

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah keseluruhan unit atau individu yang menjadi ruang lingkup dalam suatu penelitian. Dalam penelitian ini, populasi yang digunakan adalah buah pare (*Momordica charantia* L.) yang didapatkan dari kelurahan Krikilan, Kecamatan Kalijambe, Kota Sragen, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel adalah bagian kecil dari populasi yang akan diteliti. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah pare yang diambil secara acak dengan memperhatikan kondisi buah pare. Kriteria untuk pemilihan buah pare dalam penelitian ini adalah buah yang segar, berwarna hijau, tidak busuk dan bebas dari hama. Pengambilan sampel dilakukan pada pagi hari dalam keadaan kering untuk mencegah pembusukan serta buah dalam keadaan segar dan optimal untuk dipanen.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol buah pare dengan pelarut etanol 96%.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas analgetik sentral dari ekstrak etanol buah pare.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah metode *tail flick* pada hewan uji.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama berupa identifikasi seluruh variabel yang diteliti secara langsung. Variabel yang akan diteliti diklasifikasikan terlebih dahulu ke dalam beberapa macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol.

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas adalah variabel akan diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian adalah ekstrak etanol buah pare dengan variasi dosis yang diberikan pada hewan uji mencit.

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung adalah inti permasalahan yang menjadi fokus penelitian dan merupakan hasil dari variabel bebas yang menjadi kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini merujuk pada aktivitas analgetik dari ekstrak etanol buah pare yang diukur menggunakan metode *tail flick*.

2.3 Variabel terkendali. Variabel terkendali adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung selain dari variabel bebas, sehingga penting untuk menetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tetap konsisten dan dapat diulang oleh penelitian lagi dengan akurat. Variabel terkendali dalam penelitian ini mencakup kondisi pengukur atau peneliti, laboratorium dan kondisi fisik dari hewan uji yang meliputi berat badan, usia, lingkungan, tempat tinggal dan jenis kelamin dari hewan uji.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, buah pare adalah buah segar berwarna hijau yang diperoleh dari Kelurahan Krikilan, Kecamatan Kalijambe, Kota Sragen, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk buah pare adalah serbuk yang didapat dari buah pare yang telah dicuci bersih, kemudian dirajang dan dikeringkan dengan oven pada suhu $\pm 55^{\circ}\text{C}$ hingga kering lalu diblender dan diayak.

Ketiga, ekstrak etanol buah pare adalah ekstrak hasil maserasi serbuk buah pare menggunakan etanol 96% yang kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

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

Kelima, aktivitas analgetik adalah kemampuan untuk mengurangi nyeri dari ekstrak etanol buah pare dengan penarikan ekor saat pemberian rangsangan berupa panas yang dihasilkan dari metode *tail flick*.

Keenam, dosis efektif adalah dosis terkecil yang sudah dapat memberikan efek terapeutik dan sebanding dengan kontrol pembanding obat analgetik.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan untuk membuat simplisia diantaranya neraca analitik, pisau untuk merajang, oven, blender dan ayakan. Alat yang digunakan untuk membuat ekstrak etanol 96% diantaranya bejana maserasi, batang pengaduk, kain flannel, kertas saring, *rotary evaporator*, alat – alat gelas, cawan porselen, *water bath* dan *moisture balance*. Alat yang digunakan untuk pengkajian diantaranya *tail flick analgesy-meter*, kandang mencit, jarum sonde oral, alat – alat gelas, timbangan mencit dan sarung tangan.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah buah pare (*Momordica charantia* L.) segar berwarna hijau yang diperoleh dari kelurahan Krikilan, Kecamatan Kalijambe, Kota Sragen, Jawa Tengah.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96% sebagai pelarut saat ekstraksi, tramadol sebagai kontrol positif dan CMC-Na 0,5 sebagai kontrol negatif. Bahan kimia yang digunakan untuk skrining fitokimia diantaranya alkohol, amil alkohol, serbuk Mg, HCl pekat, FeCl₃ 1%, aquadest, HCl 1N, HCl 2%, reagen dragendorf, reagen mayer dan reagen *Lieberman-Burchard*.

2.3 Hewan uji. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan berusia 2-3 bulan dengan bobot berkisar antara 20-30 gram. Hewan uji mencit dipelihara di Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi buah pare dilakukan sebelum dilaksanakan penelitian mengenai aktivitas analgetik dari buah pare. Tujuan dilakukannya determinasi adalah untuk mengetahui kebenaran mengenai tanaman yang akan diuji dengan

maksud menghindari kesalahan dalam pengumpulan berdasarkan ciri – ciri morfologi tanaman terhadap kepustakaan dan dapat dibuktikan. Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah buah pare (*Momordica charantia* L.) yang diperoleh dari Kelurahan Krikilan, Kecamatan Kalijambe, Kota Sragen, Jawa Tengah. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Setia Budi.

2. Penyiapan dan pengumpulan bahan

Pengumpulan bahan baku pare diambil pada Bulan Februari 2025 saat masih segar sebanyak 6 kg, diperoleh dari Kelurahan Krikilan, Kecamatan Kalijambe, Kota Sragen, Jawa Tengah. Buah pare yang terpilih kemudian dilakukan pencucian pada air mengalir untuk menghilangkan cemaran atau kotoran yang masih melekat. Buah pare dirajang, kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu $\pm 60^{\circ}\text{C}$ hingga mengering dengan tujuan untuk mengurangi kadar air dan mencegah terjadinya pembusukan oleh mikroorganisme berupa bakteri. Buah pare yang telah kering dihaluskan menggunakan blender dan diayak hingga didapatkan serbuk halus.

3. Penetapan susut pengeringan

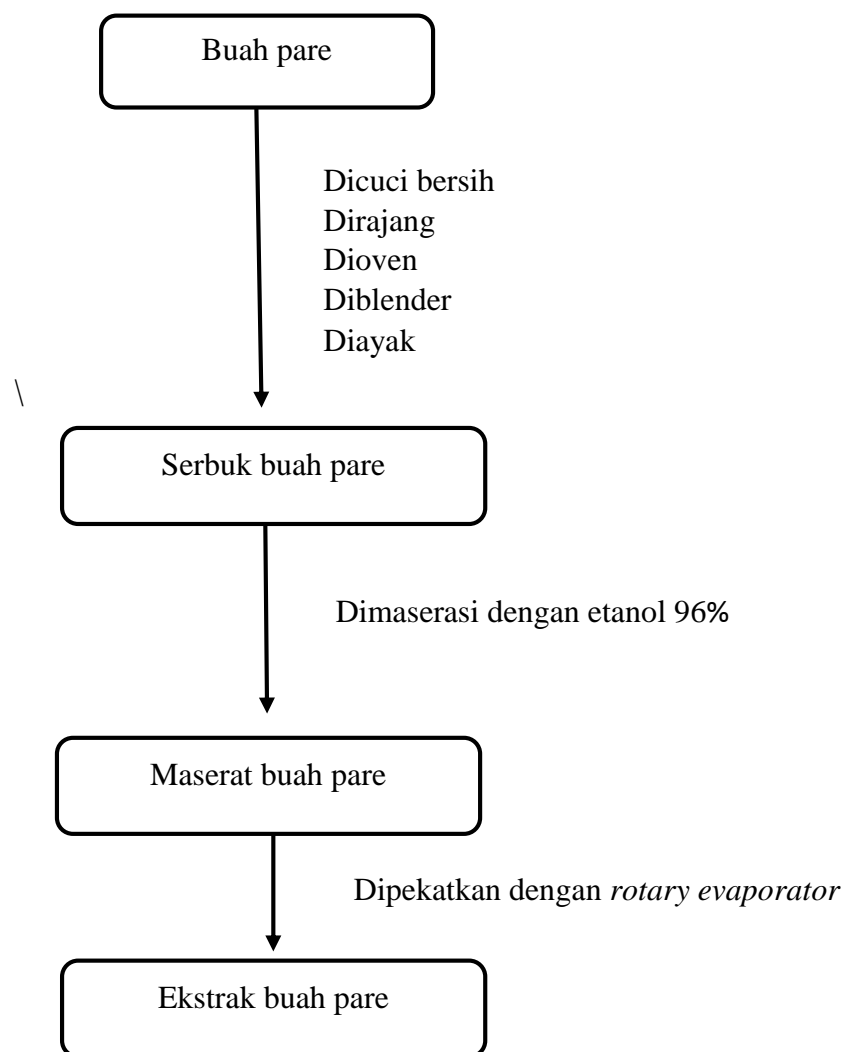
Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak buah pare dilakukan dengan menggunakan *moisture balance*, dengan cara menimbang ± 2 gram dan dimasukkan dalam wadah. Suhu diatur 105°C dan tunggu sampai pemanasan berhenti. Hasil susut pengeringan yang tertera pada alat dalam satuan persen (%) dicatat. Penetapan susut pengeringan dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Susut pengeringan memenuhi syarat apabila kadar air serbuk simplisia tidak lebih dari 10% (Veninda *et al.*, 2023).

4. Pembuatan ekstrak etanol buah pare

Serbuk buah pare diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% dalam perbandingan 1:10. Sebanyak 250 gram serbuk buah pare ditimbang dan dimasukkan ke dalam botol kaca berwarna gelap, kemudian ditambahkan 10 bagian etanol 96%. Botol tersebut ditutup dan digoyang, lalu dibiarkan di tempat yang terlindung dari sinar matahari. Setelah proses pengendapan, campuran disaring menggunakan kain flanel, diikuti dengan

penyaringan menggunakan kertas saring. Ampas yang tersisa kemudian ditambahkan dengan 50% dari total pelarut awal dan dibiarkan selama dua hari, setelah itu disaring kembali dengan kain flanel dan kertas saring. Hasil filtrat dari kedua penyaringan tersebut digabungkan dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator*, dilanjutkan dengan water bath hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes, 2017). Rendemen yang dihitung digunakan dalam penimbangan. Rendemen dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat serbuk}} \times 100\%$$



Gambar 4. Skema pembuatan ekstrak etanol buah pare.

5. Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan dalam ekstrak buah pare. Identifikasi kandungan senyawa kimia bertujuan untuk menetapkan keberadaan senyawa kimia dalam ekstrak buah pare. Identifikasi kandungan senyawa kimia dalam serbuk dan ekstrak etanol meliputi senyawa flavonoid, tanin, saponin, alkaloid dan steroid.

5.1 Flavonoid. Menimbang serbuk atau ekstrak buah pare 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, kemudian dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Reaksi hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning jingga pada lapisan amil alkohol.

5.2 Saponin. Menimbang sebanyak 0,5 gram serbuk atau ekstrak buah pare dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml air panas kemudian didinginkan, dikocok kuat – kuat selama 10 detik, terbentuk buih yang menetap ± 10 menit, setinggi 1-10 cm dan dengan penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang.

5.3 Alkaloid. Ekstrak atau serbuk secukupnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi dilarutkan dengan aquadest 10 ml dan ditambah 3 tetes HCl pekat lalu dipanaskan hingga mendidih kemudian dibagi ke dalam dua tabung reaksi yang masing-masing ditambahkan 3 tetes pereaksi mayer dan 3 tetes pereaksi dragendorff. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih pada mayer dan endapan jingga pada pereaksi dragendorff.

5.4 Tanin. Ekstrak atau serbuk secukupnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian larutkan dengan 2 ml aquadest, kemudian ditambahkan 1-2 tetes FeCl_3 1%. Terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan positif tanin

5.5 Steroid. Ekstrak atau serbuk secukupnya dimasukkan diletakkan di plat tetes, kemudian dilarutkan dengan eter, dibiarkan hingga kering. Tetesi dengan reagen *Liebermann-Burchard* yang dibuat dari campuran 10 tetes asam asetat anhidrida dan 2 tetes H_2SO_4 pekat. Terbentuknya warna biru atau hijau menunjukkan positif steroid (Veninda *et al.*, 2023).

6. Penetapan dosis

6.1 Penetapan dosis tramadol. Dosis tramadol ditentukan berdasarkan faktor konversi manusia. Dosis lazim tramadol adalah 50 mg sekali pakai. Konversi dosis manusia dengan berat badan 70 kg ke mencit 20 gram adalah 0,0026, maka dosis tramadol yang diberikan adalah $50 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,13 \text{ mg/20gBB}$ mencit.

6.2 Penetapan dosis ekstrak etanol buah pare. Landasan untuk penentuan dosis ekstrak menggunakan acuan dari jurnal "*Analgesic and antipyretic activities of Momordica charantia linn. Fruits*" (Patel *et al.*, 2010) dengan dosis yang digunakan 250 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa dosis 500 mg/kgBB mencit memberikan efek analgetik terbaik. Dosis 500 mg/kgBB mencit dijadikan sebagai dosis orientasi karena merupakan dosis yang paling efektif. Guna mengevaluasi efek analgetik dari ekstrak etanol buah pare secara lebih menyeluruh, maka digunakan metode dosis bertingkat. Tiga dosis yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 250 mg/kgBB, 500 mg/kgBB dan 1000 mg/kgBB. Dosis rendah (250 mg/kgBB) dipilih untuk mengevaluasi potensi efek analgetik pada tingkat yang lebih rendah, sementara dosis tinggi (1000 mg/kgBB) digunakan untuk mengamati efek pada tingkat yang lebih tinggi. Pemilihan variasi dosis ini bertujuan untuk menentukan rentang dosis yang efektif dan aman serta untuk memahami hubungan antara dosis dan respon analgetik.

7. Pembuatan larutan

7.1 Larutan CMC Na 0,5%. CMC Na dibuat dengan konsentrasi 0,5% sebagai pembawa yang diberikan perlakuan pada kontrol negatif. CMC Na ditimbang sebanyak 0,5 gram CMC Na, lalu dimasukkan air panas ke dalam mortir dan taburkan CMC Na secara merata, tunggu hingga mengembang, jika CMC Na sudah mengembang gerus hingga homogen sambil menambahkan aquadest sedikit demi sedikit hingga 100 ml, kemudian diaduk hingga homogen.

7.2 Pembuatan suspensi tramadol 0,05%. Ditimbang 50 mg serbuk tramadol dimasukkan ke dalam mortir ditambah CMC-Na 0,5%, dan ditambah aquadest panas. 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 2,5%. CMC Na ditimbang sebanyak 500 mg kemudian ditaburkan ke dalam cawan penguap yang berisi air panas secukupnya dan diaduk hingga mengembang. Ekstrak etanol buah pare ditimbang 2,5 gram, lalu digerus dalam mortir setelah itu mucilago CMC Na sampai volume 100 ml dan aduk sampai homogen.

8. Pengujian efek analgetik

Prosedur pengujian efek analgetik ekstrak etanol buah pare (*Momordica charantia L.*) terhadap mencit jantan yaitu, 25 ekor mencit percobaan yang 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%

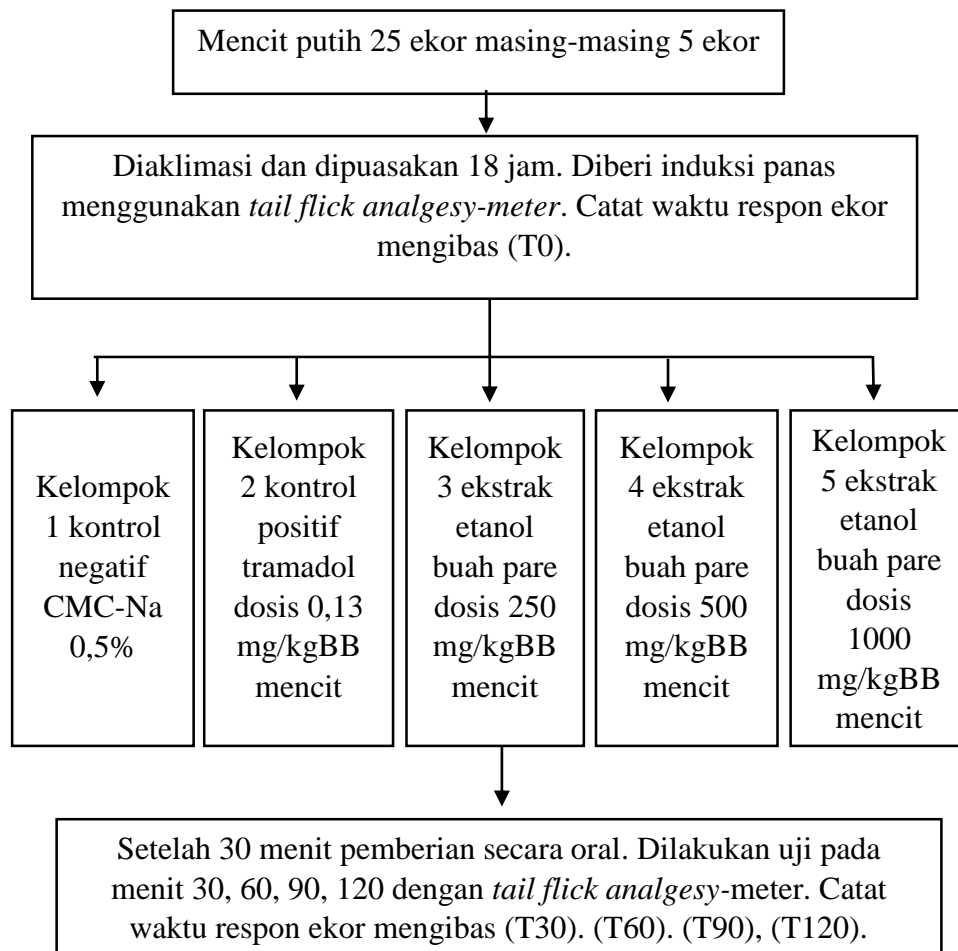
Kelompok II : Kontrol positif yang diberikan per oral larutan tramadol dengan dosis 0,13 mg/kgBB mencit

Kelompok III : Dosis ekstrak etanol buah pare 250 mg/kgBB mencit

Kelompok IV : Dosis ekstrak etanol buah pare 500 mg/kgBB mencit

Kelompok V : Dosis ekstrak etanol buah pare 1000 mg/kgBB mencit

Setelah diberi perlakuan dosis tunggal peroral, selanjutnya setelah 15 menit ekor mencit diletakkan di bawah *phototransistor*, disinari dengan inframerah fokus 40. Waktu yang dicatat adalah respon mencit mengibaskan ekor.



Gambar 5. Skema uji analgetik ekstrak etanol buah pare

9. Perhitungan aktivitas analgetik

Menurut Rochma (2016) perhitungan persen analgetik dengan metode *tail flick* dinyatakan dengan persen hambatan nyeri (PHN) yang dihitung menggunakan rumus :

$$\%PHN = \frac{t_2 - t_1}{T_1} \times 100\%$$

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 pembanding waktu respon ekor mengibas versus waktu uji. Dihitung AUC (*Area Under the Curve*) yaitu luas daerah rata – rata di bawah kurva yang 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. 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.