

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun semanggi bur (*Medicago polymorpha* L.) yang diperoleh dari UPF Pelayanan Kesehatan Tradisional Tawangmangu.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun semanggi bur segar, berwarna hijau dan dipilih secara acak serta telah dipastikan bahwa sampel tidak busuk serta tidak tercemar hama.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini yaitu dosis efektif, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak daun semanggi bur yang digunakan untuk mengamati aktivitas analgetika pada mencit swiss dengan metode uji geliat dan uji pelat panas.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama dapat diklasifikasikan menjadi tiga yaitu variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu dosis efektif ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air daun semanggi bur.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah selisih penurunan geliat tiap kelompok pengujian dan perbandingan waktu latensi pada hewan uji sebelum dan sesudah diberikan perlakuan.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini antara lain yaitu metode ekstrak daun semanggi bur, kondisi fisik tikus seperti suhu, berat badan tikus, galur, jenis kelamin, kondisi penelitian, laboratorium, zat penginduksi dan peneliti.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun semanggi bur yang digunakan yaitu seluruh bagian daun pada tanaman semanggi bur yang segar, berwarna hijau sampai hijau tua, tidak terlalu tua, tidak terlalu muda dan tidak rusak yang diperoleh dari Tawangmangu, Solo, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk yang digunakan yaitu serbuk yang diperoleh dari hasil pengolahan daun semanggi bur segar yang telah dilakukan

pencucian, pengeringan dibawah sinar matahari langsung selama 4 hari kemudian dihaluskan dan diayak dengan pengayak nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol 70% merupakan hasil ekstraksi daun semanggi bur dengan menggunakan etanol 70% dengan metode maserasi.

Keempat, fraksi n-heksan yaitu hasil ekstrak kental daun semanggi bur yang telah dipartisi dengan n-heksan dan air.

Kelima, fraksi etil asetat yaitu residu fraksi n-heksan yang telah dipartisi dengan etil asetat dan air.

Keenam, fraksi air yaitu residu fraksi etil asetat.

Ketujuh, aktivitas analgetika metode *writhing test* merupakan aktivitas efek penghambatan respon nyeri setelah diinduksi asam asetat untuk melihat respon geliat setiap hewan uji per satuan waktu.

Kedelapan, aktivitas analgetika metode *hot plate* merupakan aktivitas efek penghambatan respon nyeri sistem saraf pusat dengan mengamati waktu latensi hewan uji yang ditandai dengan respon menjilat kaki karena adanya rangsangan panas.

Kesembilan, menghitung persentase penghambatan respon nyeri metode *writhing test* yang ditandai dengan reaksi menggeliat setelah induksi asam asetat pada tiap hewan uji dibandingkan dengan kontrol.

Kesepuluh, menghitung persentase penghambatan respon nyeri metode *hot plate test* yang ditandai dengan reaksi menjilat kaki setelah hewan uji diletakkan diatas plat panas dengan suhu 55° selama 20 detik yang dibandingkan dengan waktu latensi kontrol.

Kesebelas, aktivitas analgetika yang tertinggi adalah aktivitas yang menghasilkan efek penghambatan tertinggi terhadap respon nyeri.

C. Bahan, Alat dan Hewan Uji

1. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu daun semanggi bur, *aquadest*, etanol 70%, *n*-heksan, etil asetat, kertas saring, natrium diklofenak, tramadol, CMC-Na, NaCl, asam asetat, kloroform, dragendorff, sitoborat, wagner, Liebermann-Burchard, anisaldehyd, FeCl₃, asam gallic, kuersetin, piperin, saponin, stigmasterol dan mencit putih jantan

2. Alat

Alat yang digunakan yaitu ayakan mesh 4, *beaker glass*, pipa kapiler gelas ukur, kain flanel, *rotary vacuum evaporator*, kertas saring, pensil, penggaris, jar kaca, chamber, lempeng KLT Silica gel GF₂₅₄,

moisture balance, botol gelap maserasi, batang pengaduk, spatel, tisu dan corong pisah.

3. Hewan Uji

Hewan uji yang dipakai dalam penelitian ini yaitu mencit putih jantan dengan bobot 20-30 g dan berumur 2-3 bulan sebanyak 60 ekor mencit yang dibagi menjadi 12 kelompok dengan masing-masing 5 ekor hewan uji untuk setiap kelompoknya. Kelompok perlakuan pertama yaitu sebagai kontrol negatif yang diberi Na-CMC 0,5%, kelompok perlakuan kedua sebagai kontrol positif yang diberi obat, kelompok kontrol ketiga diberi perlakuan menggunakan ekstrak etanol daun semanggi bur dosis 300 mg/KgBB, kelompok kontrol keempat sebagai fraksi n-heksan sebesar 0,45 mg/20 g BB mencit, kelompok kontrol kelima sebagai etil asetat sebesar 0,45 mg/20 g BB mencit dan kelompok kontrol keenam diberi perlakuan dengan fraksi air sebesar 4,35 mg/20 g BB mencit.

D. Jalannya penelitian

1. Pembuatan *Ethical Clearance*

Pembuatan *Ethical clearance* untuk penelitian ini dilakukan di RSUD Dr. Moewardi bagian kode etik selama 5 hari kerja.

2. Pengumpulan hewan uji

Hewan uji yang digunakan yaitu mencit swiss putih jantan dengan berat badan 20-30 g yang didapatkan dari laboratorium Universitas Setia Budi sebanyak 60 ekor dengan umur 2-3 bulan. Surat keterangan hewan uji terlampir pada lampiran.

3. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan dengan mengumpulkan sampel tanaman di unit Laboratorium Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta. Surat determinasi didapatkan setelah 14 hari kerja.

4. Pengambilan bahan

Pengambilan bahan merupakan tahap awal yang dilakukan pada suatu penelitian. Bahan yang digunakan harus dipastikan segar dan tidak terserang hama atau rusak, dan diperoleh dari UPF YANKESTRAD Tawangmangu, RSUP Dr. Sardjito.

5. Pembuatan serbuk daun semanggi bur

Tahap awal dalam pembuatan serbuk daun semanggi bur yaitu melakukan pencucian dengan air mengalir pada daun semanggi bur yang telah diperoleh untuk menghilangkan kotoran yang masih

menempel pada daun semanggi bur, daun kemudian dipisahkan dari batangnya untuk selanjutnya dilakukan proses pengeringan dibawah sinar matahari langsung selama 4 hari sampai kadar air dalam daun berkurang. Setelah kering, daun semanggi bur kemudian dihancurkan dengan alat penghancur (blender) dan diayak dengan nomor ayakan 40 hingga diperoleh serbuk halus homogen. Hasil serbuk yang didapat kemudian disimpan pada wadah kering dan tertutup rapat untuk selanjutnya digunakan dalam penelitian.

6. Pembuatan ekstrak etanol dan fraksi daun semanggi bur

Pembuatan ekstrak etanol daun semanggi bur dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol 70%. Serbuk yang telah diperoleh sebelumnya ditimbang sebanyak 800 g, serbuk kemudian dimasukkan kedalam botol gelap dengan ukuran 3 L, 3 L dan 2 L. Untuk serbuk 300 g dimasukkan dalam botol dengan ukuran 3 L, kemudian ditambahkan etanol 70% sebanyak 3 L. Serbuk 200 g dimasukkan dalam botol gelap dengan ukuran 2,5 L, kemudian ditambahkan etanol 70% sebanyak 2 L. Setelah serbuk kemudian ditambahkan etanol dalam botol gelap, kemudian digojog dan ditutup. Melakukan maserasi dengan merendam selama 6 jam, sambil sesekali diaduk kemudian didiamkan selama 18 jam untuk kemudian difiltrasi dan dikumpulkan filtratnya. Sisa ampas kemudian dilakukan remaserasi dengan perlakuan yang sama seperti sebelumnya. Masing-masing filtrat yang didapat kemudian dikumpulkan lalu dilakukan pemekatan menggunakan *rotary evaporator* (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2008).

7. Penetapan rendemen ekstrak

Penentuan persentase rendemen pada ekstrak etanol dan fraksi n-heksan, etil asetat dan air daun semanggi bur, syarat rendemen tidak boleh kurang dari 11,1 %. Hasil rendemen yang dilakukan dengan metode maserasi dihitung menggunakan rumus sebagai berikut;

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Bobot serbuk kering sebelum diekstraksi (g)}} \times 100\%$$

(Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017)

8. Penetapan susut pengeringan

Susut pengeringan merupakan penetapan kadar berat bahan setelah dikeringkan. Simplisia yang digunakan dalam susut pengeringan harus dalam bentuk serbuk dengan derajat halus nomor 8 dan suhu pengeringan 105°C, kecuali dinyatakan lain dalam monografi. Pengujian dilakukan dengan menimbang 1 gram sampai 2 gram

simplicia dalam botol timbang dangkal bertutup yang telah dipanaskan pada suhu penetapan dan ditara. Meratakan bahan dengan cara menggoyangkan botol hingga lapisannya lebih tebal sekitar 5 hingga 10 mm. kemudian masukkan kedalam pengering dan keringkan pada suhu penetapan hingga bobot konstan. Setelah itu, dinginkan botol hingga suhu ruang dengan menggunakan eksikator (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2008). Syarat susut pengeringan untuk daun semanggi yaitu tidak lebih dari 10% (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).

9. Penetapan kadar air

Melakukan penimbangan sebanyak 10 gram ekstrak, kemudian masukkan kedalam wadah yang telah ditera dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 105° selama 5 jam, kemudian ditimbang. Melakukan pengeringan kembali selama 1 jam dan timbang. Hasil konstan apabila perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).

10. Fraksinasi ekstrak semanggi bur

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 70% dan menimbang sebanyak 50 g ekstrak, kemudian ditambahkan etanol 70% sebanyak 10 mL dan 65 ml aquadest. Masukkan kedalam corong pisah dan ekstraksi dengan 75 ml n-heksan selama 3 kali pengulangan. Fase n-heksan dikumpulkan dan residu dilakukan ekstraksi kembali dengan etil asetat sebanyak 3×75 ml sampai bening, kemudian pisahkan filtrat etil asetat dan air yang selanjutnya dilakukan pemekatan dalam WB. Hitung hasil rendemen dari ekstrak yang didapat.

11. Identifikasi kandungan daun semanggi bur

10.1 Tanin. Pengujian kandungan tanin dilakukan dengan menambahkan pereaksi FeCl_3 5% kedalam ekstrak hingga membentuk kompleks berwarna biru kehitaman untuk tanin galat atau hijau kehitaman untuk tanin katekol (Yanti & Vera, 2019).

10.2 Flavonoid. Pengujian kandungan flavonoid dalam daun semanggi bur dilakukan dengan menimbang 0,5 gram ekstrak kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan serbuk Mg, HCl pekat beberapa tetes dan 1 ml amil alkohol. Gojog kuat dan biarkan larutan mengalami pemisahan. Hasil uji positif apabila terlihat warna kuning, merah atau jingga pada lapisan amil alkohol (Ergina *et al.*, 2014).

10.3 Saponin. Pengujian saponin dilakukan dengan menggojog 2 ml filtrat hingga terbentuk busa setinggi 1 -10 cm yang stabil selama 10 menit (Artini *et al.*, 2013).

10.4 Alkaloid. Pengujian alkaloid dilakukan dengan memasukkan 1-2 ml filtrate kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi dragendroff tetes demi tetes hingga diperoleh hasil positif yaitu terbentuk endapan berwarna merah jingga (Sangi *et al.*, 2008).

10.5 Steroid/Triterpenoid. Pengujian sterol dilakukan dengan menggunakan pereaksi Lieberman-Burchard. Prosedur dilakukan dengan memasukkan 1-2 filtrat kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan pereaksi LB hingga terbentuk hasil positif yaitu endapan merah yang secara bertahap berubah menjadi biru (Jannah *et al.*, 2013).

11 Uji kromatografi lapis tipis

Pengujian identitas senyawa ekstrak daun semanggi bur dilakukan dengan menyiapkan fase gerak, fase diam dan larutan uji terlebih dahulu. Langkah awal yang harus dilakukan yaitu mempersiapkan bahan yang diperlukan seperti pensil, penggaris, chamber dan silika gel 60 F₂₅₄ 5 × 6 cm. Lempeng yang digunakan kemudian ditandai dengan pensil setinggi 0,5 cm pada bagian atas dan 1 cm pada bagian bawah (Lintang *et al.*, 2024). Kromatografi dilakukan dengan menotolkan baku, ekstrak daun semanggi bur, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air sebanyak 5 mikroliter atau 2 mikroliter pada lempeng KLT, kemudian biarkan fase gerak terelusi (Kemenkes RI, 2017). Lempeng KLT kemudian dilakukan pengamatan pada sinar UV 254 dan UV 366 untuk selanjutnya dilakukan reaksi semprot. Hasil positif ditandai dengan adanya bercak, kemudian bercak yang tertera dihitung nilai RF terhadap baku.

11.1 Tanin. Identifikasi tanin dengan kromatografi lapis tipis menggunakan baku pembanding asam gallic. Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan butanol : asam asetat (9:1). Masing-masing sampel kemudian dilakukan penotolan sebanyak 2 mikroliter dan tunggu hingga kering. Hasil selanjutnya dilakukan pengamatan pada UV 254, UV 366 dan untuk memperjelas bercak dilakukan reaksi semprot menggunakan FeCl₃.

11.2 Flavonoid. Identifikasi flavonoid dengan kromatografi lapis tipis menggunakan baku pembanding kuersetin. Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan aquadest : butanol :

asam asetat (5:4:1). Masing-masing sampel kemudian dilakukan penotolan sebanyak 2 mikroliter dan tunggu hingga kering. Hasil selanjutnya dilakukan pengamatan pada UV 254, UV 366 dan untuk memperjelas bercak dilakukan reaksi menggunakan uap amonia.

11.3 Saponin. Identifikasi saponin dengan kromatografi lapis tipis menggunakan baku pembanding saponin. Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan kloroform : metanol (17:3). Masing-masing sampel kemudian dilakukan penotolan sebanyak 2 mikroliter dan tunggu hingga kering. Hasil selanjutnya dilakukan pengamatan pada UV 254, UV 366 dan untuk memperjelas bercak dilakukan reaksi menggunakan FeCl_3 .

11.3 Alkaloid. Identifikasi alkaloid dengan kromatografi lapis tipis menggunakan baku pembanding piperin. Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan kloroform : etil asetat (6:4). Masing-masing sampel kemudian dilakukan penotolan sebanyak 2 mikroliter dan tunggu hingga kering. Hasil selanjutnya dilakukan pengamatan pada UV 254, UV 366 dan untuk memperjelas bercak dilakukan reaksi semprot menggunakan dragendorff.

11.4 Triterpenoid. Identifikasi triterpenoid dengan kromatografi lapis tipis menggunakan baku pembanding *n*-heksan : etil asetat (1:1). Masing-masing sampel kemudian dilakukan penotolan sebanyak 2 mikroliter dan tunggu hingga kering. Hasil selanjutnya dilakukan pengamatan pada UV 254, UV 366 dan untuk memperjelas bercak dilakukan reaksi semprot menggunakan Asam asetat 10%.

12 Pembuatan larutan stok

12.1 Pembuatan stok Na CMC 0,5%. Kontrol negatif yang digunakan dalam pengujian analgesik yaitu larutan CMC Na. Pembuatan larutan stok Na CMC dilakukan dengan menimbang sebanyak 500 mg kemudian serbuk digerus dalam mortir dan diberi *aquadest* panas sedikit demi sedikit hingga terbentuk suspensi Na CMC 0,5%.

12.2 Pembuatan larutan asam asetat 3%. Pembuatan asam asetat 3% dengan memasukkan asam asetat 93% sebanyak 2 ml ke dalam beaker glass, kemudian ditambahkan NaCl perlahan-lahan hingga mencapai volume 50 ml. setelah itu, dimasukkan kedalam botol gelap dan ditutup. Sebanyak 1 ml asam asetat diinduksi secara intraperitoneal pada mencit (Kiromah *et al.*, 2021).

12.3 Pembuatan larutan stok natrium diklofenak. Dosis natrium diklofenak yang digunakan untuk pengujian analgesik pada mencit yaitu sebanyak 10 mg/kgBB mencit. Pembuatan larutan stok dilakukan dengan menggerus tablet 25 mg natrium diklofenak kemudian disuspensikan dalam 50 ml Na CMC di mortir.

12.4 Pembuatan larutan stok tramadol. Dosis tramadol yang digunakan untuk pengujian analgesik pada mencit yaitu sebanyak 20 mg/KgBB mencit. Pembuatan larutan stok dilakukan dengan menggerus tablet 50 mg kemudian disuspensikan dalam 50 ml Na CMC di mortir.

12.5 Pembuatan larutan stok fraksi etanol daun semanggi bur. Menimbang ekstrak semanggi bur sebanyak 1200 mg kemudian dimasukkan kedalam *beaker glass* dan disuspensikan dalam Na CMC sebanyak 100 ml di mortir. Suspensi kemudian dimasukkan dalam botol gelap.

12.6 Pembuatan larutan stok fraksi n-heksan daun semanggi bur. Menimbang 90 mg fraksi n-heksan kemudian dimasukkan kedalam *beaker glass* dan disuspensikan dengan Na CMC sebanyak 100 ml di mortir. Suspensi kemudian dimasukkan dalam botol gelap.

12.7 Pembuatan larutan stok fraksi etil asetat daun semanggi bur. Menimbang 90 mg fraksi etil asetat kemudian dimasukkan kedalam *beaker glass* dan disuspensikan dengan Na CMC sebanyak 100 ml di mortir. Suspensi kemudian dimasukkan dalam botol gelap.

12.8 Pembuatan larutan stok fraksi air daun semanggi bur. Menimbang 870 mg fraksi air kemudian dimasukkan kedalam *beaker glass* dan disuspensikan dengan Na CMC sebanyak 100 ml di mortir. suspensi dimasukkan pada botol gelap 100 ml.

13 Kelompok hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit putih jantan dengan bobot 20-30 gram sebanyak 60 ekor yang mana masing-masing kelompok uji mendapatkan 5 ekor mencit. Pengujian pertama yaitu uji analgesik dengan *writhing test* untuk mengamati mekanisme analgesik perifer dengan menggunakan 30 ekor mencit, lalu kemudian dilanjutkan dengan uji analgesik metode *hot plate test* untuk mengamati mekanisme analgesik sentral (Hale *et al.*, 2010). Untuk setiap

kelompok uji, masing-masing akan mendapatkan 5 ekor mencit putih jantan dan diberi perlakuan sebagai berikut;

Pengujian analgesik dengan metode uji geliat;

Kelompok I : CMC Na 0,5% sebanyak sebagai kontrol negatif.

Kelompok II : Natrium diklofenak sebagai kontrol positif.

Kelompok III : Ekstrak daun semanggi bur.

Kelompok IV : Fraksi n-heksan daun semanggi bur.

Kelompok V : Fraksi etil asetat daun semanggi bur.

Kelompok VI : Fraksi air daun semanggi bur.

Pengujian dilakukan dengan menggunakan mencit putih jantan sehat sebanyak 30 ekor yang dibagi dalam 6 kelompok uji. Kelompok kontrol negatif diberi perlakuan secara per oral dengan Na CMC sebanyak 0,5%. Kontrol positif dalam pengujian ini yaitu diberi perlakuan dengan menggunakan natrium diklofenak. Kemudian kelompok uji lainnya yaitu menggunakan ekstrak sebanyak 6 mg/20 g BB mencit. Kemudian kelompok uji lainnya yaitu menggunakan fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air. Setelah 30 menit kemudian mencit diberi induksi nyeri dengan menggunakan asam asetat 3% yang dilakukan pengenceran dengan NaCl. Induksi asam asetat yang digunakan sebanyak 2 ml kemudian dilakukan perlakuan secara intraperitoneal. Pengamatan dilakukan dengan melihat geliat seperti kontraksi abdominal, gerakan memanjang tubuh, gerakan memutar atau meregangkan kaki. Pengamatan dilakukan pada menit ke-5, 10, 15, 20, 25 dan 30. Hasil observasi kemudian dihitung persentase inhibisi geliat atau PIW (*Percent Inhibition of Writhing*) dengan rumus (Reza *et al.*, 2021);

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{\text{Angka geliat (kontrol)} - \text{angkageliat (perlakuan)}}{\text{Angka geliat(kontrol)}} \times 100 \text{ (Reza et al., 2021)}.$$

Pengujian analgesik dengan metode uji pelat panas;

Kelompok I : CMC Na 0,5% sebanyak mencit sebagai kontrol negatif.

Kelompok II : Tramadol mencit sebagai kontrol positif.

Kelompok III : Ekstrak daun semanggi sebesar 300 mg/Kg BB mencit.

Kelompok IV : Fraksi n-heksan daun semanggi bur.

Kelompok V : Fraksi etil asetat daun semanggi bur.

Kelompok VI : Fraksi air daun semanggi bur.

Pengujian dilakukan dengan menggunakan 30 ekor mencit putih jantan yang kemudian dibagi menjadi 6 kelompok uji. Masing-masing kelompok uji terdiri atas 5 ekor mencit. Pelat panas diatur pada suhu

55°C dengan *cut-off time* 20 detik untuk mencegah terjadinya kerusakan jaringan. Pengujian dimulai dengan mengamati waktu ke-0 latensi sebelum diberikan induksi selama 20 detik. Pengujian selanjutnya dilakukan setelah memberikan perlakuan terhadap mencit sesuai dengan kelompok masing-masing secara peroral. Kelompok kontrol negatif menggunakan Na CMC 0,5%, kelompok kontrol positif menggunakan tramadol sebagai pembanding sebesar 20 mg/Kg BB mencit, fraksi n-heksan, etil asetat, fraksi air. Pengamatan selanjutnya dilakukan pada menit ke-30, 60, 90 dan 120 (Ahmad *et al.*, 2021). Catat waktu latensi pada hewan uji seperti munculnya respon melompat atau menjilat kaki. Kemudian menghitung persentase inhibisi menggunakan rumus (Reza *et al.*, 2021);

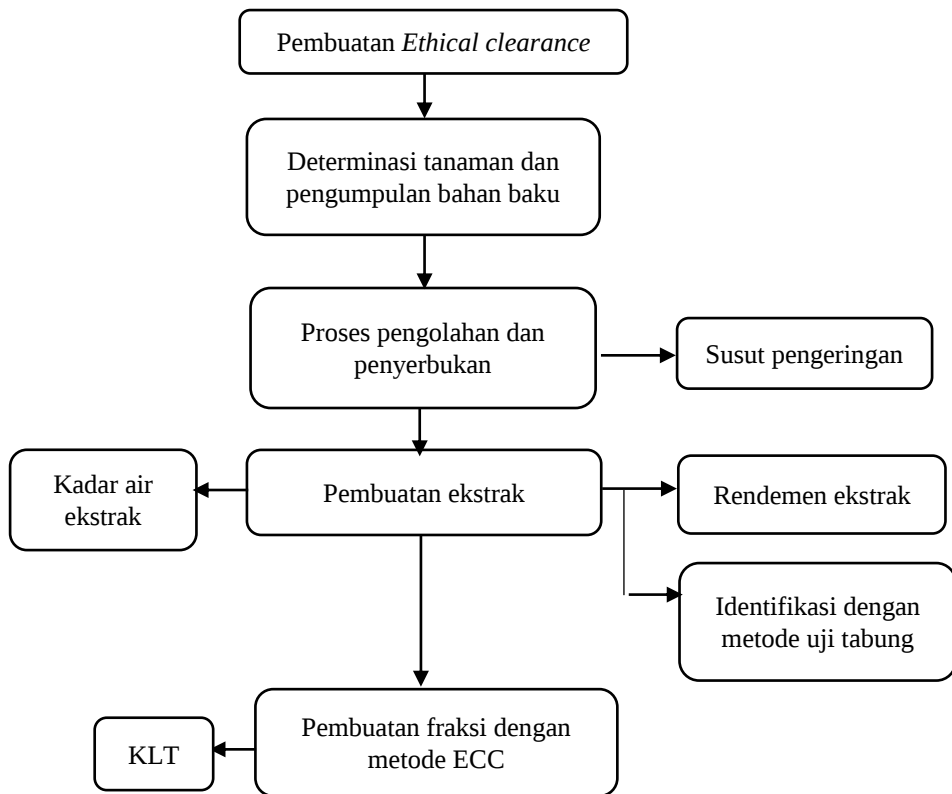
$$\% \text{Inhibisi} = \frac{\text{Latensi setelah perlakuan} - \text{latensi kontrol negatif}}{(\text{waktu cut-off}) - \text{latensi kontrol negatif}} \times 100 \quad (\text{Reza et al., 2021}).$$

E. Analisis data

Data yang dikumpulkan untuk uji analgesik merupakan data total geliat per satuan waktu untuk metode *writhing test* dan data waktu muncul latensi untuk metode *hot plate test*. Data yang diperoleh kemudian akan dilakukan analisis dengan menggunakan *SPSS*. Data hasil analisis akan dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji *Shapiro wilk*. Hasil uji *Saphiro wilk* kemudian akan dilakukan analisis data. Apabila data yang diperoleh mendapatkan nilai signifikansi $>0,05$ artinya data tersebut terdistribusi secara normal, sebaliknya apabila nilai signifikansi yang diperoleh $<0,05$ artinya data tersebut tidak terdistribusi secara normal. Apabila data telah terdistribusi secara normal, maka langkah selanjutnya yaitu melakukan analisis homogenitas data yang diperoleh menggunakan uji *One Way ANOVA*. Apabila hasil yang diperoleh dalam uji *One Way ANOVA* mendapatkan nilai signifikansi $>0,05$ artinya data tersebut homogen atau tidak ada perbedaan secara signifikan, sedangkan apabila data yang diperoleh mendapatkan nilai signifikansi $<0,05$ artinya data tersebut tidak homogen atau terdapat perbedaan pada hasil. Data yang diperoleh selanjutnya dilakukan analisis dengan menggunakan *Post hoc test* untuk melihat perbedaan tiap kelompok. Hasil yang diperoleh pada *Post hoc test* menggunakan *Tukey test* mendapatkan nilai signifikansi $>0,05$ artinya data tidak terdapat perbedaan secara nyata, sebaliknya apabila hasil nilai signifikansi $<0,05$ artinya data terdapat perbedaan secara nyata antar kelompok.

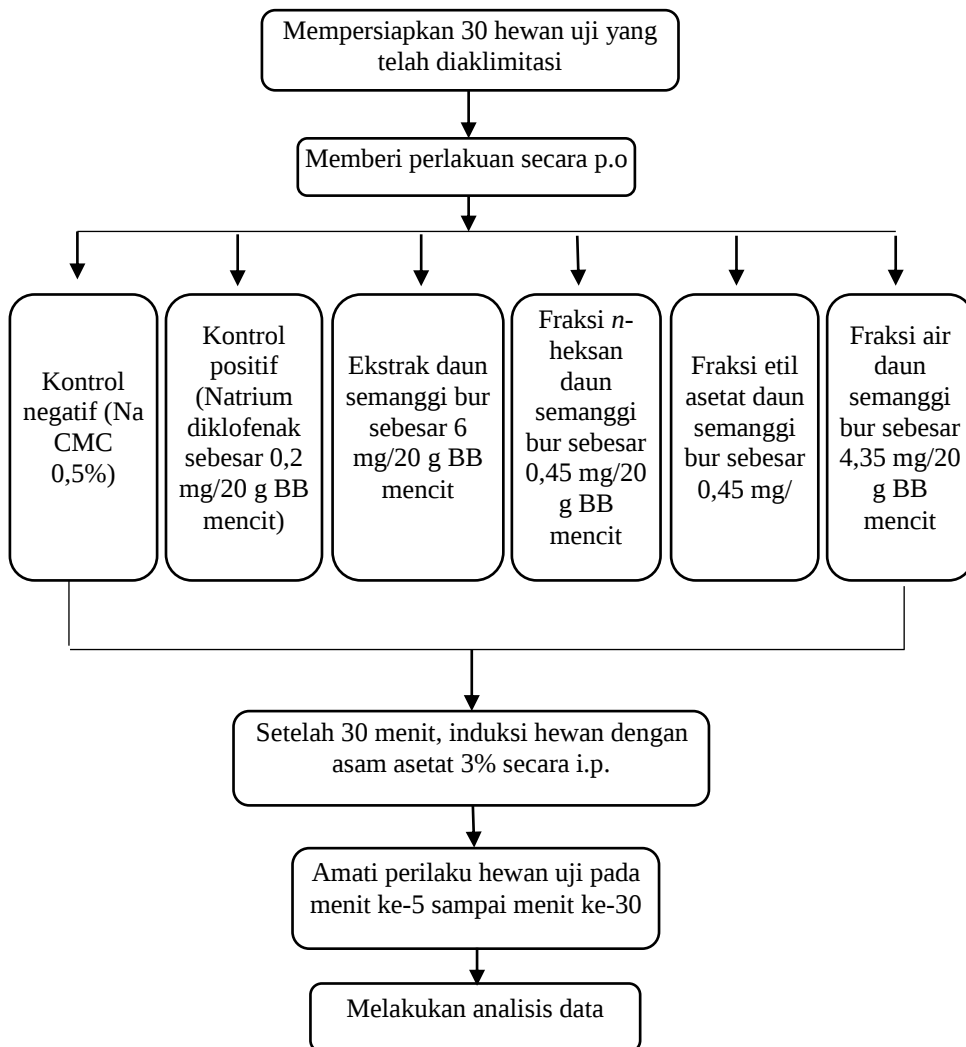
F. Alur penelitian

1. Pembuatan dan identifikasi bahan awal



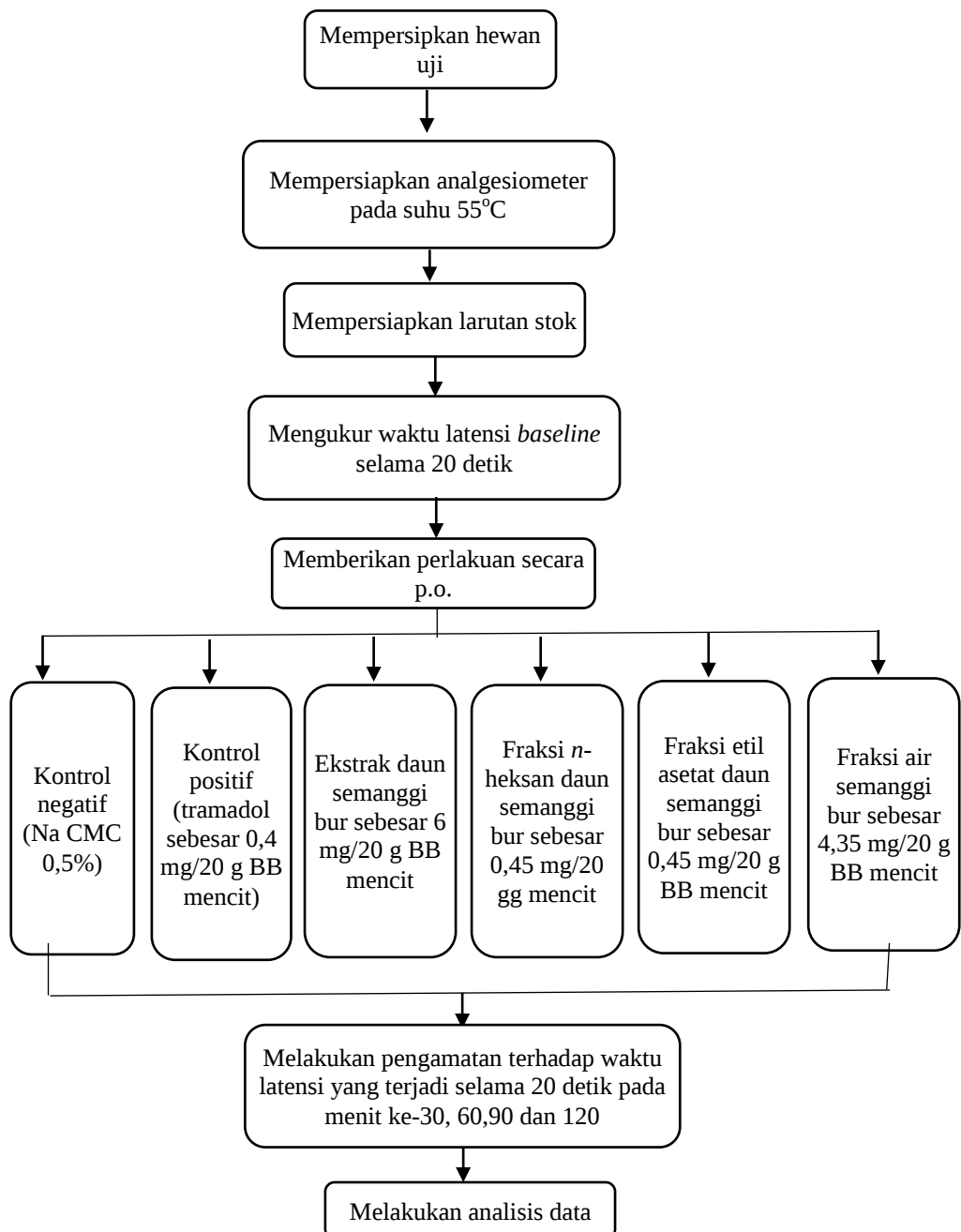
Gambar 3. Prosedur ekstraksi dan fraksinasi daun semanggi bur

2. Pengujian analgesik dengan metode *Writhing test*



Gambar 4. Prosedur analgesik metode *Writhing test*

3. Pengujian analgesik dengan metode *hot plate test*



Gambar 5. Prosedur analgesik metode *hot plate test*