

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan berlangsung selama 3 bulan, dimulai dari bulan Januari hingga Maret 2025. Tempat penelitian di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Farmakologi Prodi Farmasi S1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik, oven, blender, ayakan 40 mesh, bejana maserasi, gelas ukur (*pyrex*), rak tabung reaksi, tabung reaksi, penjepit tabung, mortir dan stamper, pipet tetes, *stopwatch*, batang pegaduk, *vacum rotary evaporator*, kandang mencit, *waterbath*, erlenmeyer (*pyrex*), corong kaca, cawan, termometer *stick*, tanur listrik, desikator, homogenizer dan beaker glass (*pyrex*).

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah limbah kulit buah nangka tua, etanol 96% (CV. Nurul Jaya Medical), kertas saring, kain flanel, alumunium foil, sonde oral, spuit 1 cc, Natrium CMC 1% (CV. Nurul Jaya Medical), aquadest (Bratachem), Asam mefenamat (apotek), 25 ekor mencit berjenis kelamin jantan, asam sulfat (CV. Kimia Jaya Labora), kloroform (CV. Nurul Jaya Medical), HCl 2%

(CV. Kimia Jaya Labora), pereaksi mayer, pereaksi wagner, pereaksi dragendorf, FeCl_3 (CV. Kimia Jaya Labora), dan asam asetat anhidrida (CV. Nurul Jaya Medical).

3.3 Rancangan Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak etanol 96% dari kulit buah nangka (*Artocarpus heterophyllus Lam.*) yang diberikan pada mencit (*Mus musculus*) jantan.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah efek analgetik yang dihasilkan oleh ekstrak etanol 96% dari kulit buah nangka (*Artocarpus heterophyllus Lam.*), dan jumlah waktu respon menjelentik ekor hewan uji.

3.3.3 Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini yaitu mencit yang sehat, jenis kelamin jantan, umur 2 sampai 3 bulan, berat badan 20 sampai 40 g, pelarut etanol 96%, dan limbah kulit buah nangka tua (matang).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman nangka (*Artocarpus heterophyllus Lam.*) dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, sedangkan proses determinasi hewan uji dilakukan di Laboratorium Farmakologi yang berlokasi di Prodi Farmasi S1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.4.2 Preparasi Sampel

Pada tahap ini, pembuatan serbuk simplisia dilakukan hanya dilakukan menggunakan bagian kulit dari buah nangka tua atau yang sudah matang. Sampel ini diambil dari Desa Ujungrusi, Kecamatan Adiwerna, Kabupaten Tegal, Jawa Tengah. Limbah yang berasal dari kulit buah nangka yang matang dikumpulkan, kemudian bagian eksocarp (lapisan paling luar, kasar, berduri) dan mesocarp (lapisan tengah atau daging buah/serat yang lengket) dipisahkan melalui proses sortasi basah dan dicuci menggunakan air bersih yang mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan segala kotoran dan benda asing yang menempel pada kulit buah nangka tersebut. Setelah tahap sortasi basah, kulit tersebut dirajang dan dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan dalam oven dengan suhu 60°C sampai diperoleh simplisia yang kering. Setelah diperoleh simplisia kering kemudian dihaluskan menggunakan blender. Selanjutnya diayak dengan ayakan nomor 40 mesh untuk mendapatkan tekstur yang halus, lalu ditimbang dan disimpan di dalam wadah penyimpanan. Sampel yang dibutuhkan sebanyak 4 kg (Amir et al., 2023).

3.4.3 Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Kulit Buah Nangka

Pembuatan ekstrak etanol dari kulit buah nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Sebanyak 500 g serbuk kulit buah nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) dimasukkan ke dalam wadah maserasi

lalu ditambahkan etanol 96% sebanyak 2500 mL dengan perbandingan 1:5 hingga semua sampel terendam. Selanjutnya ditutup rapat menggunakan alumunium foil. Proses maserasi dilakukan selama 3 hari dan sesekali dilakukan pengadukan. Kemudian disaring menggunakan kertas saring atau kain flanel. Filtrat yang dihasilkan dikumpulkan dalam satu wadah sebagai ekstrak cair. Hasil filtrat kemudian diuapkan dengan alat *vacum rotary evaporator* pada suhu 60°C. Pemekatan dilanjutkan dengan menggunakan *waterbath* dengan suhu 60°C sampai diperoleh ekstrak yang kental (Auliah et.al., 2019). Setelah ekstrak kental diperoleh, kemudian dilakukan perhitungan persentase rendemen menggunakan rumus :

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

3.4.5 Skrining Fitokimia

Sampel yang digunakan untuk skrining fitokimia adalah ekstrak etanol 96% dari kulit buah nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam.).

1.4.5.1 Uji Alkaloid

Dalam penelitian ini digunakan 3 pereaksi yaitu pereaksi *mayer* (reaksi dianggap positif jika terbentuk endapan putih), pereaksi *wagner* (reaksi dianggap positif jika terbentuk endapan coklat), dan pereaksi *dragendorff* (reaksi dianggap positif jika terbentuk endapan merah bata). Pengamatan dilakukan dengan mengambil ekstrak sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 1

mL HCl 2%, lalu dipanaskan, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat diambil sebanyak 3 tetes, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 tetes pereaksi (Sentat et al., 2016).

3.4.5.3 Uji Flavonoid

Ambil 1 mL ekstrak, kemudian tambahkan serbuk magnesium secukupnya dan 5 tetes asam klorida pekat. Perubahan warna filtrat yang menjadi jingga-merah menandakan reaksi positif adanya senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid diaktifkan oleh serbuk magnesium dan asam klorida, sehingga menghasilkan efek warna jingga-merah (Sulistyarini et al., 2019).

3.4.5.4 Uji Fenol

Diambil 1 mL ekstrak etanol dari kulit buah nangka (*Artocarpus heterophyllus Lam.*), kemudian tambahkan FeCl_3 sebanyak 3 tetes. Jika warna berubah menjadi hijau-biru kehitaman menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung fenol (Ningsih, 2017).

3.4.5.5 Uji Terpenoid

Diambil ekstrak etanol 96% kulit buah nangka (*Artocarpus heterophyllus Lam.*) sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan 2 mL kloroform, lalu ditambahkan 10 tetes asam asetat anhidrida dan

3 tetes H_2SO_4 pekat. Hasil positif terpenoid ditandai dengan terbentuknya larutan yang berwarna merah (Ningsih, 2017).

3.4.6 Uji Bebas Etanol

Pengujian bebas etanol dilakukan dengan mengambil 1 mL ekstrak dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian tambahkan asam sulfat sebanyak 2 tetes dan 2 tetes asam asetat, lalu dipanaskan. Ekstrak dianggap bebas etanol jika warna ekstrak tetap cokelat atau tidak berubah warna dan tidak ada aroma iodoform (Astutik et al., 2022).

3.4.7 Standardisasi Ekstrak

Standardisasi merupakan proses menetapkan karakteristik atau sifat berdasarkan parameter tertentu agar diperoleh ekstrak yang terstandar. Ekstrak kulit buah nangka distandardisasi menggunakan dua jenis parameter yaitu spesifik dan non spesifik (Yuliana et al., 2022).

3.4.7.1 Parameter Spesifik

1. Uji Organoleptis

Pada pengujian organoleptis dilakukan pengamatan secara langsung seperti bentuk, warna, rasa dan bau pada ekstrak (Yuliana et al., 2022).

3.4.7.2 Parameter Non Spesifik

1. Uji Kadar Air

Dimasukan ekstrak kulit buah nangka sebanyak 1 g ke dalam alat *Moisture Analyzer Balance*. Prinsip *Moisture Analyzer Balance* yaitu melibatkan proses pengeringan sampai mencapai berat konstan, sehingga presentase kadar air dapat langsung terbaca melalui monitor pada alat *Moisture Analyzer Balance* (Irmayanti, 2022).

2. Uji Kadar Abu Total

Dimasukkan 1 g ekstrak kulit buah nangka ke dalam cawan yang telah ditimbang sebelumnya, kemudian diabukan di dalam tanur listrik dengan suhu 600°C hingga proses pengabuan selesai. Selanjutnya, didinginkan dengan menggunakan desikator (Purnama et al., 2021). Hitung persentase kandungan abu menggunakan rumus:

$$\% \text{ Kadar Abu Total} = \frac{W2 - W0}{W1} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 = Berat cawan kosong (g)

W1 = Berat ekstrak awal (g)

W2 = Berat cawan + berat ekstrak setelah di abukan (g)

3. Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh dari pengujian kadar abu total dilarutkan dalam 25 mL HCl, kemudian dididihkan

selama 5 menit (FHI, 2017). Larutan yang dihasilkan disaring menggunakan kertas saring yang bebas dari abu dan dibilas menggunakan aquadest hingga tidak ada klorida tersisa. Selanjutnya kertas saring dikeringkan menggunakan *furnace* didinginkan, dan kemudian ditimbang (Sri et al., 2021). Selanjutnya, hitung persentase dari kadar abu yang tidak larut dalam asam menggunakan rumus berikut :

$$\% \text{ Kadar} = \frac{A1 - C - A0}{B} \times 100\%$$

Keterangan :

A1 = Berat cawan + ekstrak setelah pemijaran (g)

A0 = Berat cawan kosong (g)

B = Berat sampel awal (g)

C = Bobot kertas saring kosong (g)

3.4.8 Pembuatan Larutan Uji

3.4.8.1 Larutan Na CMC 1% (Kontrol Negatif)

Pembuatan larutan Na CMC 1% dilakukan dengan cara menimbang serbuk Na CMC sebanyak 1 g dan 100 mL aquadest. Aquadest tersebut diambil sebanyak 50 mL untuk dipanaskan diatas kompor listrik dengan suhu 70°C. Selanjutnya aquadest yang telah dipanaskan dipindahkan ke dalam mortir dan ditambahkan Na CMC sedikit demi sedikit. Kemudian diaduk hingga homogen dan ditambahkan aquadest hingga 100 mL (Djuwarno & Abdulkadir, 2019).

3.4.8.2 Larutan Suspensi Asam Mefenamat (Kontrol Positif)

Asam mefenamat digunakan sebagai kontrol positif karena telah banyak digunakan untuk mengobati nyeri dan kemampuannya dalam menghambat mediator nyeri yang dikenal sebagai prostaglandin (Veniartin et al, 2024). Proses yang dilakukan adalah dengan menimbang tiga tablet asam mefenamat dan mencari rata-rata beratnya. Tablet tersebut kemudian dihaluskan menggunakan mortir, dan berat serbuk yang dihasilkan untuk sampel adalah 54,6 mg. Serbuk yang sudah ditimbang selanjutnya dilarutkan dalam 10 mL Na CMC 1% dan diaduk hingga menjadi homogen (Sulistiawati et al., 2024).

3.4.8.3 Pembuatan Suspensi Ekstrak Kulit Buah Nangka

Ekstrak kental kulit buah nangka dibuat suspensi dengan 3 variasi dosis yaitu 500 mg/kgBB, 600 mg/kgBB dan 800 mg/kg BB. Ekstrak ditimbang sesuai dengan variasi dosis yang digunakan, kemudian disuspensikan dengan Na CMC 1% hingga 10 mL ke dalam labu ukur hingga diperoleh dosis yang diinginkan (Amir et al., 2023).

3.4.8.4 Pengujian Efektivitas Analgetik

Pada penelitian ini, dilakukan penyiapan 25 mencit putih (*Mus musculus*) berjenis kelamin jantan, berusia 2 hingga 3 bulan, berat badan antara 20 sampai 40 g dan kondisi kesehatan yang baik, serta diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari. Kemudian dibagi menjadi 5 kelompok, setiap kelompok terdapat 5 ekor mencit. Terdapat kelompok netral yang tidak diberikan bahan uji apapun untuk mengetahui perbandingan antara kelompok mencit yang diberikan bahan uji. Kelompok pertama merupakan kelompok negatif dengan diberikan larutan Na CMC 1%, kelompok kedua diberikan asam mefenamat dengan dosis 500 mg/kgBB sebagai kontrol positif. Kelompok ketiga (perlakuan 1), dimana mencit diberikan ekstrak etanol 96% dari kulit buah nangka dengan dosis 500 mg/kgBB. Kelompok keempat (perlakuan 2), dimana mencit diberikan ekstrak etanol 96% kulit buah nangka dengan dosis 600 mg/kgBB. Kelompok kelima (perlakuan 3), dimana mencit diberikan ekstrak etanol 96% dari kulit buah nangka dengan dosis 800 mg/kgBB. Pemberian larutan uji dilakukan secara oral (Amir et al., 2023). Setelah

diberikan perlakuan, 30 menit kemudian hewan uji diuji efektivitas analgetik (Keswara & Handayani, 2019).

Pengujian efektivitas analgetik dalam penelitian ini menggunakan metode *tail immersion*. Tahap-tahap yang dilakukan yaitu dengan mencelupkan bagian bawah ekor mencit dengan panjang 3 cm dari ujung ekor ke dalam beaker glass berisi air yang dipanaskan menggunakan kompor listrik dengan suhu 55°C dan dijaga agar stabil untuk memicu reaksi nyeri. Pengamatan dilakukan terhadap reaksi refleks mencit yang mengangkat ekornya sebagai respon terhadap rasa nyeri. Waktu reaksi mengangkat ekor dicatat pada menit ke-0, 30, 60, 90, dan 120 setelah dilakukan pemberian obat standar dan ekstrak etanol 96% dari kulit buah nangka. Data yang diambil berupa waktu respon nyeri atau lama periode antar pencelupan ekor mencit hingga timbulnya reaksi refleks mengangkat ekor (Amir et al., 2023). Waktu tersebut dihitung dalam satuan detik dengan *stopwatch*. Setelah itu dihitung persentase penghambatan nyeri (Gunji dan Seru, 2020).

Perhitungan persen daya analgetik dengan metode *Tail Immersion* dinyatakan dalam persen hambatan nyeri

(PHN) yang dihitung dengan rumus sebagai berikut
(Rohmania et al., 2024) :

$$\% \text{ Hambatan Nyeri} = \frac{T_2 - T_1}{T_1} \times 100\%$$

Keterangan :

T1 : Rata-rata waktu respon (detik) pada pemberian kelompok kontrol tanpa obat.

T2 : Rata-rata waktu respon (detik) pada pemberian bahan uji.

Setelah diketahui nilai persentase hambatan nyeri, selanjutnya dilakukan perhitungan persentase efektivitas analgetik dengan rumus sebagai berikut
(Fathnur et al., 2022).

$$\% \text{ Efektivitas Analgetik} = \frac{\% \text{ Hambatan Nyeri Bahan Uji}}{\% \text{ Hambatan Nyeri Kontrol (+)}} \times 100\%$$

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengujian efektivitas analgetik ekstrak etnol 96% dari kulit buah nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) menggunakan metode *Tail Immersion* pada mencit (*Mus musculus*) jantan dianalisis secara statistik menggunakan perangkat lunak SPSS versi 25. Analisis ini dilakukan dengan metode *One way ANOVA* untuk mengetahui rata-rata/pengaruh dari suatu percobaan yang menggunakan tiga atau lebih kelompok perlakuan dengan nilai $p < 0,05$ dianggap signifikan (Amir et al., 2023). Selanjutnya dilakukan uji lanjutan yaitu uji *Least Significance Difference* (LSD) untuk mengetahui perbedaan secara nyata antara kelompok perlakuan (Auliah et al., 2019).