# BAB III

# METODOLOGI PENELITIAN

# BAB III METODOLOGI PENELITIAN

## 3.1 Rencana Penelitian

Metode ini dilakukan secara eksperimental. Eksperimental merupakan percobaan dengan melakukan kelompok menggunakan variabel bebas dan variabel terikat. Pada pengujian analgetik ini metode yang dipilih adalah metode *sigmund* (metode geliat) karena metode ini cukup peka dalam menilai rangsang nyeri yang diberikan.

### 3.1.1 Variabel Penelitian

Penelitian ini mempunyai dua variabel yakni variabel bebas yang terdiri dari ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.), dengan dosis 50 mg/kg BB; 100 mg/kg BB; 200 mg/kg BB; dengan konsentrasi 1%, kontrol positif menggunakan methampiron 1% dan kontrol negatif menggunakan suspensi CMC 0,5% dan veriabel terikat yaitu jumlah geliat mencit putih jantan .

### 3.1.2 Parameter Penelitian

Parameterdalam penelitian ini adalah jumlah geliat mencit dan daya analgetik.

## 3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian

### 3.2.1 Jadwal Penelitian

Penelitian ini di lakukan dari bulan januari sampai dengan maret 2021

### 3.2.2 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim Nusantara Al-wasliyah Medan

## 3.3 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tumbuhan daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.), etanol 96%, aquadest, CMC *(Carboxy Methyl cellulose),* asam asetat, tablet antalgin (methampiron) 500mg, besi (III) klorida, kalium iodida, Bismuth (II) nitarat, serbuk magnesium, asam klorida (p), amil alkohol, asam asetat anhidrida, asam sulfat (p), kloroform, raksa (II) klorida, iodium, asam nitrat, toluen.

## 3.4 Peralatan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah lemari pengering, blender, bejana atau toples, timbangan hewan (*Ohaus),* timbangan analitik *(Metter Toledo)*, *rotary evaporator (Eyela)*, kertas saring , alat-alat gelas *(Pyrex),* penangas air, jarum suntik *(One Med)* 1 ml, oral sonde, aluminium foil, lumpang dan stamper.

## 3.5 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

### 3.5.1 Pengumpulan Tumbuhan

Sampel yang digunakan adalah daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) diambil dari Desa Rajamaligas 3, Kecamatan Huta Bayu Raja, Kabupaten Simalungun, Provinsi Sumatera Utara. Pengambilan dilakukan secara purposif yaitu tanpa membandingkan tumbuhan yang ada di daerah lain.

### 3.5.2 Determinasi Sampel

Determinasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Medanense (MEDA) Departemen Biologi FMIPA Universitas Sumatera Utara Jalan Bioteknologi No. 1 Kampus USU Medan.

### 3.5.3 Pengolahan Sampel

Pengolahan sampel dilakukan dengan mengumpulkan daun rambutan, lalu dibersihkan dari kotoran, kemudian dicuci dengan air mengalir lalu ditiriskan. Setelah itu dikeringkan dengan diangin-anginkan pada suhu kamar (37o) atau di keringkan dengan lampu pijar.

## 3.6 Pemeriksaan Karakteristik Simplisia

Pemeriksan karakterisasi simplisia meliputi pemeriksaan makroskopik, mikroskopik, penetapan kadar air, penetapan kadar sari yang larut dalam air, penetapan kadar sari yang larut dalam etanol, penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu yang tidak larut dalam asam (Depkes RI, 1995).

### 3.6.1 Pemeriksaan Makroskopik

 Pemeriksaan makroskopik dilakukan pada simplisia kering meliputi pemeriksaan bentuk, rasa, warna dan bau (Depkes RI, 1995).

### 3.6.2 Pemeriksaan Mikroskopik

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap serbuk simplisia daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.). Serbuk simplisia ditaburkan di atas kaca objek kemudian ditetesi dengan larutan kloralhidrat 70% dan di tutup dengan deck glass, lalu diamati di bawah mikroskop.

### 3.6.3 Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode azeotropi (destilasi toluena), menggunakan toluena yang dijenuhkan terlebih dahulu dengan cara: sebanyak 200 mL toluen dimasukkan kedalam labu alas bulat, lalu ditambahkan 2 mL akuades, kemudian dipasang alat dan dilakukan destilasi selama 2 jam. Destilasi dihentikan dan dibiarkan dingin selama ± 30 menit, kemudian volume air dalam tabung penerima dibaca dengan ketelitian 0,001 mL (Depkes RI, 1995).

Dimasukkan 5 g serbuk simplisia yang telah ditimbang seksama, lalu dipanaskan hati-hati selama 15 menit, setelah toluen mendidih, kecepatan tetesan diatur 2 tetes untuk tiap detik sampai sebagian besar air terdestilasi, bagian dalam pendingin dibilas dengan toluen. Destilasi dilanjutkan selama 5 menit, kemudian tabung penerima dibiarkan mendingin pada suhu kamar. Setelah air dan toluen memisah sempurna, volume air dibaca dengan ketelitian 0,001 mL. Selisih kedua volume air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa. Kadar air dihitung dalam persen:

 $\% Kadar cair=\frac{Volume akhir-Volume awal }{Berat sampel} ×100\% $ $\% Kadar cair=\frac{Volume akhir-Volume awal }{Berat sampel} ×100\%$$\% Kadar cair=\frac{Volume akhir-Volume awal }{Berat sampel} ×100\%$(Depkes RI, 1995).

### 3.6.4 Penetapan Kadar Sari Larut dalam Air

$kadar Sari larut dalam air$kadar sari larut dalam air= $\frac{Berat cawan +sari larut dalam air -berat cawan }{Berat simplisia } ×5 ×100\% $

Sebanyak 5 g serbuk simplisia maserasi selama 24 jam dalam 100 mL air-kloroform (2,5 mL kloroform dalam air suling 1000 mL) dalam labu bersumbat sambil sesekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan 18 jam. Disaring, 20 mL filtrat diuapkan sampai kering dalam cawan penguap yang berdasar rata kemudian sisa dipanaskan pada suhu 105°C sampai bobot tetap. Kadar persen sari yang larut dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1995). $ Kadar sari larut dalam air=$ $\frac{Berat cawan + Sari larut dalam air -Berat cawan }{Berat simplisia} ×5×100\%$ $\frac{Berat cawan +sari larut dalam air -berat cawan }{Berat simplisia } ×5 ×100\%$

### 3.6.5 Penetapan Kadar Sari Larut dalam Etanol

Sebanyak 5 g serbuk yang telah dikeringkan di udara, dimaserasi selama 24 jam dalam 100 mL etanol 96% dalam labu bersumbat sambil sesekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan 18 jam. Disaring, 20 mL filtrat diuapkan sampai kering dalam cawan penguap yang berdasar rata kemudian sisa dipanaskan pada suhu 105°C sampai bobot tetap. Kadar persen sari yang larut dalam etanol dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Depkes RI, 1995).

$$\frac{\begin{array}{c}Kadar sari larut etanol=\\Berat cawan +sari larut dalam etanol -berat cawan \end{array}}{Berat simplisia } ×5 ×100\%$$

 $Kadar sari larut etanol=$ $\frac{Berat cawan + Sari larut dalam etanol -Berat cawan }{Berat simplisia} ×5×100\%$ $\frac{Berat cawan +sari larut dalam etanol -berat cawan }{Berat simplisia } ×5 ×100\%$

### 3.6.6 Penetapan Kadar Abu Total

Sebanyak 2 g sampai 5 g zat yang telah digerus dan ditimbang seksama dimasukkan dalam krus porselin yang telah dipijar dan ditara, kemudian diratakan. Krus dipijar perlahan-lahan hingga arang habis, kemudian didinginkan dan ditimbang sampai diperoleh bobot tetap. Kadar abu total dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1995).

Kadar abu total = $\frac{Berat cawan +abu total -berat cawan }{Berat simplisia }×100\%$

### 3.6.7 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh dalam penetapan kadar abu didihkan dalam 25 ml asam klorida encer 2N selama 5 menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring dengan kertas saring dan dipijarkan. Kemudian didinginkan dan ditimbang sampai diperoleh bobot tetap. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Depkes RI, 1995).

Kadar abu tidak larut dalam asam = $\frac{Berat cawan +abu total -berat cawan }{Berat simplisia }×100\%$

## 3.7 Pembuatan Larutan Pereaksi

### 3.7.1 Pereaksi Asam Klorida 2 N

 Sebanyak 17 mL asam klorida pekat dilarutkan dalam air suling hingga volume 100 mL (Depkes RI, 1995).

### 3.7.2 Pereaksi Bouchardat

 Sebanyak 4 gram Kalium Iodida ditimbang kemudian dilarutkan dalam air suling, ditambahkan iodium sebanyak 2 gram dan dicukupkan dengan air suling hingga 100 mL (Depkes RI, 1995).

### 3.7.3 Pereaksi Dragendorf

Sebanyak 8 gram bismut (III) nitrat dilarutkan dalam asam nitrat 20 mL. Kemudian dicampur dengan larutan kalium iodida sebanyak 27,2 gram dalam 50 mL air suling. Campuran didiamkan sampai memisah sempurna, larutan jernih diambil dan diencerkan dengan air secukupnya hingga 100 mL (Depkes RI, 1995).

### 3.7.4 Pereaksi Mayer

 Sebanyak 1,35 gram raksa (II) klorida dilarutkan dengan 60 mL air suling. Kemudian pada wadah lain sebanyak 5 gram Kalium Iodida dilarutkan dalam 10 mL air lalu campurkan keduanya ditambahkan air suling 100 mL (Depkes RI, 1995).

## 3.8 Skrining Fitokimia

 Pemeriksaan skrining fitokimia ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum Linn*) untuk mengetahui golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, steroid/triterpenoid dan tanin (Depkes RI, 1995).

### 3.8.1 Pemeriksaan Alkaloid

Sebanyak 0,1 g ekstrak dan serbuk daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.*)* dimasukkan ke dalam erlenmayer ditambah etanol sampai terendam, ditambahkan 1 mL HCL 0,2 N, di cek pH 2-3, ditutup pakai plastik yang diatasnya diletakkan kapas basah, dipanaskan diatas penangas air. Setelah mendidih dihitung 30 menit didingingkan dan disaring. Alkaloid disebut positif jika terjadi endapan atau kekeruhan pada paling sedikit 2 tabung reaksi dari percobaan diatas. Fitrat dibagi menjadi empat. Tiga dipakai untuk percobaan berikut:

 Filtrat dipakai 1 mL ditambahkan 3 tetes pereaksi Bouchardat maka akan terbentuk endapan warna coklat sampai hitam jika mengandung alkaloid

 Filtrat dipakai 1 mL ditambahkan 3 tetes pereaksi Dragendrof maka akan terbentuk endapan berwarna coklat sampai coklat kehitaman jika mengandung alkaloid.

 Filtrat dipakai 1 mL ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer maka akan terbentuk endapan mengumpal berwarna putih atau putih kekuningan jika mengandung alkaloid.

 Untuk memperkuat dugaan dilanjutkan pemeriksaan lebih lanjut. Fitrat sisa didalam cawan ditambahkan 2 mL amonia, dicek pH 8-9, dimasukkan kedalam corong pisah, ditambah 20 mL kloroform, dikocok pelan dan ditunggu ½ jam sampai memisah. Diambil lapisan bawah (lapisan kloroform), ditambahkan natrium sulfat anhidrat sampai kloroform bebas air, disaring dan diuapkan fitrat didalam cawan porselin diatas penangas air, dilarutkan residunya dengan sedikit HCL 2 N sampai pH asam, lalu dibagi menjadi 3 tabung dilanjutkan perlakuan seperti diatas dengan pereaksi Mayer, Bouchardat dan Dragendorf. Alkaloid positif jika endapan atau kekeruhan paling banyak dua dari tiga percobaan diatas (Depkes RI, 1995).

### 3.8.2 Pemeriksaan Flavonoid

 Sebanyak 0,1 g ekstrak dan serbuk daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.*)* dimasukkan kedalam erlenmayer ditambah metanol sampai terendam direfluks minimal ½ jam, disaring. Fitrat yang pekat diencerkan dengan air lalu dimasukkan kedalam corong pisah. Kemudian ditambahkan 5 mL n-heksana dikocok hati-hati, lalu didiamkan sebentar. Kemudian ditambahkan lapisan metanol (lapisan bawah) 1 mL dimasukkan kedalam cawan porselin, diuapkan. Sisanya dilarutkan dalam 5 mL etil asetat, diaduk dan diambil bagian yang menggenang lalu dibagi 2 dan di uji dengan cara berikut:

 Larutan uji diuapkan sampai kering, sisa dilarutkan dalam 2 mL etanol 96% lalu ditambahkan 0,5 g serbuk seng dan 2 mL asam klorida 2 N, didiamkan selama 1 menit. Kemudian ditambahkan 10 tetes asam klorida pekat, jika terbentuk warna merah/kuning/ungu menunjukkan adanya flavonoid.

 Larutan uji diuapkan sampai kering, sisa dilarutkan dalam 2 mL etanol 96% lalu ditambah 0,1 g serbuk magnesium dan ditambah 10 tetes asam klorida pekat, jika terbentuk warna merah/kuning/ungu menunjukkan adanya flavonoid (Depkes RI, 1995).

### 3.8.3 Pemeriksaan Saponin

 Sebanyak 0,1 g ekstrak dan serbuk daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan air panas, didinginkan dan kemudian dikocok kuat-kuat selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm sampai 10 cm dan tidak hilang dengan penambahan 2 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1995).

### 3.8.4 Pemeriksaan Tanin

Sebanyak 0,1 g ekstrak dan serbuk daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) dimasukkan kedalam Erlenmayer direndam dengan aquadest selama 30 menit, disaring. Fitrat yang pekat diencerkan dengan air lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 3 tetes pereaksi besi (III) klorida 1% (b/v), jika terjadi warna hijau/biru/biru kehitaman menunjukkan adanya tanin (Depkes RI, 1995).

### 3.8.5 Pemeriksaan Triterpenoid/Steroid

Sebanyak 0,1 g ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.*)* dimasukkan kedalam Erlenmayer ditambah n-heksan sampai terendam, dibiarkan minimal 2 jam, disaring. Fitrat 10 mL dimasukkan kedalam cawan porselin diuapkan sampai kering, sisanya ditambahkan pereaksi Lieberman-Bouchard (asam asetat anhidridat 3 tetes dan asam sulfat pekat 3 tetes). Bila terbentuk warna ungu/ungu kemerahan menunjukkan adanya triterpenoid sedangkan bila terbentuk warna biru/biru hijau menunjukkan adanya steroid (Depkes RI, 1995).

## 3.9 Pembuatan Ekstrak Daun Rambutan

Serbuk simplisia daun diekstraksi dengan cara maserasi dengan etanol.

Cara kerja :

 Serbuk simplisia sebanyak 10 bagian (500 gram) dimasukkan kedalam bejana kemudian dituangkan 75 bagian (3750 mL) cairan penyari etanol lalu diaduk – aduk sesekali. Setelah 5 hari campuran diserkai dan ampasnya diperas. Cuci ampasnya dengan penyari etanol secukupnya sehingga diperoleh 100 bagian (5000 mL) maserat. Dipindahkan kedalam bejana tertutup, dibiarkan ditempat sejuk terlindung dari cahaya selama 2 hari kemudian disaring, maserat lalu dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* lalu ditimbang (Depkes RI, 1979).

## 3.10 Pengujian Farmakologi

### 3.10.1 Pemilihan dan Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji yang dipakai adalah mencit jantan yang sehat dengan berat badan 20-30g. Berperilaku normal, berbulu halus, tidak mengalami penyusutan berat badan setiap harinya. Mencit yang dipakai adalah 25 ekor dimana dalam setiap perlakuan digunakan 5 ekor mencit. Sebelum digunakan hewan diadaptasi selama 14 hari dengan memberi makan dan minum yang cukup dan lingkungan yang bersih

 Percobaan ini dilakukan dengan 5 perlakuan dan dibagi menjadi 5 kelompok, untuk menentukan jumlah subjek hewan percobaan perkelompoknya dan untuk mendapatkan data yang valid dilakukan pengulangan sesuai dengan rumus Federer (1997)

( t-1) (n-1) ≥15

Dimana: t= kelompok perlakuan= 5

 n= jumlah sampel per kelompok

Maka: (t-1) (n-1) ≥15

 (5-1) (n-1) ≥ 15

 4n – 4 ≥ 15

 n ≥ 4,75 ̴ 5 (Sudjana, 1992).

### 3.10.2 Pembuatan Suspensi CMC 0,5%

Ditimbang CMC sebanyak 500 mg lalu di taburkan didalam cawan porselin yang berisi air suling panas sebanyak 1/3 dari bagian air, didiamkan selama 30 menit diaduk sampai diperoleh masa yang transparan kemudian ditambahkan aquadest sedikit demi sedikit lalu dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 mL, volumenya dicukupkan dengan aquadest hingga 100 mL (Anief, 2003)

### 3.10.3 Pembuatan Suspensi Ekstrak Daun Rambutan

Ekstrak ditimbang sebanyak 1 g kemudian dimasukkan ke dalam lumpang yang berisi sedikit suspensi CMC 0.5% digerus homogen lalu dicukupkan dengan suspensi CMC 0,5% hingga 100 mL dalam labu tentukur 100 mL.

### 3.10.4 Pembuatan Suspensi Methampiron

Ditimbang 20 tablet, hitung bobot rata-rata tiap tablet. Jika ditimbang satu persatu, tidak boleh lebih dari 2 tablet yang masing-masing bobotnya menyimpang dari bobot rata-ratanya lebih besar dari harga yang telah di tetapkan (Depkes RI, 1979). Methampiron ditimbang sesuai perhitungan kemudian disuspensi dengan larutan Na CMC 0,5% sedikit demi sedikit sambil dikocok dan diad kan sampai 100 mL.

### 3.10.5 Pembuatan Larutan asam Asetat 1 %

 Asam asetat glasial mengandung tidak kurang dari 99,5% dan tidak lebih dari 100,5% b/b asam asetat (Depkes RI, 1995). Dari asam asetat glasial di buat asam asetat 1% dengan metode pengenceran menggunakan aqua dest sebagai pelarut (Afrianti, dkk, 2014).

### 3.10.6 Perlakuan hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan dengan berat rata-rata 20-30 gram dan berumur 2-3 bulan. Hewan uji tersebut diadaptasikan terlebih dahulu dengan lingkungan penelitian selama 1 hari dan dipuasakan ± 18 jam sebelum penelitian dimulai dengan tetap diberikan minum. Hewan dikelompokkan ke dalam 5 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit, kemudian masing-masing mencit dalam kelompok ditimbang dan diberi tanda pada bagian ekor. Setiap kelompok diberikan perlakuan secara per oral dengan tingkatan dosis yang ditentukan,

a) Kelompok I : kontrol negatif (-), diberi CMC 0,5%;

b) Kelompok II : kontrol positif (+), diberi Methampiron 1 %

c) Kelompok III : Diberi ekstrak daun rambutan dosis 50 mg/kg BB

d) Kelompok IV : Diberi ekstrak daun rambutan dosis 100 mg/kg BB

e) Kelompok V : Diberi ekstrak daun rambutan dosis 200 mg/kg BB

Setelah mencit diberi perlakuan sesuai kelompok perlakuan, 30 menit kemudian mencit di beri induktor nyeri yaitu asam asetat 1 % secara intra peritonial. Geliat mencit yang terjadi diamati selama 1 jam .

### 3.10.7 Analisis Data

Data penelitian berupa jumlah geliat kumulatif pada msing-masing kelompok perlakuan. Dari data tersebut kemudian digunakan untuk menghitung persentase daya analgetik bahan uji yaitu kemampuan bahan uji dalam mengurangi respon geliat mencit yang disebabkan oleh induksi asam asetat. Persentase ini menggambarkan daya analgetik bahan uji. Persentase analgetik diperoleh dengan membandingkan rata-rata jumlah geliat kelompok bahan uji terhadap kelompok control negatif. Persentase daya analgetik terhadap induksi asam asetat dengan rumus (Turner, 1965).

$\% Daya analgetik=100-\frac{Ekperimen}{Kontrol}×100\%$

Untuk melihat persentase efektivitas analgetik bahan uji, dilakukan dengan membandingkan persen efek analgetik kelompok bahan uji terhadap persen daya analgetik kelompok kontrol positif (Metampiron) yang dihitung dengan rumus dibawah ini (Pudjiastuti, dkk, 2000).

$$\% Efektivitas=\frac{\% Daya analgetik kel bahan uji}{\% Daya analgetik kel kontrol positif}×100\%$$

Data yang diperoleh dari jumlah geliat dianalisis dengan uji analisis varians (ANOVA) satu arah dengan taraf kepercayaan 95% menggunakan *SPSS versi 20.0 for windows.* Dilakukan uji kolmogorof-smirnov dan shapiro wilk untuk mengetahui normalitas dan distribusi masing-masing kelompok perlakuan. Selanjutnya dilakukan Uji Analisis Varians (ANOVA), maksud dilakukan uji ANOVA yaitu untuk menguji rata-rata perbandingan data tiap kelompok. Apabila terdapat perbedaan yang bermakna maka uji stastistik dilanjutkan dengan *Uji Tukey* untuk mengetahui perbedaan bermakna (signifikan) atau tidak antar kelompok perlakuan.