

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian dari Karya tulis Ilmiah ini adalah menggunakan metode eksperimental laboratorium, yaitu dengan menguji efek analgetik dari ekstrak daun katuk pada mencit yang diinduksi asam asetat.

#### **B. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah dari tanaman katuk (*Sauropus androgynus*) yang terdapat di daerah Rogoboyo, Kadireso, Teras, Boyolali.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun katuk (*Sauropus androgynus*) segar yang berwarna hijau yang tumbuh di daerah Rogoboyo, Kadireso, Teras, Boyolali.

#### **C. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynus*), aktivitas analgetik yang ditunjukkan sebagai respon geliat oleh mencit, dosis ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynus*) dan kondisi fisik hewan uji atau mencit.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang telah diidentifikasi terdahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel, yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel utama yang direncanakan untuk diubah-ubah. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynus*).

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria dalam penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas analgetik yang ditunjukkan oleh geliat mencit jantan (*Mus musculus*).

Variabel terkendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi fisik hewan uji.

### 3. Definisi operasional variabel utama

Daun katuk adalah daun dari tanaman katuk (*Sauropus androgynus*) yang berasal dari daerah Rogoboyo, Kadireso, Teras, Boyolali.

Ekstrak daun katuk adalah sari yang didapat dari proses maserasi serbuk daun katuk dengan cairan penyari etanol 70% selama 3 hari, dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* 55<sup>0</sup>C, kemudian dipanaskan di atas *waterbath* sampai didapatkan ekstrak pekat daun katuk.

Mencit adalah hewan laboratorium dari spesies *Mus musculus* berjenis kelamin jantan, usia 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram.

Uji aktivitas analgetik adalah uji aktivitas dengan metode geliat (*writhing*) dengan kontrol positif asam mefenamat.

Geliat (*writhing*) adalah suatu respon geliat mencit dimana ditandai dengan tarikan gerakan kaki depan ke depan dan kaki belakang ke belakang hingga abdomen menyentuh permukaan tempat.

### D. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah penggiling, bejana maserasi, ayakan no 40, *waterbath*, timbangan analitik, timbangan untuk mencit, *stopwatch*, sputi injeksi dengan jarum oval, Beaker *glass*, mortir dan stamper, wadah untuk pengamatan geliat, *Vacuum Rotary Evaporator* (Heidolph Laborata-4000), labu takar, gelas ukur.

Bahan utama dalam penelitian ini adalah daun katuk (*Sauropus androgynus*) yang diperoleh dari daerah Rogoboyo, Kadireso, Teras, Boyolali. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 70%, asam asetat, larutan Na CMC 0,5%, dan asam mefenamat kaplet.

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan galur Swiss dengan bobot 20-30 gram, usia 2-3 bulan, yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

## E. Jalannya Penelitian

### **1. Pengambilan sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun katuk (*Sauvopus androgynus*) yang diperoleh dan dikumpulkan dari daerah Rogoboyo, Kadireso, Teras, Boyolali.

### **2. Determinasi tanaman**

Determinasi tanaman dilakukan untuk menetapkan kebenaran tanaman daun katuk (*Sauvopus androgynus*) yang berasal dari daerah Rogoboyo, Kadireso, Teras, Boyolali, yang akan digunakan untuk penelitian ini adalah benar. Tanaman yang akan diteliti di determinasi terlebih dahulu. Determinasi dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

### **3. Pembuatan serbuk simplisia**

Daun katuk dipetik dari pohon kemudian dipisahkan dari bagian-bagian yang tidak diinginkan. Daun katuk dicuci dengan air bersih untuk menghilangkan kotoran atau debu yang menempel dan dikeringkan dengan cara dijemur sinar matahari dengan ditutup kain hitam selama 3-5 hari. Daun katuk yang sudah kering ditimbang yang selanjutnya dibuat serbuk dengan cara diblender. Serbuk halus yang dihasilkan selanjutnya diayak menggunakan ayakan ukuran *Mesh* 40. Hasil penyerbukan yang berupa serbuk kering disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat. Pencucian dan pengeringan yang dilakukan dalam penelitian ini dimaksudkan menghilangkan kotoran dan mengurangi mikroba-mikroba yang menempel pada bahan dan juga untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, dapat disimpan lebih lama dan dapat mencegah penurunan mutu simplisia.

### **4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun katuk**

Penetapan kadar kelembaban serbuk daun katuk menggunakan alat *moisture balance*. Serbuk daun katuk di timbang sebanyak 2 gram. Penetapan dengan suhu 105°C ditunggu hasilnya hingga muncul angka dalam persen. Pengukuran kelembaban simplisia memenuhi syarat apabila mengandung kadar air kurang dari 10%

Kadar susut pengeringan dapat dihitung dengan rumus:

$$\frac{\text{Bobot bahan awal sebelum dikeringkan} - \text{bobot bahan setelah dikeringkan}}{\text{bobot bahan sebelum dikeringkan}} \times 100\%$$

### **5. Pembuatan ekstrak**

Serbuk simplisia yang sudah didapatkan kemudian ditimbang 200 gram masukkan dalam bejana maserasi dan ditambahkan cairan

pelarut etanol 70% sebanyak 1,5 liter dengan perbandingan 1: 7,5, botol ditutup kemudian dikocok. Bejana maserasi disimpan dalam suhu ruang dan terhindar dari sinar matahari langsung selama 3 hari dan dilakukan pengocokan 3 kali dalam sehari. Hasil maserasi setelah 3 hari disaring dengan kain flanel dan kertas saring, filtrat yang didapatkan diuapkan dan dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 55°C sampai diperoleh ekstrak kental kemudian dipanaskan di atas *waterbath* sampai pekat. Hitung persentase nilai rendemennya dengan rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{bobot serbuk simplisia}} \times 100\%$$

## **6. Identifikasi kandungan kimia**

**6.1 Identifikasi flavonoid.** Ekstrak daun katuk ditimbang sebanyak 5 mg dimasukkan 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, dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Reaksi hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning jingga pada amil alkohol (Huliselan *et al.*, 2015).

**6.2 Identifikasi tanin.** Pengujian kandungan tanin dilakukan dengan mengambil sebagian ekstrak daun katuk yang direaksikan dengan larutan feri klorida 5% ( $\text{FeCl}_3$ ) sebanyak 3 tetes, amati perubahan warna menjadi hijau kehitaman atau adanya endapan (Mojab *et al.*, 2003).

**6.3 Identifikasi saponin.** Ekstrak daun katuk ditimbang 5 mg dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 ml air panas dan ditambahkan 2 tetes HCl 2N dan kocok kuat. Sampel positif mengandung saponin apabila terdapat buih dengan intensitas yang banyak dan konsisten selama 10 menit (Huliselan *et al.*, 2015).

## **7. Pembuatan larutan uji**

**7.1 Pembuatan larutan Na-CMC.** Larutan Na-CMC 0,5% dibuat dengan menimbang Na-CMC sebanyak 1 gram dimasukkan dalam Beaker *glass* tambahkan sedikit demi sedikit 50 ml air panas sambil diaduk dengan batang pengaduk hingga terbentuk larutan koloidal dan dicukupkan volumenya hingga 100 ml.

**7.2 Pembuatan larutan asam asetat.** Larutan asam asetat dibuat dengan konsentrasi 1% (v/v) yang berarti 1 ml larutan asam asetat dengan konsentrasi 100% diambil dengan pipet volume dan dilarutkan dengan *aquadest* steril hingga volume 100 ml. Dosis asam asetat yang diberikan secara intraperitoneal sebesar 50 mg/ kg BB.

**7.3 Pembuatan larutan suspensi asam mefenamat.** Larutan suspensi asam mefenamat dibuat dengan menggerus hingga halus dan homogen 1 kaplet asam mefenamat (dosis 500 mg). Serbuk asam mefenamat yang telah halus dan homogen kemudian dilarutkan dengan larutan Na CMC 0,5% sampai 10 ml diaduk hingga benar-benar larut dan homogen.

**7.4 Pembuatan suspensi ekstrak daun katuk.** Ekstrak kental daun katuk dibuat menjadi suspensi dengan Na CMC 0,5%. Ekstrak daun katuk ditimbang sebanyak 1 gram untuk pembuatan suspensi dosis D1 (0,35 g/kg BB), ditimbang 1,5 gram untuk dosis D2 (0,7 g/kg BB), dan ditimbang 2 gram untuk dosis D3 (1,4 g/kg BB). Ekstrak kental daun katuk ditimbang sesuai dosis masing-masing, lalu dilarutkan dengan larutan Na CMC 0,5% as 50 ml dan diaduk hingga ekstrak larut sempurna dan homogen.

### **8. Pengelompokan hewan uji**

Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan galur Swiss yang sehat, bulunya putih bersih dengan bobot badan 20-30 gram dan berumur 2-3 bulan. Mencit yang digunakan sebanyak 20 ekor yang dibagi dalam 5 kelompok uji sesuai dengan berat badan dimana tiap kelompok berisi 4 ekor.

Mencit dipuaskan terlebih dahulu selama 3-4 jam. Mencit sebelumnya ditimbang berat badannya satu per satu dan di kelompokkan menjadi 5 kelompok uji secara acak dimana tiap kelompok berisi 4 ekor.

### **9. Pengujian aktivitas analgetik**

Mencit pada tiap kelompok akan diinduksi dengan larutan asam asetat 1% (sebagai perangsang nyeri) secara intra peritoneal (i.p). Tunggu selama 30 menit kemudian mencit pada masing-masing kelompok diberikan perlakuan sebagai berikut; kelompok I diberikan Na CMC 0,5% sebagai kontrol negatif, kelompok II diberikan asam mefenamat dengan dosis 0,0065 g/kg BB mencit sebagai pembanding, kelompok III diberikan ekstrak daun katuk dengan dosis 0,35 g/kg BB mencit, Kelompok IV diberikan ekstrak daun katuk dengan dosis 0,7 g/kg BB mencit, kelompok V diberikan ekstrak daun katuk dengan dosis 1,4 g/kg BB mencit.

Pemberian perlakuan secara per oral dilakukan pada kelima kelompok, kemudian setelah 5 menit dilakukan pengamatan terhadap jumlah geliat masing-masing kelompok dan dihitung kumulatif geliat

pada mencit setiap 5 menit selama 60 menit. Data yang telah diperoleh kemudian dihitung % daya analgesik dengan rumus :

$$\% \text{ daya analgesik} = 100 - \left( \frac{P}{K} \times 100\% \right)$$

Keterangan :

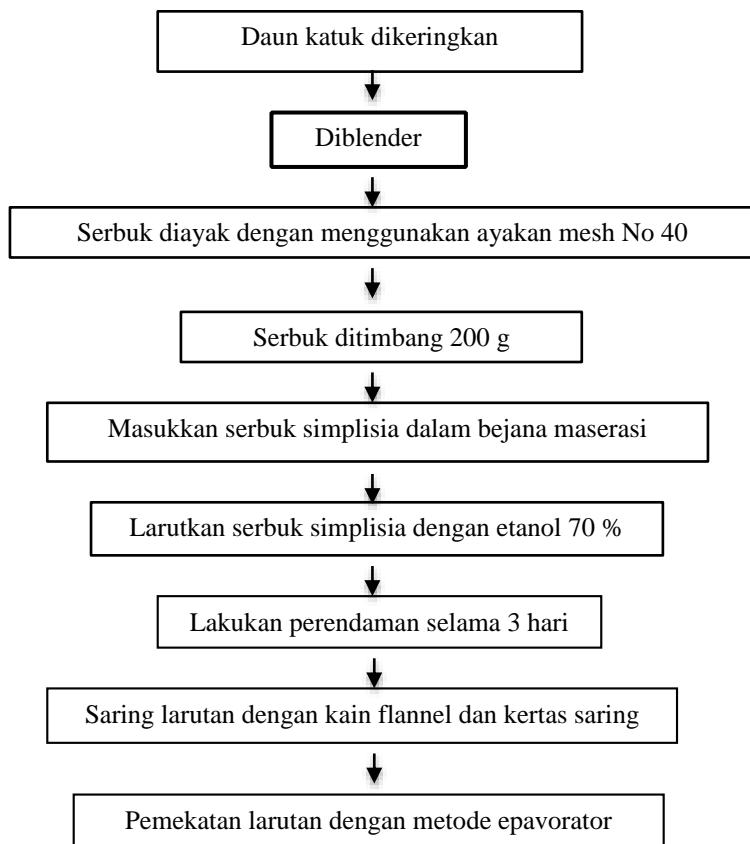
P = jumlah geliat kelompok perlakuan

K = jumlah geliat kelompok kontrol negatif.

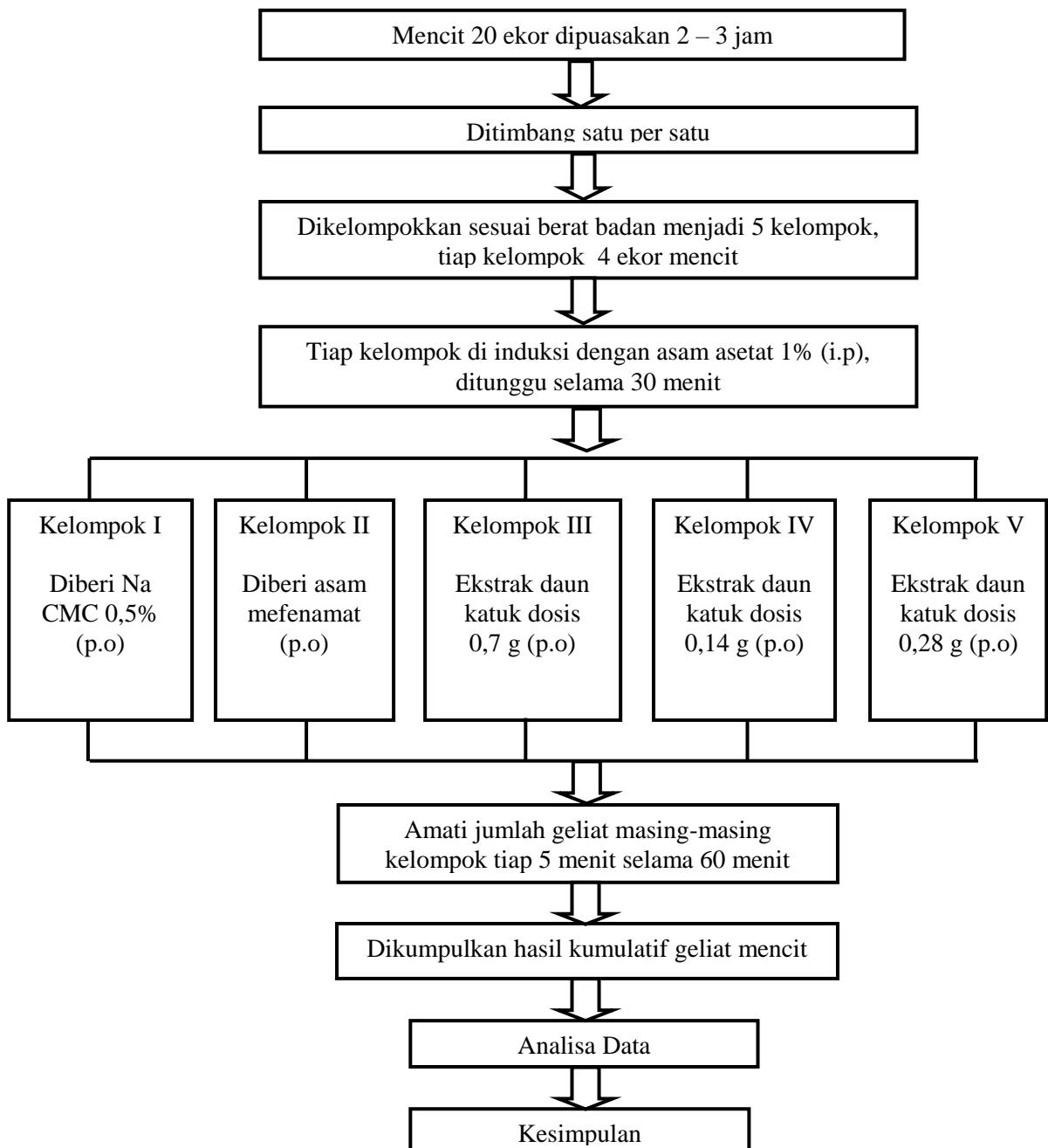
#### F. Pengamatan dan Analisis Hasil

Pengamatan dilakukan percobaan pada hewan uji dengan melihat geliat tiap 5 menit selama 60 menit setelah pemberian ekstrak daun katuk (*Sauvopus androgynus*) larutan asam mefenamat sebagai pembanding dan larutan Na CMC 0,5% sebagai kontrol negatif.

Data hasil pengamatan dikumpulkan dan dilakukan analisis data secara statistik dengan menggunakan uji ANOVA dilanjutkan dengan uji *Tukey*.



**Gambar 1. Skema kerja pembuatan ekstrak daun katuk.**



**Gambar 2. Skema kerja pengujian pada hewan uji.**

Keterangan:

p.o = per oral i.p = intra peritoneal