

BAB III

METODE PENELITIAN

Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kelor dan buah asam jawa yang diperoleh di kampung Randusari, Mojosongo, Jebres, Surakarta.

Sampel adalah sebagian kecil dari suatu populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kelor dan buah asam jawa yang di ambil dari populasi tersebut. Pengambilan sampel dilakukan secara acak dengan memepertimbangkan keadaan daun kelor dan buah asam jawa. Pada pengambilan sampel dilakukan pada siang hari dalam keadaan kering agar tidak terjadi pembusukan. Kriteria daun kelor yang diambil untuk penelitian ini adalah daun yang sudah tua, berwarna hijau, dan buah asam jawa yang diambil untuk penelitian ini adalah buah asam jawa yang sudah masak yang siap dipanen, segar, berwarna coklat sampa coklat tua serta bebas dari hama dan penyakit.

Variabel Penelitian

Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah kombinasi infusa daun kelor (*Moringae folium*) dan infusa buah asam jawa (*Tamarindus indica* L.) dan efek analgetik yang digunakan untuk respon nyeri yaitu rangsangan panas mencit (*Tail flick*).

Klasifikasi variabel utama

Variabel bebas. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk mempengaruhi terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dimanipulasi agar efek terhadap variabel lain dapat diamati dan diukur. Dalam penelitian ini variabel bebas yaitu dosis kombinasi infusa daun kelor (*Moringae folium*) dan infusa buah asam jawa (*Tamarindus indica* L.) yang dibuat dalam beberapa variasi dosis.

Variabel tergantung. Variabel tergantung merupakan suatu variabel yang variasinya dipengaruhi oleh beberapa variasi variabel lain. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek analgetik kombinasi infusa daun kelor dan infusa buah asam jawa.

Variabel kendali. Variabel kendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga variabel tersebut harus dikendalikan dengan cara menjadikan pengaruh netral. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kondisi fisik dari hewan uji yang meliputi galur hewan uji, usia, berat badan, jenis kelamin, kondisi hewan, kondisi lingkungan dan tempat hidup.

Definisi operasional variabel utama

Pertama, Daun kelor berbentuk bulat telur, bersirip tak sempurna, beranak daun gasal, tersusun majemuk dalam satu tangkai, dan hanya sebesar ujung jari. Helaian daun kelor berwarna hijau, ujung daun tumpul, pangkal daun membulat, tepi daun rata, susunan pertulangan menyirip serta memiliki ukuran 1-2 cm.

Kedua, buah asam jawa yang berasal dari tanaman asam jawa (*Tamarindus indica* L.) keluarga *Fabaceae*. Buah polong, bertangkai, bulat panjang pipih,

panjang 3,5-20 cm, lebar 2,5-4 cm, bagian ujung meruncing, diantara biji kerap menyempit, kulit dinding luar rapuh dan berwarna coklat muda. Daging buah berwarna kuning sampai coklat kekuningan dan rasanya asam.

Ketiga, daun kelor dan buah asam jawa adalah sari daun kelor dan buah asam jawa yang diperoleh dari infusa menggunakan pelarut air dan mengandung sejumlah zat berkhasiat sebagai analgetik.

Keempat, dosis kombinasi infusa daun kelor dan infusa buah asam jawa adalah dosis yang dihitung berdasarkan dosis empiris yang kemudian dikonversikan kedalam dosis kombinasi infusa daun kelor dan infusa buah asam jawa pada hewan uji mencit putih jantan.

Kelima, efek analgetik kombinasi infusa daun kelor dan infusa buah asam jawa adalah kemampuan yang memiliki kombinasi infusa daun kelor dan infusa buah asam jawa untuk mengurangi rasa nyeri dengan ditandai adanya penarikan ekor dari paparan panas.

Keenam, tail flick yaitu respon mencit yang ditandai dengan penarikan ekor dari paparan panas dan dicatat waktunya.

Ketujuh, Na CMC adalah bahan kimia yang digunakan untuk kontrol negatif.

Kedelapan, hewan uji adalah mencit putih jantan (*Mus musculus*) galur *Swiss* yang berumur 2-3 bulan dan digunakan untuk penelitian.

Alat dan Bahan Penelitian

Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : Peralatan untuk infusa yaitu timbangan, bejana infusa, batang pengaduk, *beaker glass*, corong kaca, gelas ukur, dan kain flanel. Peralatan yang digunakan untuk uji farmakologis yaitu kandang mencit, timbangan mencit, neraca analitik, jarum sonde, *beaker glas*, *stopwatch*, gelas ukur, dan sarung tangan. Peralatan yang digunakan untuk uji kualitatif yaitu tabung reaksi, pipet tetes, dan lampu sirtus.

Bahan penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kelor (*Moringae oleifera*) dan buah asam jawa (*Tamarindus indica* L.) yang masih segar diperoleh di Kampung Randusari, Kelurahan Mojosongo, Kecamatan Jebres, Surakarta, Jawa Tengah. Hewan uji yang digunakan adalah mencit putih jantan (*Mus musculus*) galur *Swiss* yang berumur 2-3 bulan yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan UGM Yogyakarta. Bahan kimia yang digunakan Na CMC, Aquadest. Bahan kimia yang digunakan uji kualitatif antara lain HCl pekat, amilakohol, CHCl_3 (kloroform), NH_4OH , H_2SO_4 , reaksi Mayer, reaksi Wagner, Dragendrof, FeCl_3 , HCl, Bouchardat.

Jalannya Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut :

Determinasi tanaman

Sebelum dilakukan penelitian simplisia terlebih dahulu dideterminasi untuk mengidentifikasi jenis dan untuk memastikan kebenaran simplisia. Bahan

yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kelor (*Moringae oleifera*) dan buah asam jawa (*Tamarindus indica* L.) yang diperoleh dari Kampung Randusari, Kelurahan Mojosongo, Kecamatan Jebres, Surakarta, Jawa Tengah. Determinasi tanaman daun kelor dan buah asam jawa dilakukan di Laboratorium Morfologi Sistematika dan Tumbuhan Universitas Setia Budi, Surakarta.

Penyiapan bahan yang digunakan

Pengumpulan bahan baku daun kelor dan buah asam jawa di ambil bulan Desember 2018 pada saat masih segar, diperoleh di Kampung Randusari, Kelurahan Mojosongo, Kecamatan Jebres, Surakarta, Jawa Tengah. Daun kelor dan buah asam jawa yang sudah diambil lalu dicuci dengan air bersih dan kemudian ditiriskan. Setelah ditiriskan daun kelor dan buah asam jawa dipotong-potong dan kemudian ditimbang. Setelah ditimbang daun kelor dan buah asam jawa dikeringkan dengan oven selama 5-7 hari, sesudah kering kemudian ditimbang. Setelah ditimbang kemudian di blender dan diayak menggunakan ayakan nomor 40.

Pembuatan infusa

Infusa daun kelor ditimbang 1000 mg dan buah asam jawa ditimbang 1500mg, kemudian masing-masing ditambahkan aquadest 100ml dalam panci infusa, lalu dipanaskan diatas penangas air pada suhu 90°C selama 15 menit sesekali diaduk, lalu disaring dengan kain flanel dan tambahkan aquadest melalui ampas sehingga volume dikehendaki. Pembuatan bahan simplisia yang mengandung lendir tidak boleh diperas, sehingga infusa buah asam jawa tidak boleh diperas dalam pembuatannya.

Binatang percobaan

Binatang percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan yang berat badan antara 20-30 gram dan berumur 2-3 bulan. Hewan uji tersebut diperoleh dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Identifikasi kandungan kimia dalam bentuk serbuk

Identifikasi flavonoid. Menimbang 100 mg serbuk sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml aquadest kemudian dipanaskan sampai mendidih selama 5 menit. Setelah itu, disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat dimasukkan kedalam tabung reaksi lain, lalu ditambahkan 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 (Harborne, 1987).

Identifikasi kandungan kimia dalam bentuk infusa

Identifikasi flavonoid. Menimbang 100 mg serbuk sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml aquadest kemudian dipanaskan sampai mendidih selama 5 menit. Setelah itu, disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat dimasukkan kedalam tabung reaksi lain, lalu ditambahkan 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 (Harborne, 1987).

Penetapan dosis bahan uji

Dosis infusa daun kelor. Berdasarkan penelitian sebelumnya dosis infusa daun kelor yang digunakan adalah 400 mg/kg BB mencit (Muqsith, 2015). Dosis untuk mencit dengan berat 20 gram adalah 8 mg/20 gram BB.

Dosis infusa buah asam jawa. Berdasarkan penelitian sebelumnya dosis infusa buah asam jawa yang digunakan adalah 600 mg/kg BB mencit (Perdana RK, 2012). Dosis untuk mencit dengan berat 20 gram adalah 12 mg/20 gram BB.

Dosis kombinasi infusa daun kelor dan infusa buah asam jawa. Variasi dosis kombinasi yang digunakan untuk uji efek analgetik kombinasi infusa daun kelor dan infusa buah asam jawa adalah berdasarkan penelitian sebelumnya. Maka dalam penelitian ini, variasi dosis infusa daun kelor 8 mg/20 gram BB dan infusa buah asam jawa 12 mg/20 gram BB.

Tabel 1. Perbandingan dosis kombinasi

Perbandingan (%)		Dosis Infusa (mg/20grBB)	
IDK	IBAJ	IDK	IBAJ
75%	25%	6	3
50%	50%	4	6
25%	75%	2	9

Keterangan :

IDK = Infusa Daun Kelor

IBAJ = Infusa Buah Asam Jawa

Penetapan dosis Tramadol

Dosis tramadol diberikan berdasarkan faktor konversi dosis manusia. Pemberian dosis berdasarkan pada 50 kg BB manusia. Dosis lazim tramadol adalah 100 mg sekali pakai. Koversi perhitungan dosis untuk sekali minum pada mencit dengan asumsi bobot mencit 20 gram pada manusia normal 70 kg adalah

0,0026. Dosis mencit untuk berat 20 gram adalah $50 \text{ kg}/70 \text{ kg} \times 100 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,18 \text{ mg}/20 \text{ gram BB mencit}$.

Pengujian efek analgetik

Penyiapan pengujian efek analgetik meliputi aklimatasi hewan uji, penyiapan bahan suspensi, penyiapan infusa bahan uji, dan evaluasi efek analgetik.

Aklimatasi hewan uji. Mencit diadaptasi dengan lingkungan kandang selama 7 hari. Aklimatasi dilakukan bertujuan untuk memberikan adaptasi pada mencit terhadap lingkungan yang baru. Kandang ditempatkan di dalam Laboratorium Farmakologi Program Studi Farmasi Universitas Setia Budi.

Pembuatan suspensi Na-CmC 1% (b/v). Ditimbang 1 gram Na-CMC dimasukkan sedikit demi sedikit kedalam beaker glas yang berisi 50 ml aquadest panas (suhu 70°C) dan didiamkan selama 30 menit hingga diperoleh massa yang transparan, diaduk lalu di encerkan dengan aquadest hingga 100 ml (Anief, 1995).

Pembuatan suspensi tramadol. Kapsul Tramadol 50 mg dibuka cangkangnya, kemudian dimasukkan dalam mortir dan ditambahkan dengan suspensi Na-CMC sedikit demi sedikit sambil digerus hingga homogen, lalu dimasukkan dalam labu takar 100 ml. Kemudian volume dicukupkan hingga 100 ml dengan suspensi Na-CMC.

Pembuatan infusa daun kelor. Menimbang sebanyak 1000 mg serbuk daun kelor, masukkan dalam panci infusa, kemudian ditambahkan aquadest 100ml, lalu dipanaskan diatas penangas air pada suhu 90°C selama 15 menit

sesekali diaduk, lalu disaring dengan kain flanel dan ditambahkan aquadest melalui ampas sehingga volume dikehendaki.

Pembuatan infusa buah asam jawa. Menimbang sebanyak 1500 mg serbuk buah asam jawa, masukkan dalam panci infusa, kemudian ditambahkan aquadest 100ml, lalu dipanaskan diatas penangas air pada suhu 90°C selama 15 menit sesekali diaduk, lalu disaring dengan kain flanel dan ditambahkan aquadest melalui ampas sehingga volume dikehendaki.

Perbandingan kombinasi infusa.

Tabel 2. Volume pemberian pada mencit.

Dosis Infusa (mg/20grBB)		Volume pemberian (ml)	
IDK	IBAJ	IDK	IBAJ
6	3	0,6	0,2
4	6	0,4	0,4
2	9	0,2	0,6

Keterangan :

IDK = Infusa Daun Kelor

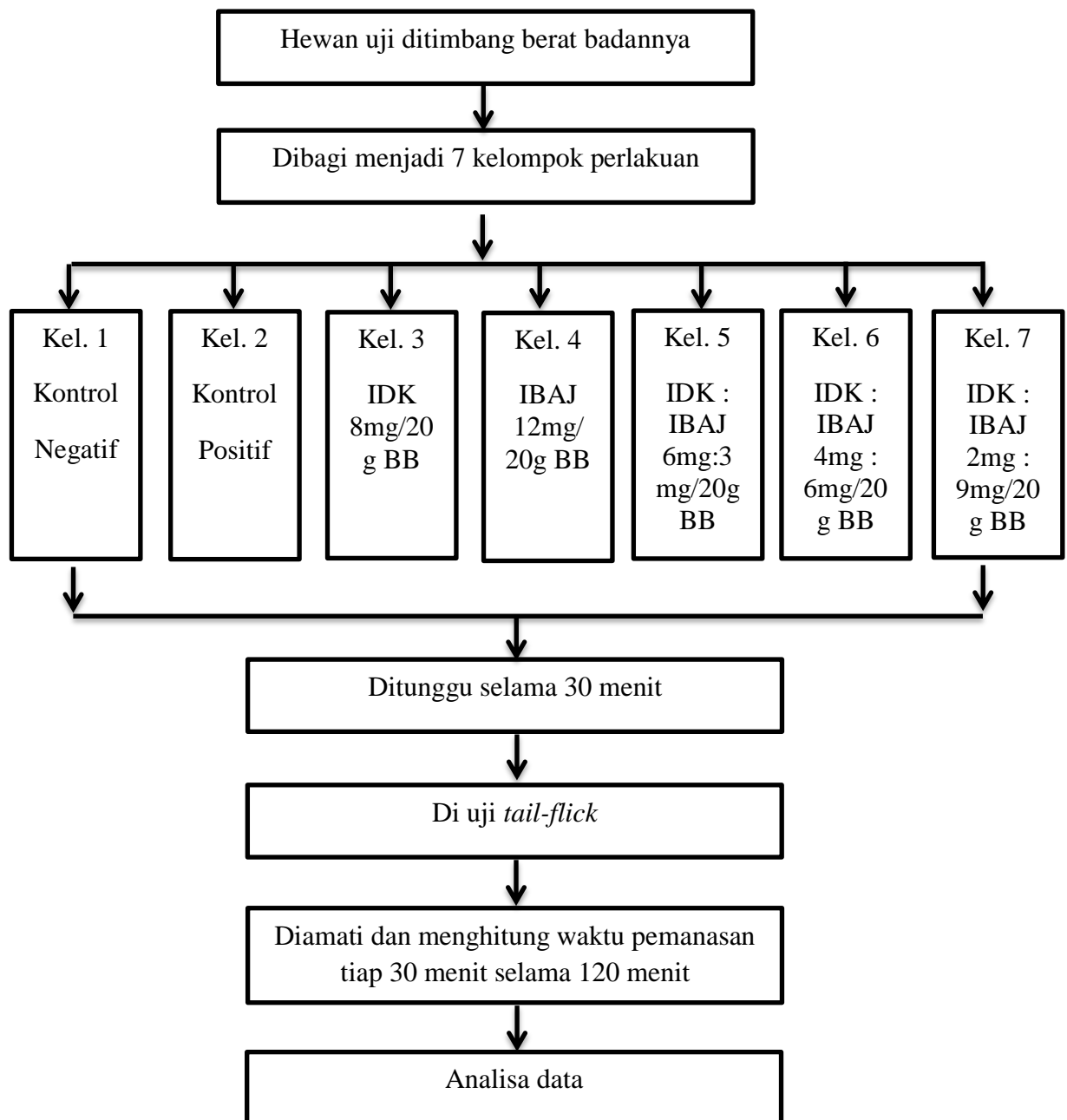
IBAJ = Infusa Buah Asam Jawa

Evaluasi efek analgetik. Mencit yang telah dipuasakan selama 18 jam dikelompokkan secara acak menjadi 7 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit. Setelah hewan uji di berikan obat sesuai kelompok nya, 30 menit kemudian hewan uji dilakukan uji dengan metode *tail-flick*. Kelompok uji tersebut antara lain :

- Kelompok I, yaitu kontrol negatif diberikan Na-CMC 1ml/20 gram BB secara oral
- Kelompok II, yaitu kontrol positif diberikan suspensi Tramadol dengan dosis 0,18 mg/ 20 gram BB secara oral

- Kelompok III, yaitu diberikan Infusa daun kelor dengan dosis 8 mg/20 gram BB
- Kelompok IV, yaitu diberikan Infusa buah asam jawa dengan dosis 12 mg/20 gram BB
- Kelompok V, yaitu diberikan kombinasi IDK dan IBAJ dengan dosis 6 mg : 3 mg/20 gram BB
- Kelompok VI, yaitu diberikan kombinasi IDK dan IBAJ dengan dosis 4 mg : 6 mg/20 gram BB
- Kelompok VII, yaitu diberikan kombinasi IDK dan IBAJ dengan dosis 2 mg : 9 mg/20 gram BB

Kemudian ditunggu selama 30 menit dan diuji dengan metode *tail-flick*, lalu diamati dan menghitung waktu pemanasan tiap 30 menit selama 120 menit yang ditandai pergerakan ekor mencit.



Gambar 1. Pemberian dosis pada hewan uji mencit

Analisis Hasil

Analisis data waktu daya tahan panas dalam penelitian ini dilakukan dengan uji statistik yaitu dengan analisis variasi (ANAVA) pada taraf kepercayaan 95%. Dilakukan uji Kolmogorov-smirnov untuk mengetahui data yang diteliti terdistribusi normal, dan jika ada perbedaan yang signifikan dilakukan uji Tukey.