Pembuatan larutan asam mefenamat 1%. Larutan stok ini dibuat dengan cara menimbang 25 mg serbuk asam mefenamat, dimasukkan dalam mortir ditambah Na-CMC 1% secukupnya sambil diaduk, tambahkan aquadest *ad* volume 25 ml.

8.7 Pembuatan larutan tramadol 0,5%. Larutan stok ini dibuat dengan cara 1 tablet tramadol ditimbang, dimasukkan dalam mortir ditambah Na-CMC 1% dan aquadest sambil diaduk *ad* volume 10 ml.

8.8 Pembuatan larutan ekstrak 2%. Larutan ekstrak dibuat dengan cara menimbang 1 gram ekstrak, dilarutkan dengan Na-CMC yang telah dibuat sebelumnya secukupnya dan tambahkan aquadest *ad* 50 ml.

9. Uji aktivitas analgesik

9.1 Uji efek analgesik metode *Tail flick*. Sebanyak 25 ekor mencit dibagi menjadi 5 kelompok secara acak pada tiap metode dan dipuaskan selama 18 jam dengan tetap diberi minum. Hewan uji diadaptasi pada hewan uji selama 2-3 menit, sebelum diberikan larutan uji, hewan uji dihitung terlebih dahulu t_0 .

Kelompok I Na-CMC (kontrol negatif).

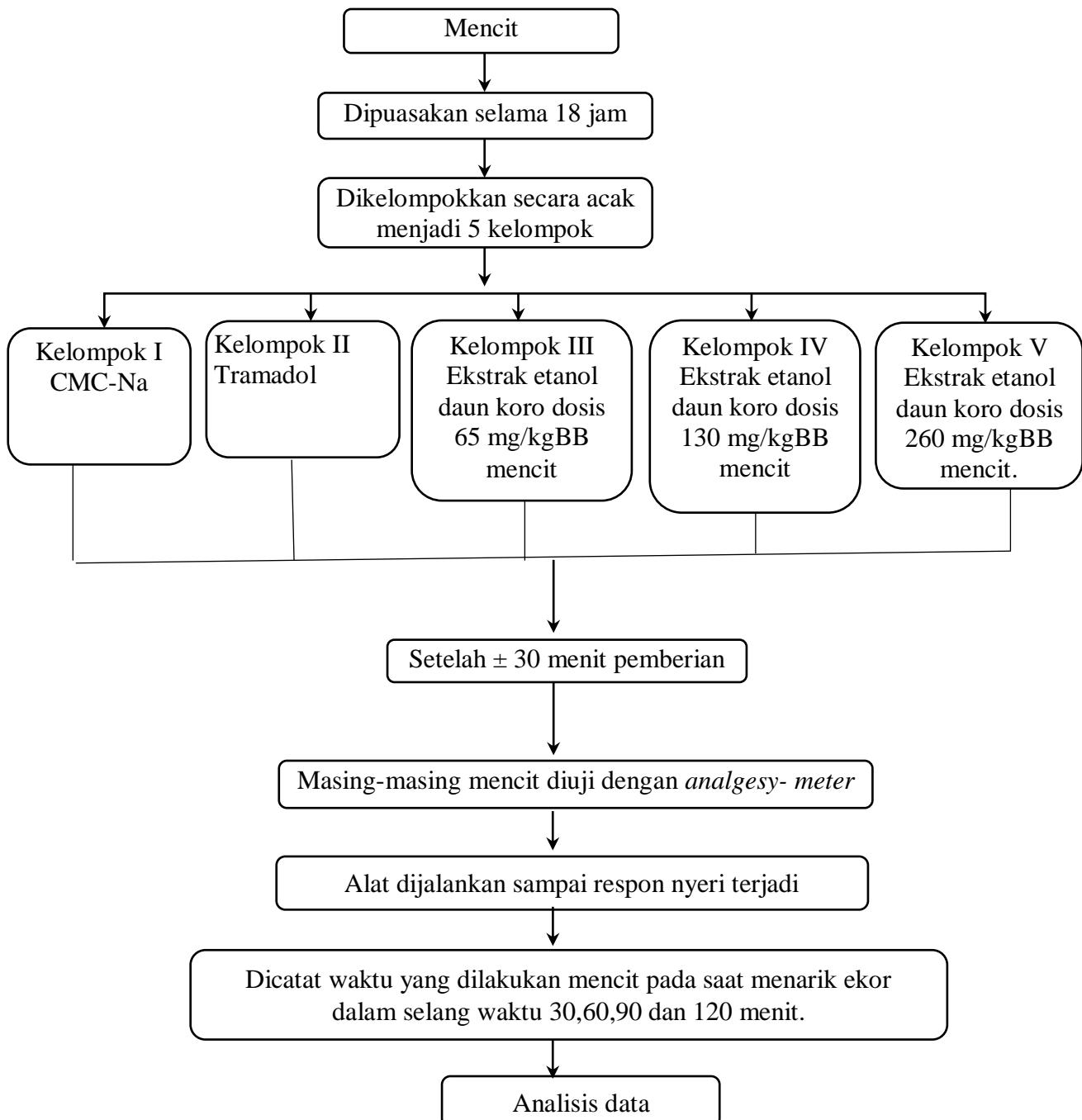
Kelompok II tramadol (kontrol positif).

Kelompok III ekstrak etanol daun koro dosis 65 mg/kgBB mencit

Kelompok IV ekstrak daun koro dengan dosis 130 mg/kgBB mencit.

Kelompok V ekstrak daun koro dengan dosis 260 mg/kgBB mencit.

Setelah diberi perlakuan dosis tunggal peroral, selanjutnya hewan uji diberi larutan uji sesuai kelompok, 30 menit kemudian mencit diberi rangsangan termal berupa panas pada temperatur 70^0C yang diperoleh dari *infra-ret* pada alat uji. Pengujian ini dilakukan selama 2 jam dengan rentan waktu tercatat, yaitu 30 menit, 60 menit, 90 menit dan 120 menit.



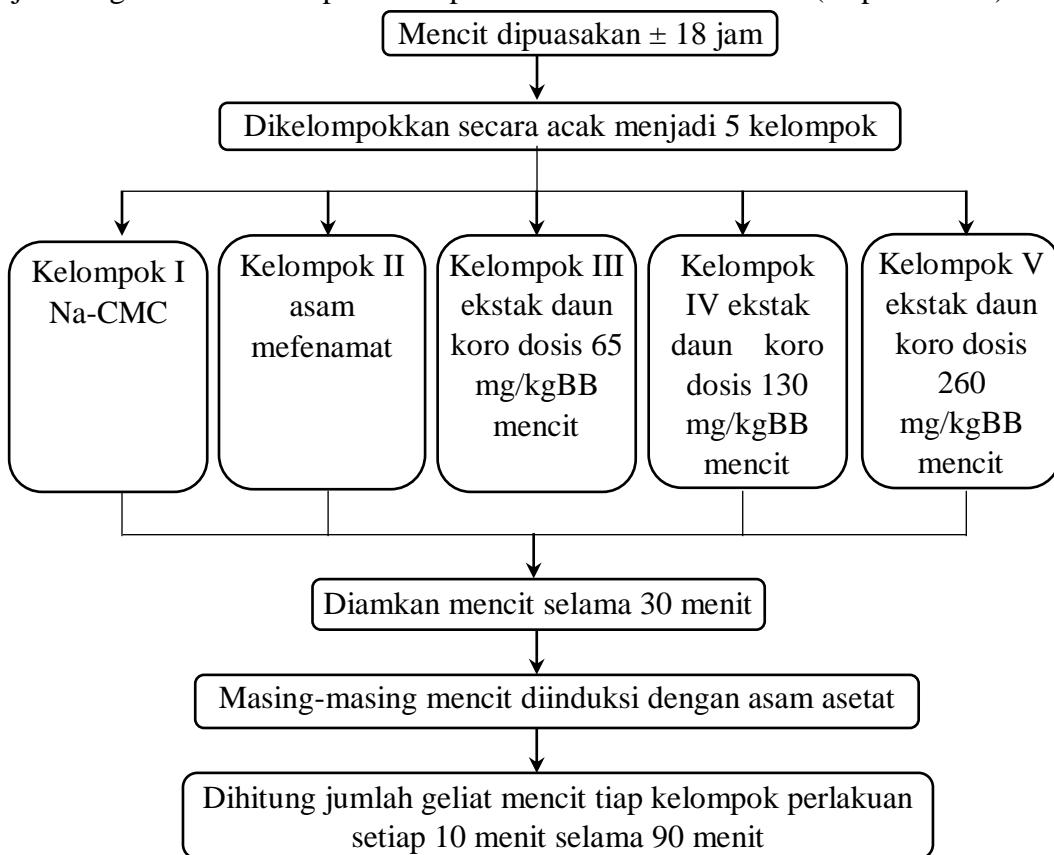
Gambar 13. Skema uji analgesik metode *Tail flick*

9.2 Uji efek analgetik metode *Writhing test*. Sebanyak 25 ekor mencit yang sama pada uji *Tail flick* yang digunakan lagi setelah *wash out* selama 2 minggu dan dipuaskan selama 18 jam dengan tetap diberi minum dibagi menjadi 5 kelompok secara acak.

Mencit yang telah dipuaskan selama \pm 18 jam, dikelompokkan menjadi 5 kelompok, setiap kelompok terdiri dari 5 ekor mencit sebagai berikut :

1. Kelompok I Na-CMC 1% (kontrol negatif)
2. Kelompok II asam mefenamat (kontrol positif)
3. Kelompok III ekstrak etanol daun koro dosis 65 mg/kgBB mencit.
4. Kelompok IV ekstrak etanol daun koro dosis 130 mg/kgBB mencit.
5. Kelompok V ekstrak etanol daun koro dengan dosis 260 mg/kgBB mencit.

Sebelum hewan uji diberi larutan uji, hewan uji dihitung terlebih dahulu, selanjutnya hewan uji diberikan larutan uji sesuai kelompoknya. Mencit didiamkan selama 30 menit, setelah itu masing-masing hewan uji diuji dengan induksi asam asetat secara intraperitoneal untuk melihat jumlah geliat. Kemudian dihitung jumlah geliat untuk setiap perlakuan dalam kelompok. Perhitungan jumlah geliat dilakukan pada setiap 10 menit selama 90 menit (Hapsari 2017).



Gambar 14. Skema uji analgetik metode *Writhing test*

10. Perhitungan daya analgesik

10.1 Metode *Tail flick*. Menurut Rochma (2016) perhitungan persen daya analgesik metode *tail flick* dinyatakan dengan persen hambatan nyeri (% PHN) yang dihitung dengan rumus : % 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.

10.2 Metode *Writhing test*. Analisis dilakukan untuk mengetahui perbedaan pada semua kelompok perlakuan. Data penelitian metode *Writhing test* berupa jumlah kumulatif geliat pada masing-masing kelompok perlakuan dengan rumus :

$$\% \text{ proteksi analgesik} = 100 \% - [P/K \times 100] \%$$

Keterangan :

P = Jumlah geliat kumulatif kelompok percobaan rata-rata tiap individu

K = Jumlah geliat kumulatif kelompok kontrol rata-rata (Hapsari 2017).

E. Analisis Hasil

Data yang akan diperoleh pada penelitian ini adalah jumlah geliat hewan uji dan 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.