

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah sekumpulan unit atau individu yang dijadikan sebagai ruang lingkup dalam sebuah penelitian. Dalam penelitian ini, populasi yang dipilih adalah daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* L.) yang di ambil dari Kelurahan dan Kecamatan Pasar Kliwon, Kota Surakarta, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang ingin diteliti. Dalam penelitian ini, sampel yang digunakan adalah daun cocor bebek yang diambil dari populasi tersebut. Proses pengambilan sampel dilakukan secara acak, dengan mempertimbangkan kondisi daun cocor bebek. Kriteria untuk memilih daun cocor bebek dalam penelitian ini adalah daun cocor bebek yang segar dan berwarna hijau muda. Pengambilan sampel dilakukan pada siang hari dan dalam kondisi kering untuk mencegah terjadinya pembusukan.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

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

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

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 terkontrol.

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

2.2. Variabel tergantung. Variabel tergantung yang dimaksud inti permasalahan yang dipilih untuk penelitian dan merupakan hasil dari variabel bebas yang ditetapkan. Dalam penelitian ini, variabel tergantungnya adalah aktivitas analgetik dari ekstrak etanol daun cocor bebek yang diuji menggunakan metode *tail flick*.

2.3. Variabel terkendali. Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel terganung, selain variabel bebas sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh penelitian lain dengan akurat. Variabel dalam penelitian ini meliputi kondisi pengukur atau peneliti, laboratorium serta kondisi fisik dari hewan yang diuji, termasuk berat badan, usia, lingkungan, habitat, dan jenis kelamin.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun cocor bebek merupakan daun segar berwarna hijau muda yang diperoleh dari daerah Kelurahan dan Kecamatan Pasar Kliwon, Kota Surakarta, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk dari daun cocor bebek dihasilkan dari daun cocor bebek yang telah dicuci, dirajang, lalu dikeringkan dalam oven pada suhu sekitar 55°C hingga kering, kemudian diblender dan diayak.

Ketiga, ekstrak etanol dari daun cocor bebek adalah ekstrak yang diperoleh melalui proses maserasi serbuk daun cocor bebek dengan pelarut etanol 96%, yang kemudian dipekatkan dengan alat *rotary evaporator*.

Keempat, hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan berwarna putih yang berusia 2-3 bulan dengan berat badan berkisar 20-30 gram.

Kelima, aktivitas analgetik merujuk pada kemampuan ekstrak etanol dari daun cocor bebek dalam mengurangi nyeri, yang diukur dengan respon penarikan ekor ketika diberikan rangsangan panas melalui metode *tail flick*.

Keenam, dosis efektif adalah jumlah dosis terkecil yang dapat menghasilkan efek terapeutik yang setara dengan kontrol dari obat analgetik.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang diperlukan untuk membuat simplisia meliputi neraca analitik, pisau untuk merajang atau memotong, oven, blender, dan ayakan. Peralatan yang dibutuhkan untuk membuat ekstrak etanol 96% terdiri dari 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, timbangan mencit, dan sarung tangan.

2. Bahan

2.1. Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* L.) daun segar berwarna hijau muda yang diperoleh dari daerah Kelurahan dan Kecamatan Pasar Kliwon, 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, FeCl 1%, akuades, HCl 1N, HCl 2%, reagen dragendroff, reagen mayer.

2.3. Hewan uji. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan (*Mus musculus*) usia 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram. Hewan uji tersebut dipelihara pada Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Sebelum penelitian mengenai aktivitas analgetik dari daun cocor bebek, dilakukan determinasi. Determinasi ini adalah langkah awal dalam penelitian untuk

memastikan keakuratan mengenai tanaman yang akan diuji, dengan tujuan untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan berdasarkan ciri morfologi tanaman terhadap kepustakaan dan dapat dibuktikan. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* L.) yang diperoleh dari daerah Kelurahan dan Kecamatan Pasar Kliwon, Kota Surakarta, Jawa Tengah. Determinasi tanaman dilaksanakan di Laboratorium Biologi Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Penyiapan dan pengumpulan bahan

Pengumpulan bahan baku daun cocor bebek dilaksanakan pada Bulan Februari 2025, dengan jumlah sebesar 4 kg saat daunnya masih dalam keadaan segar, yang diperoleh di daerah Kelurahan dan Kecamatan Pasar Kliwon, Kota Surakarta, Jawa Tengah. Setelah pengambilan, daun cocor bebek yang telah dipilih akan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan cemaran atau kotoran yang menempel. Daun cocor bebek kemudian dirajang, lalu dikeringkan di dalam oven pada suhu $\pm 55^{\circ}\text{C}$ hingga benar-benar kering. Proses ini bertujuan untuk mengurangi kadar air dan mencegah terjadinya pembusukan yang disebabkan oleh mikroorganisme seperti bakteri. Setelah proses pengeringan, daun yang sudah kering akan dihaluskan menggunakan blender dan diayak hingga diperoleh serbuk yang halus.

3. Penetapan susut pengeringan

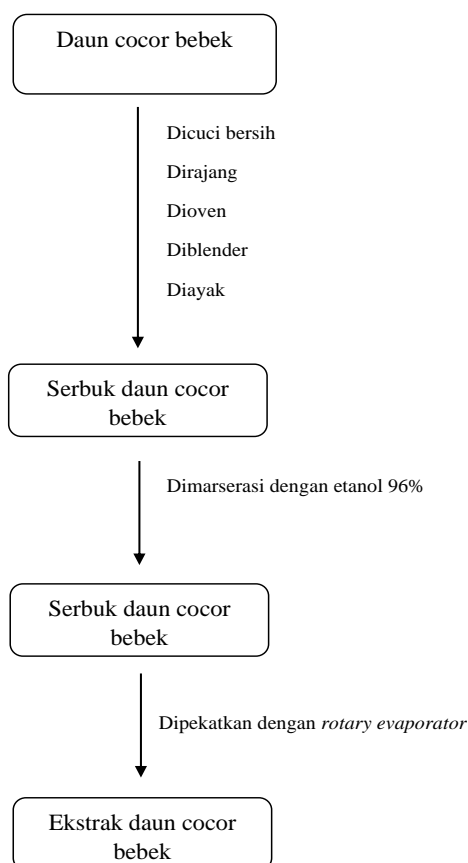
Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun cocor bebek dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*, dengan cara mengambil ± 2 gram serbuk daun cocor bebek dan dimasukkan dalam wadah. Suhu diatur pada 150°C dan ditunggu sampai proses pemanasan berhenti. Hasil susut pengeringan dicatat dalam bentuk satuan persen (%). Proses susut pengeringan diulang sebanyak 3 kali. Susut pengeringan dianggap memenuhi syarat jika kandungan air dari serbuk simplisia tidak lebih dari 10% (Depkes, 1985).

4. Pembuatan ekstrak etanol daun cocor bebek

Serbuk daun cocor bebek diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:10 bagian. Serbuk daun cocor bebek ditimbang sebanyak 250 gram kemudian

dimasukkan ke dalam botol kaca berwarna gelap, ditambahkan dengan 10 bagian etanol 96% kemudian ditutup dan digojok, setelah itu didiamkan pada ruangan yang terhindar dari sinar matahari, setelah didiamkan 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, 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 4. Skema pembuatan ekstrak etanol daun cocor bebek

5. Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak

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

5.1. Flavonoid. Menimbang serbuk atau ekstrak daun cocor bebek 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, kemuddian dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Reaksi hasil positif itunjukkan dengan terbentuknya warna kuning jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes, 1995).

5.2. Saponin. Menimbang sebanyak 0,5 g serbuk atau ekstrak daun cocor bebek dimasukkan ke dalam tbung reaksi, ditambahkan 10 ml air panas kemudian dididihkan, kocok 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 daun cocor bebek secukupnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi dilarutkan dengan aquadest 10 ml dan ditetaskan 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 (Lestiono & Kresnamurti, 2020).

5.4. Tanin. Ekstrak atau serbuk daun cocor bebek secukupnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian larutkan dengan 2 ml aquadest, kemudian ditambahkan 1-2 tetes FeCl_3 1%. Hasil positif ditunjukka dengan terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan posistif tanin (Safitri, 2013).

6. Penetapan dosis

6.1. Penetapan dosis tramadol. Dosis tramadol ditentukan berdasarkan faktor konversi manusi. Dosis lazim tramadol adalah 50 mg sekali pakai. Konversi

dosis manusia dengan berat badan 70 mg/kg ke mencit 20 gram adalah $0,0026 = 0,13 \text{ mg/kg BB mencit}$.

6.2. Penetapan dosis ekstrak etanol daun cocor bebek. Landasan untuk penentuan dosis ekstrak menggunakan acuan dari jurnal Lara (2015) “Uji Aktivitas Analgetik Ekstrak Etanol Daun Cocor Bebek (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.) Terhadap Mencit (*Mus musculus*) Jantan Galur Swiss”. Jurnal tersebut menggunakan tiga variasi dosis yaitu 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 300 mg/kgBB. Dosis 100 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 cocor bebek dengan dosis bertingkat yaitu 1 kali dosis efektif ekstrak etanol daun cocor bebek, dua kali dosis efektif ekstrak etanol daun cocor bebek, empat kali dosis efektif ekstrak etanol daun cocor bebek.

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 (Diah *et al.*, 2024).

7.2. Pembuatan suspensi tramadol 0.25%. CMC-Na 0,5% dikembangkan terlebih dahulu dalam mortir dengan aquadest panas. Setelah CMC-Na 0,5 % sudah mengembang, ditambahkan 250 mg tramadol yang sudah di gerus halus. Selanjutnya digerus sampai mengembang dan menambahkan sedikit demi sedikit aquadest panas hingga 100 ml, diaduk hingga homogen. Larutan ini digunakan sebagai kontrol pembanding.

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 cocor bebek 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 cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* (Lam.)) 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%.

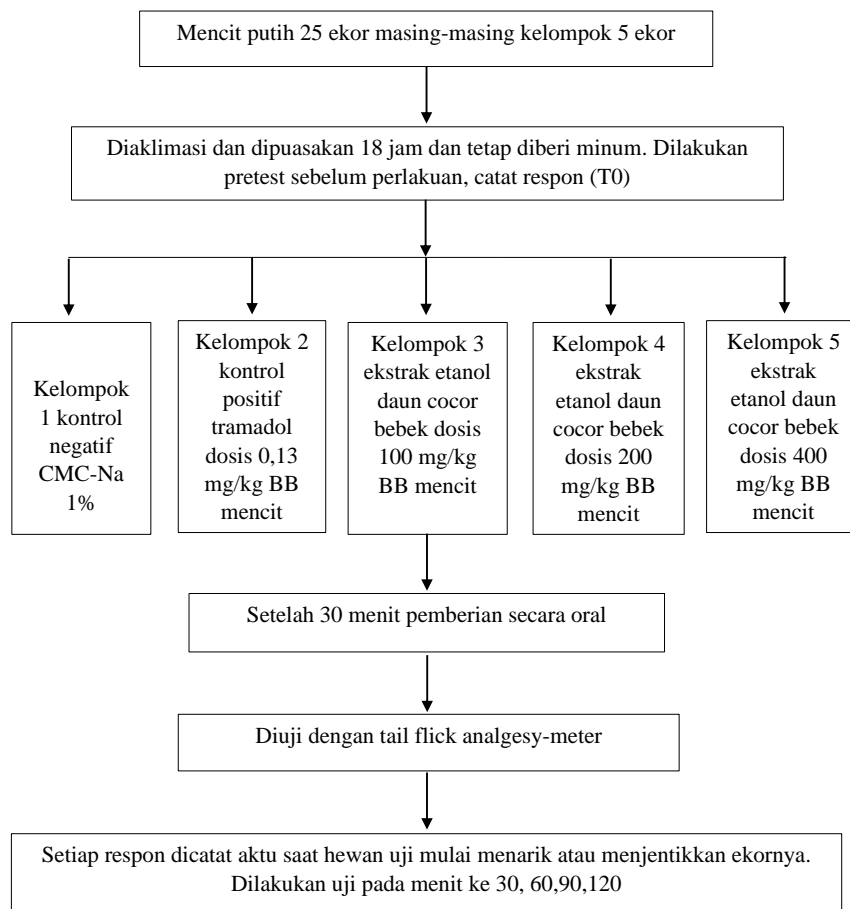
Kelompok II : Kontrol positif yang diberikan per oral larutan tramadol dengan dosis 0,13 mg/20g BB mencit.

Kelompok III : Dosis ekstrak etanol daun cocor bebek 100 mg/kg BB mencit

Kelompok IV : Dosis ekstrak etanol daun cocor bebek 200 mg/kg BB mencit

Kelompok V : Dosis ekstrak etanol daun cocor bebek 400 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 (Delisma *et al.*, 2018).



Gambar 5. Skema uji analgetik ekstrak etanol daun cocor bebek

9. Perhitungan aktivitas analgesik

Menurut Busyairi (2024) 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 :

t₁ = rata-rata waktu respon (detik) pada pemberian kelompok kontrol negatif.

t₂ = 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 kurvyang merupakan hubungan rata-rata waktu respon ekor mencit 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.