

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **1) Jenis penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan yaitu eksperimen nyata

#### **2) Tempat dan waktu penelitian**

##### **a. Tempat**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Farmasi Bahan Alam, Poltekkes Kemenkes Kupang.

##### **b. Waktu**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret hingga Juni 2025

#### **3) Populasi dan Sampel**

##### **a. Populasi**

Populasi dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan (*Mus musculus* L.), yang dijadikan objek uji untuk mengamati aktivitas analgetik

##### **b. Sampel dan teknik sampling**

Sampel dalam penelitian ini adalah 15 ekor mencit jantan berwarna putih (*Mus musculus* L.) yang dipilih dan dibagi ke dalam lima kelompok perlakuan.

#### **4) Variabel Penelitian**

##### **a. Variabel bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu dosis infusa daun afrika (*Vernonia amygdalina* D.) dengan dosis 4,5%, 9%, dan 18%.

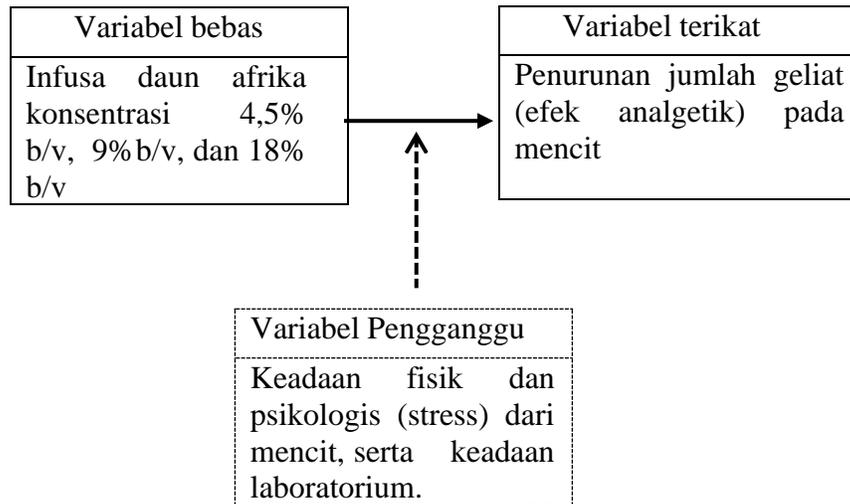
**b. Variabel terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu efek analgetik infusa daun afrika (*Vernonia amygdalina* D.) terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus* L).

**c. Variabel pengganggu**

Variabel pengganggu dalam penelitian ini mencakup kondisi tanah tempat tumbuhnya tanaman daun afrika (*Vernonia amygdalina* D.), kondisi fisik dan psikologis mencit serta keadaan laboratorium.

**5) Kerangka Konsep**



Keterangan:

Diteliti:



Tidak diteliti:



**Gambar 2. Hubungan antar variabel**

## 6. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala
1	Daun Afrika	Daun afrika ( <i>Vernonia amygdalina</i> D.) yang berasal dari Tarus-Osiloa dan telah melalui proses detriminasi, dikeringkan, dihaluskan menjadi serbuk simplisia, dan digunakan sebagai bahan baku pembuatan infusa.	-	Nominal
2	Infusa Daun Afrika	Sediaan cair yang diperoleh dengan mengekstrak serbuk simplisia daun afrika menggunakan aquades panas (90°C) selama 15 menit, lalu disaring dan disesuaikan volumenya hingga 100 ml dan digunakan dalam konsentrasi 4,5%, 9%, dan 18%.	Termometer, bejana infusa, gelas ukur, Timbangan.	Nominal
3	Mencit Jantan Putih	Hewan coba dari spesies <i>Mus musculus</i>	Timbangan digital,	Rasio

		L.berjenis kelamin jantan berwarna putih dengan berat badan berkisar antara 20-40 gram yang digunakan sebagai model uji aktivitas analgetik.	kandang percobaan.	
4	Geliat (aktivitas analgetik)	Respon fisiologis berupa kontraksi otot perut dan peregangan kaki belakang mencit setelah diinduksi larutan asam asetat glacial 1%. Frekuensi geliat dihitung sebagai indikator nyeri dan digunakan untuk menilai aktivitas analgetik.	lembar observasi.	Ratio
5	Ibuprofen	Obat golongan antiinflamasi non-steroid (NSAID) yang diberikan secara oral dengan dosis 52 mg/kgBB sebagai kontrol positif (Pembanding terhadap efek infusa).	Timbangan, pipet, spuit	Nominal

6	Na-CMC 1%	Larutan yang diberikan secara oral sebagai kontrol negatif dan pelarut.	Gelas ukur, spuit	Nominal
---	-----------	---	-------------------	---------

---

**Tabel 1. Defenisi Operasional**

## **7. Alat dan bahan**

### **a) Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus, bejana infusa, kain flannel, sonde oral, wadah infusa (botol), aluminium foil, pipet ukur 0,1 ml , timbangan digital, sarung tangan, stopwatch, spuit 1 cc, kamera, tabung reaksi, kertas saring, corong, hote plate, termometer, gelas kimia, erlenmeyer, pipet tetes, cawan porselin, buku, dan balpoint.

### **b) Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun Afrika (*Vernonia amygdalina* D.), Asam Asetat Glasial 1%, Na-CMC, kaplet Ibuprofen, aquadest, alkohol 70%, serbuk magnesium, larutan HCl pekat, larutan FeCl<sub>3</sub> 1%, larutan Petroleum Eter, pereaksi Liebermann-Burchard (larutan asam asetat anhidrat, dan Asam sulfat pekat).

## **8. Prosedur Penelitian**

### **a) Persiapan bahan uji**

Pengambilan sampel daun afrika (*Vernonia amygdalina* D.) dilakukan di Osiloa-Tarus, Kec. Kupang Tengah, Kab. Kupang dengan kriteria daun yaitu berwarna hijau tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, tidak berbintik putih maupun kuning dan segar. Daun afrika yang diambil adalah yang telah dideterminasi di Departemen Biologi, Universitas Padjajaran terlebih dahulu. Pengambilan sampel dilaksanakan pada sore hari, kemudian dilanjutkan dengan penyortiran basah dan pencucian menggunakan air yang mengalir, setelah itu dijemur dan dikeringkan. Berikutnya, dilakukan penyortiran kering dan penghalusan menggunakan blender sampai menjadi serbuk simplisia. Serbuk tersebut selanjutnya, diayak dengan ayakan mesh No. 45 untuk mendapatkan tekstur yang halus. Simplisia yang telah siap digunakan dimasukkan ke dalam toples kaca, ditutup dengan rapat dan disimpan ditempat yang aman.

### **b) Pembuatan infusa daun afrika 4,5%, 9% dan 18%**

- 1) Infusa daun afrika 4,5% Ditimbang serbuk simplisia daun afrika sebanyak 4,5 g, kemudian dimasukkan ke dalam panci infusa bagian atas, selanjutnya tambahkan aquades sebanyak 100 ml dan dipanaskan selama 15 menit dihitung

saat suhu mencapai 90°C, sambil sesekali diaduk. Kemudian disaring selagi panas menggunakan kain flanel bersih dan ditambahkan air panas secukupnya melalui ampas sampai mencapai volume 100 ml. Kemudian dimasukkan dalam botol vial yang sudah diberi label.

- 2) Infusa daun afrika 9% Ditimbang serbuk simplisia daun afrika sebanyak 9 g, kemudian dimasukkan ke dalam panci infusa bagian atas, selanjutnya tambahkan aquades sebanyak 100 ml dan dipanaskan selama 15 menit terhitung saat suhu mencapai 90°C, sambil sesekali diaduk. Kemudian disaring selagi panas menggunakan kain flanel bersih dan ditambahkan air panas secukupnya melalui ampas sampai mencapai volume 100 ml. Kemudian dimasukkan dalam botol vial yang sudah diberi label.
- 3) Infusa daun afrika 18% Ditimbang serbuk simplisia daun afrika sebanyak 18 g, kemudian dimasukkan ke dalam panci infusa bagian atas, selanjutnya tambahkan aquades sebanyak 100 ml dan dipanaskan selama 15 menit terhitung saat suhu mencapai 90°C, sambil sesekali diaduk. Kemudian disaring selagi panas menggunakan kain flanel bersih dan ditambahkan air panas secukupnya melalui ampas sampai

mencapai volume 100 ml. Kemudian dimasukkan dalam botol vial yang sudah diberi label.

**c) Penentuan dosis infusa daun afrika**

1. Infusa daun afrika 4,5% b/v

$$\frac{100ml \times 0,0026}{20 g BB} = 0,26 \text{ ml} / 20 \text{ g BB}$$

Volume pemberian terhadap tikus yakni 0,26 ml.

2. Infusa Daun afrika 9 % b/v

$$\frac{100ml \times 0,0026}{20 g BB} = 0,26 \text{ ml} / 20 \text{ g BB}$$

Volume pemberian terhadap tikus yakni 0,26 ml.

3. Infusa daun afrika 18 % b/v

$$\frac{100ml \times 0,0026}{20 g BB} = 0,26 \text{ ml} / 20 \text{ g BB}$$

Volume pemberian terhadap tikus yakni 0,26 ml.

**d) Identifikasi kandungan senyawa**

1. Uji Flavonoid

Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan menggunakan 5 ml infusa daun afrika dimasukkan ke dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan 2 ml etanol 70% setelah itu ditambahkan 500 mg serbuk magnesium, dan ditambahkan beberapa tetes HCL pekat. Jika terbentuk warna merah, jingga, atau merah keunguan maka infusa positif mengandung flavonoid (Hamad dkk, 2017).

## 2. Uji Tanin

Identifikasi senyawa tanin menggunakan 5 ml infusa daun afrika dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan  $\text{FeCl}_3$  0,1%, lalu diamati apabila terbentuk warna biru-hitam, hijau, biru-hijau dan ada endapan maka infusa positif mengandung tanin (Hamad dkk, 2017)

## 3. Uji terpenoid

Identifikasi senyawa terpenoid menggunakan 5 ml infusa daun afrika dimasukkan ke dalam cawan porselin lalu ditambahkan 5 ml eter dan diuapkan. Residu direaksikan dengan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat, lalu diamati jika terbentuk warna merah atau violet-biru maka infusa daun afrika positif terpenoid (MBunga & Stefany, 2023).

### e) **Penyiapan Larutan Na CMC 1%**

Memanaskan  $\pm 100$  ml air hingga mendidih, kemudian timbang 1 gram Na CMC dan dimasukkan kedalam mortir dan tambahkan 50 ml air panas. Aduk hingga tercampur rata, ditandai dengan terbentuknya partikel putih dan tekstur menyerupai gel. Setelah itu, tambahkan air panas sedikit demi sedikit sambil terus diaduk hingga volume total mencapai 100 ml. Biarkan larutan hingga dingin sebelum digunakan.

**f) Perhitungan dosis ibuprofen**

Dosis Ibuprofen yang lazim digunakan pada orang dewasa adalah 400 mg. Untuk mengonversi dosis tersebut dari manusia dengan beratbadan 70 kg ke mencit putih jantan berbobot 20 g digunakan faktor konversi 0,0026. Dengan demikian, dosis ibuprofen yang diberikan kepada mencit putih jantan dengan berat 20 g adalah:

$$\frac{400 \text{ mg} \times 0,0026}{20 \text{ g BB}} = 1,04/0,5\text{ml}/20\text{gBB}$$

Volume pemberian untuk mencit yaitu 0,5 ml

**g) Pengambilan serbuk ibuprofen**

Ambil 20 kaplet Ibuprofen, lalu hitung rata-rata berat dari 20 kaplet tersebut, yaitu 650 mg. Kemudian dihaluskan dengan cara digerus. Suspensi yang akan dibuat memiliki volume 50 ml. Sehingga total zat aktif ibuprofen yang terkandung adalah 104 mg per 50 ml. Dengan demikian, jumlah serbuk zat aktif ibuprofen yang perlu ditimbang adalah =

$$\frac{104 \text{ mg}}{400 \text{ mg}} \times 650 \text{ mg} = 169 \text{ mg}$$

**h) Pengelompokkan hewan uji**

Pada pengelompokan hewan uji ini digunakan rumus Festing untuk menghitung berapa hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini.

Rumus yang digunakan yaitu

E = Jumlah total sampel – Jumlah total kelompok

E = (n x t) – a t

$$10 = (n \times 5) - 5$$

$$15 = 5n$$

$$n = 3$$

Keterangan:

E = Nilai rentang yang harus dicapai (10-20)

n = Jumlah sampel tiap kelompok

t = Jumlah total kelompok perlakuan (t)

<b>Kelompok</b>	<b>Perlakuan</b>
K-	diberikan Na CMC 1% sebanyak 0,5 ml secara peroral
K+	diberikan ibuprofen dengan dosis 52 mg/KgBB secara peroral
P1	diberikan infusa daun afrika konsentrasi 4,5% ( 0,26ml/20gBB) dan larutan Na CMC 0,5 ml secara peroral
P2	diberikan infusa daun afrika konsentrasi 9% ( 0,26ml/20gBB) dan larutan Na. CMC 0,5 ml secara peroral
P3	diberikan infusa daun afrika konsentrasi 18% ( 0,26ml/20gBB) dan larutan Na. CMC 0,5 ml secara peroral.

**Tabel 2. Pembagian Kelompok Uji Analgetik**

### **i) Uji efek analgetik**

Pengujian aktivitas analgetik daun afrika dilakukan dengan metode kimia yakni metode *siegmund* dimana pada hari pengujian mencit harus terlebih dahulu dipuasakan selama 8 jam tetapi minumannya tetap diberikan. Setelah itu mencit ditimbang dan diberi tanda pada kaki, kemudian masing-masing mencit diberi larutan bahan uji secara oral sesuai dengan kelompoknya dan 15 menit kemudian kepada masing-masing kelompok perlakuan disuntikan secara intraperitoneal, diberikan 0,1 ml larutan asam asetat glasial 1%, kemudian dilakukan pengamatan dan pengamatan jumlah geliat setiap 10 menit selama 1 jam. Geliat ditandai dengan mencit yang mengempiskan perutnya dan menarik kedua kaki ke belakang, sehingga tubuhnya terlihat memanjang (MBunga & Stefany, 2023).

Aktivitas analgetik dinyatakan dalam jumlah geliat dan persentase proteksi (%), dimana semakin sedikit jumlah geliat yang dihasilkan menunjukkan aktivitas analgetik yang baik dan sebaliknya. Sedangkan dalam persentase proteksi (%), semakin tinggi persen proteksi (%) menunjukkan aktivitas analgetik yang baik juga sebaliknya.

Persentase proteksi dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Proteksi (\%)} = \frac{\text{Jumlah geliat kontrol} - \text{Jumlah geliat kelompok uji}}{\text{Jumlah geliat kontrol}} \times 100\%$$

#### **E. Analisis Data**

Analisis data menggunakan metode *One Way Anova* ( $p < 0,05$ ) untuk melihat adanya perbedaan aktivitas analgesik antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan berdasarkan presentase daya analgesik. Selanjutnya, dilakukan uji lanjut menggunakan metode *LSD (Least Significant Difference)* guna membandingkan persentase aktivitas analgesik (jumlah geliat) diantara berbagai konsentrasi.