

BAB III

KERANGKA KONSEP

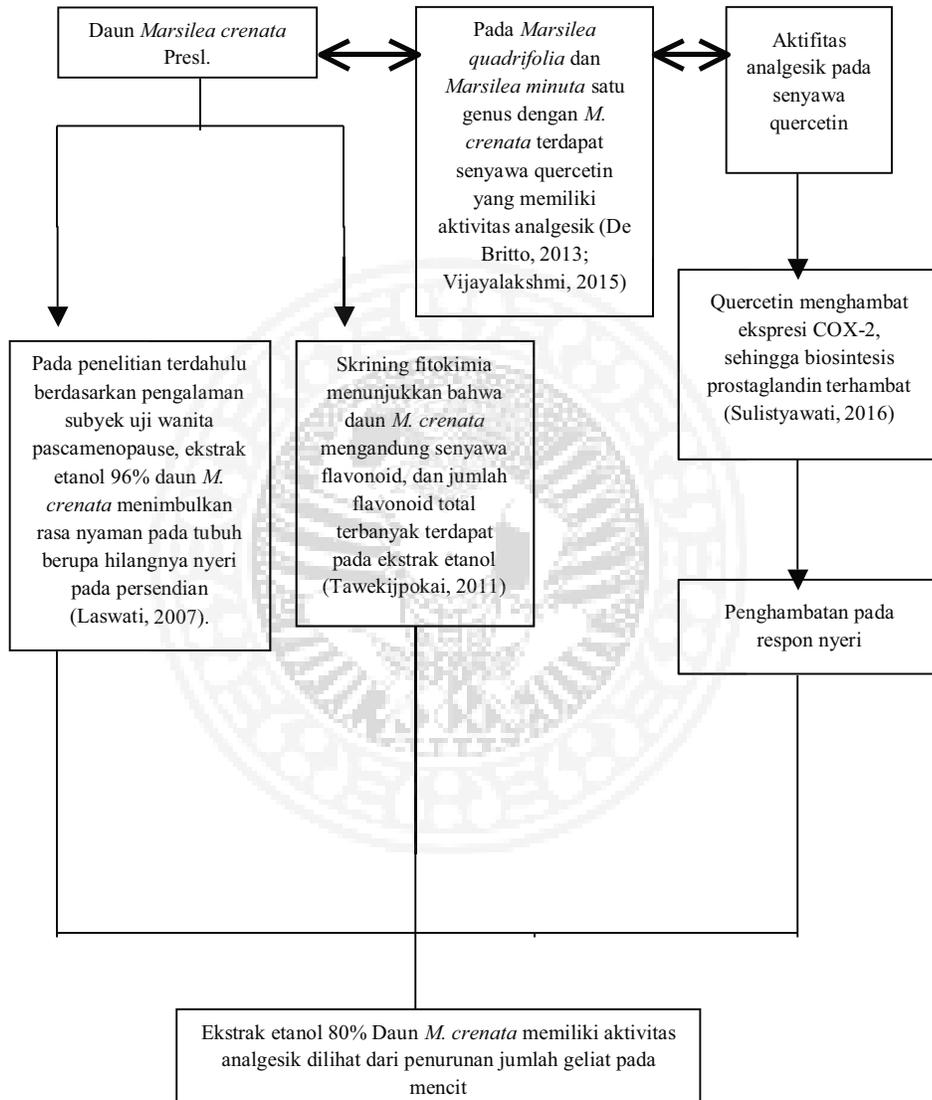
3.1. Uraian Kerangka Konseptual

Semakin populernya daun *M. crenata* di kalangan masyarakat, karena diketahui memiliki banyak kegunaan, maka mulai dilakukan penelitian-penelitian terkait daun *M. crenata* tersebut. Salah satu penelitian yang sudah dilakukan yaitu, pada pemberian ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* pada wanita pascamenopause, akan memberikan efek nyaman dikarenakan hilangnya pegal pada persendian. Selain itu, tanaman *M. trifolia* dan *M. quadrifolia* yang juga masih satu genus dengan *M. crenata*, memiliki aktivitas sebagai analgesik (Laswati, 2007; Laizurman, 2011; Sengupta, 2012).

Dari penelitian lain juga diketahui bahwa daun *M. crenata* memiliki kandungan flavonoid. Pada daun *M. quadrifolia* dan *M. minuta* telah diketahui memiliki kandungan flavonoid quercetin. Maka, dapat diduga daun *M. crenata* juga memiliki kandungan flavonoid quercetin. Quercetin memiliki banyak fungsi, salah satu nya adalah sebagai analgesik. Mekanisme quercetin bekerja sebagai analgesik, yaitu dengan menghambat ekspresi COX-2, yang akan mengurangi produksi prostaglandin oleh asam arakidonat dan mengurangi rasa nyeri (Tawekijpokai, 2011; De Britto, 2013; Vijayalakshmi, 2015; Sulistyawati, 2016).

Berdasarkan hasil-hasil penelitian tersebut mengenai daun *M. crenata*, maka dapat diduga bahwa daun *M. crenata* memiliki aktivitas sebagai analgesik. Metode uji aktivitas analgesik metode geliat yang digunakan untuk mengetahui aktivitas analgesik dari ekstrak etanol 80% daun *M. crenata*, adalah dengan melihat jumlah geliat dari mencit. Mencit akan diinduksi nyeri dengan asam asetat, yang kemudian akan menyebabkan timbulnya geliat pada mencit sebagai respon nyeri. Jumlah geliat mencit akan menurun jika bahan uji, yaitu ekstrak etanol 80% daun *M. crenata*, yang diberikan kepada mencit, memiliki aktivitas sebagai analgesik (Vogel, 2002).

3.2 Bagan Kerangka Konseptual



3.3. Hipotesa Penelitian

Ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* memiliki aktivitas sebagai analgesik dengan terlihatnya penurunan jumlah geliat mencit (*Mus musculus*) pada uji aktivitas analgesik dengan metode geliat.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Departemen Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

4.2. Bahan-bahan yang Digunakan

4.2.1. Bahan Tanaman

Bahan yang akan digunakan adalah daun *M. crenata* yang didapat dari daerah Benowo, Surabaya pada bulan Mei 2016, yang dipanen pada umur 2 bulan. Sebanyak 10 kg daun segar. Daun *M. crenata* dalam keadaan segar dikumpulkan dan dibersihkan, lalu dikeringkan di bawah sinar matahari pagi.

4.2.2. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya, yaitu n-heksana, etil asetat, etanol 96% teknis, CMC-Na 0,5%, asam asetat glacial, ibuprofen tablet generik 400 mg produksi Indo Pharma, aquades.

4.2.3. Hewan Uji

Pada penelitian ini digunakan 36 ekor mencit jantan galur BALB/c yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan 20 sampai 30 gram yang didapatkan dari Laboratorium Hewan Departemen Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Untuk mengurangi faktor-faktor yang dapat mempengaruhi hasil penelitian, digunakan hewan uji dengan galur, lingkungan dan makanan yang sama. Hewan uji sebanyak 36 ekor mencit selanjutnya dibagi ke dalam 6 kelompok uji, yaitu, kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif, kelompok perlakuan I, kelompok perlakuan II, kelompok perlakuan III, dan kelompok perlakuan IV. Pembagian kelompok beserta perlakuan masing-masing kelompok yang diberikan tertera pada Gambar 4.5. Skema Pembagian Kelompok Uji.

4.3. Alat – Alat yang Digunakan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, timbangan listrik, timbangan mencit, maserator, corong pisah, *rotary evaporator*, alat suntik, sonde oral, pelat KLT Silica Gel 60 F-254, lampu UV 254 nm dan 366 nm.

4.4. Prosedur Penelitian

4.4.1. Pembuatan Ekstrak

Serbuk halus daun *M. crenata* sebanyak 250 g diekstraksi dengan cara maserasi dengan pelarut n-heksana. Residu dari ekstraksi tersebut kemudian di maserasi dengan pelarut etil asetat dengan jumlah yang sama, dan langkah yang sama. Kemudian residu yang sudah dikeringkan dari hasil ekstraksi etil asetat tersebut dimaserasi dengan 1 L pelarut etanol 80% selama 24 jam. Setelah didiamkan rendaman tersebut disaring dengan corong buchner yang dihubungkan dengan pompa vakum untuk mendapatkan filtratnya. Selanjutnya, dilakukan remaserasi dengan 750 ml etanol 80%, setelah itu dilakukan penyaringan dan remaserasi dilakukan lagi dengan 750 ml etanol 80%. Filtrat yang diperoleh digabungkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental. Langkah-langkah pembuatan ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* dapat dilihat pada Gambar 4.7. Skema Pembuatan Ekstrak Etanol 80% Daun *M. crenata*.

4.4.2. Skrining Fitokimia dengan Kromatografi Lapis Tipis

Identifikasi Terpenoid

Sedikit ekstrak dilarutkan dengan etanol 80% kemudian ditotolkan melalui pipa kapiler pada pelat KLT Silica Gel 60 F-254 sebagai fase diam. Fase gerak yang digunakan yaitu n-heksana : etil asetat = 4:1. Hasil KLT disemprot dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat. Adanya terpenoid menimbulkan noda berwarna merah/merah ungu.

Identifikasi Flavonoid

Sedikit ekstrak dilarutkan dengan etanol 80% kemudian ditotolkan pada fase diam Silica Gel 60 F-254 dengan fase gerak butanol – asam asetat glasial – air (4:1:5) hasil KLT disemprot dengan penampak noda asam sitrat borat. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya noda berwarna kuning intensif.

4.4.3 Penentuan Jumlah Hewan Uji

Hewan uji dibagi kedalam lima kelompok, yang dilakukan dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL), yakni dengan melakukan pemberian nomor pada hewan uji, kemudian dilakukan pengundian. Jumlah minimal per kelompok mengikuti rumus Federer, yakni :

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

Dimana : t = kelompok perlakuan = 6

n = jumlah hewan uji per kelompok
perlakuan

maka : $(t-1)(n-1) \geq 15$

$$(6-1)(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Pada penelitian ini, digunakan jumlah mencit masing-masing per kelompok adalah 6 ekor. Terdapat 6 kelompok, sehingga dibutuhkan 36 ekor mencit untuk penelitian ini.

4.4.4. Persiapan Hewan Uji

Sebelum digunakan, mencit terlebih dahulu diaklimatisasi selama 1 minggu di kandang mencit sesuai kelompoknya dengan tujuan mengadaptasikan hewan uji dengan lingkungan yang baru. Pada tahap ini dilakukan

pengamatan terhadap keadaan umum hewan uji, meliputi berat badan dan keadaan fisiknya. Mencit yang sehat memiliki ciri-ciri bulu mengkilat, tidak ada kecacatan fisik, dan tidak ada luka pada kulit. Mencit yang dapat digunakan untuk penelitian adalah mencit yang dinyatakan sehat.

4.4.5. Preparasi Bahan Uji

4.4.5.1. Penentuan Dosis Ekstrak Etanol 80% Daun *M.*

crenata

Dosis ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* yang digunakan pada penelitian ini merupakan konversi dosis dari dosis ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* pada penelitian sebelumnya. Terdapat 4 dosis ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini, kelompok masing-masing dosis disebut Kelompok Perlakuan I (KP I); Kelompok Perlakuan II (KP II); Kelompok Perlakuan III (KP III); dan Kelompok Perlakuan IV (KP IV). Berikut dosis pada masing-masing kelompok perlakuan:

Dosis KP I = 2,25 mg/20 g mencit

Dosis KP II = 4,5 mg/20 g mencit

Dosis KP III = 6,75 mg/20 g mencit

Dosis KP IV = 9 mg/20 g mencit

4.4.6. Pembuatan Larutan CMC Na 0,5% (Kontrol Negatif)

Sejumlah 0,25 g CMC Na ditimbang lalu dikembangkan dalam 5 ml air hangat. Setelah

mengembang, CMC Na digerus sampai homogen, setelah itu ditambahkan akuades sampai 50 ml.

4.4.7. Pembuatan Larutan Penginduksi Asam Asetat 0,6%

Asam asetat glasial 0,3 ml dimasukkan dalam labu ukur 50 ml ditambahkan aquadest hingga volumenya 50 ml.

4.4.8. Perhitungan dan Pembuatan Kontrol Positif

Suspensi kontrol positif menggunakan Ibuprofen. Dibutuhkan suspensi Ibuprofen sebanyak 50 ml, diberikan sebanyak 0,4 ml/20 g mencit/hari secara peroral.

Dosis Ibuprofen untuk manusia = 400 mg/70
kg BB/hari

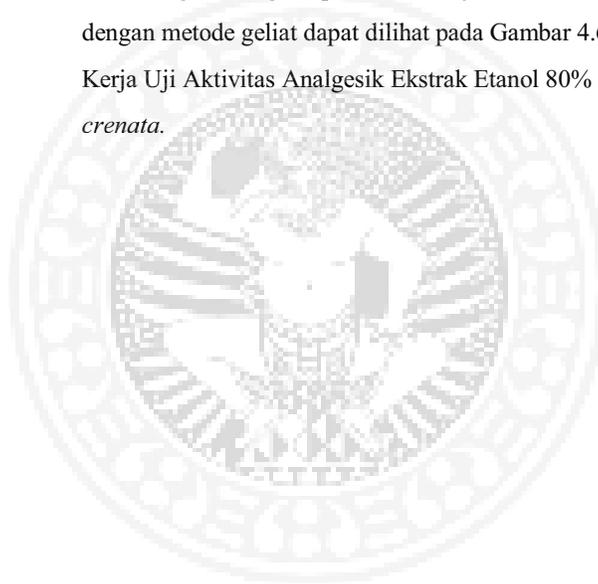
Dosis Ibuprofen untuk mencit = $400 \text{ mg} \times 0,0026$
= 1,04 mg/20 g
mencit/hari (dalam 0,4 ml)

4.4.9. Pelaksanaan Uji Aktivitas Analgesik

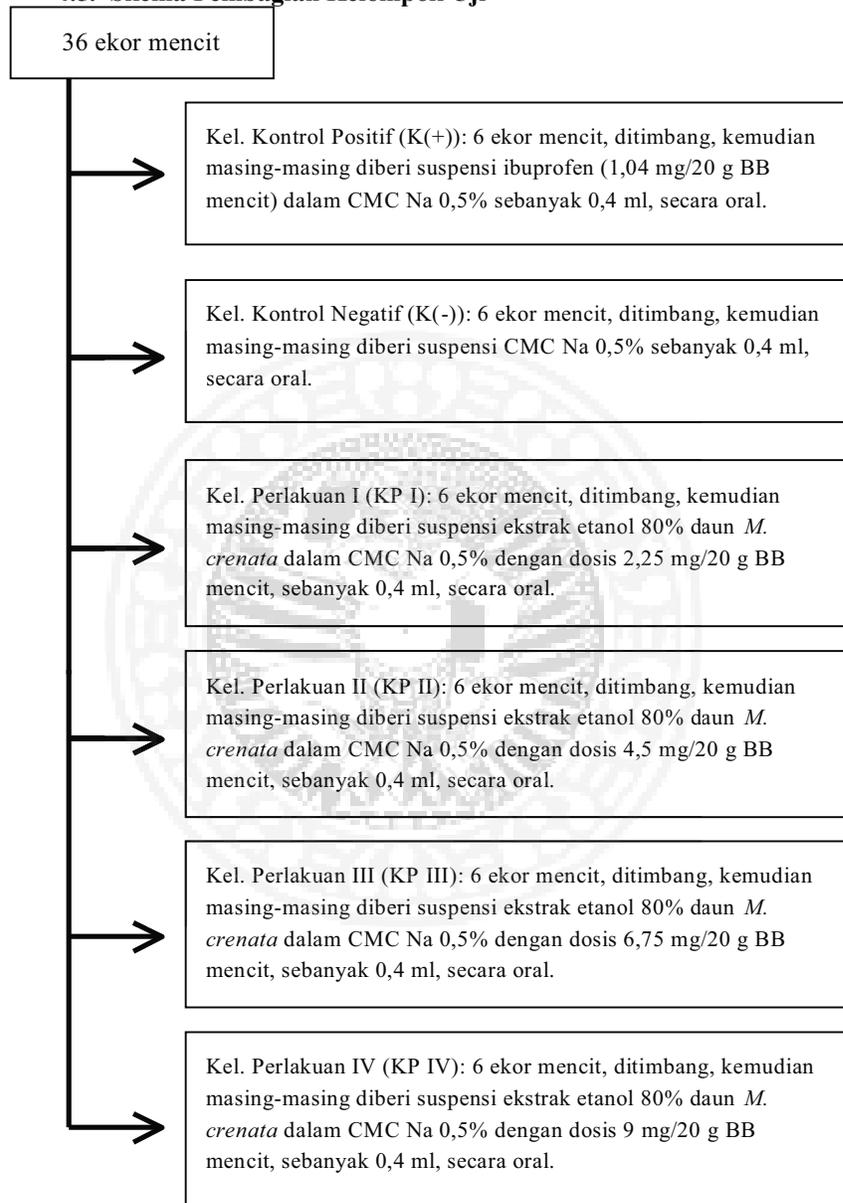
1. Sebelum digunakan, mencit dipuasakan selama 8 jam namun tetap diberi minum air
2. Pada hari pengujian, mencit ditimbang bobotnya.
3. Setiap mencit diberi perlakuan sesuai kelompoknya seperti yang tertera pada 4.5. Skema Pembagian Kelompok Uji.

4. Setelah 30 menit, mencit diinduksi asam asetat 0,6% sebanyak 0,2 ml/20 g BB secara intraperitoneal.
5. Setelah 5 menit, dilakukan penghitungan geliatan selama 30 menit dengan direkam.
6. Semua data yang diperoleh dibuat tabel kemudian dilakukan analisis data.

Langkah-langkah pelaksanaan uji aktivitas analgesik dengan metode geliat dapat dilihat pada Gambar 4.6. Skema Kerja Uji Aktivitas Analgesik Ekstrak Etanol 80% daun *M. crenata*.

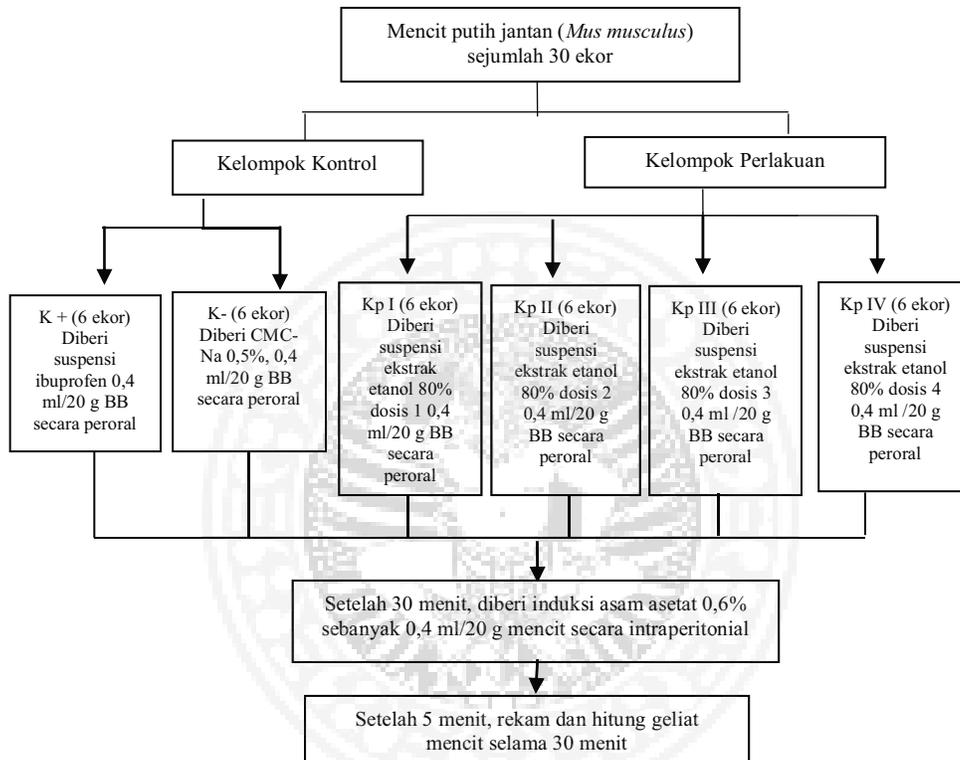


4.5. Skema Pembagian Kelompok Uji



Gambar 4.5. Skema Pembagian Kelompok Uji pada Uji Aktivitas Analgesik Ekstrak Etanol 80% daun *M. crenata*

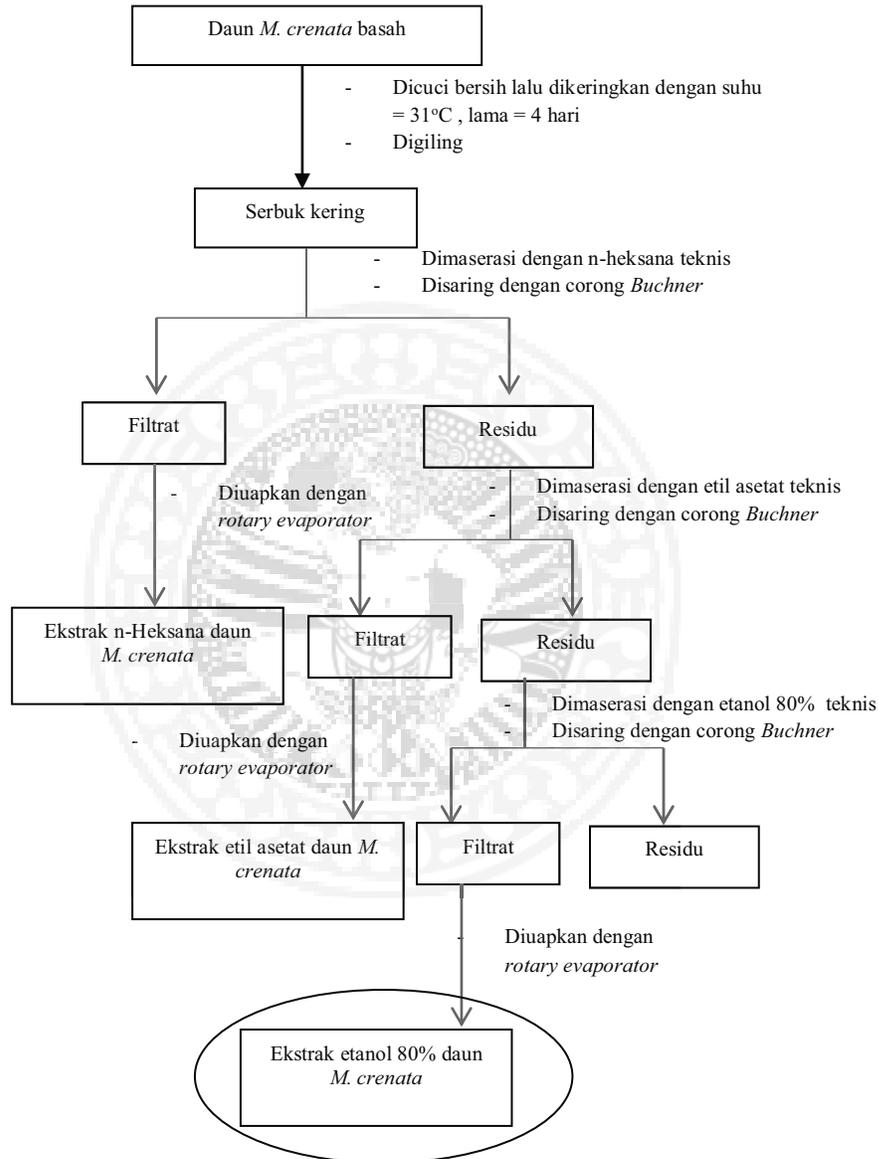
4.6. Skema Kerja Uji Aktivitas Analgesik Ekstrak Etanol 80% daun *M. crenata*



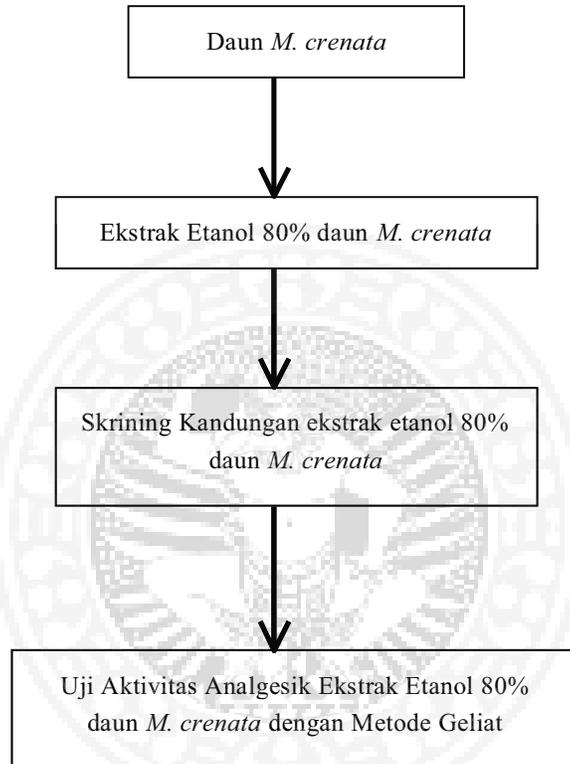
Keterangan :

- K+ = Kontrol positif (Suspensi Ibuprofen 1,04 mg/20 g BB mencit dalam CMC-Na 0,5%)
 K- = Kontrol negatif (CMC-Na 0,5%)
 Kp 1 = Kelompok perlakuan I (Dosis 1 ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* 2,25 mg/20 g BB mencit)
 Kp 2 = Kelompok perlakuan II (Dosis 2 ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* 4,5 mg/20 g BB mencit)
 Kp 3 = Kelompok perlakuan III (Dosis 3 ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* 6,75 mg/20 g BB mencit)
 Kp 3 = Kelompok perlakuan IV (Dosis 4 ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* 9 mg/20 g BB mencit)

Gambar 4.6. Skema Kerja Uji Aktivitas Analgesik Ekstrak Etanol 80% daun *M. crenata*

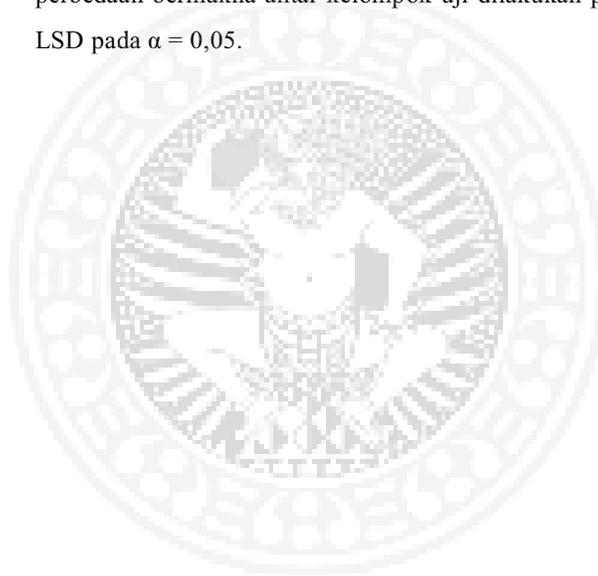
4.5. Skema Pembuatan Ekstrak Etanol 80% daun *M. crenata*Gambar 4.7. Skema Pembuatan Ekstrak Etanol 80% Daun *M. crenata*

4.6. Kerangka Operasional Penelitian



4.7 Analisis Data

Hasil pengamatan pada penelitian analgesik ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* dianalisis dengan uji statistika ANOVA *one-way* pada derajat kepercayaan 95% untuk mengetahui aktivitas yang ditimbulkan berbeda secara bermakna dari beberapa jenis perlakuan. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan bermakna antar kelompok uji dilakukan post-hoc test LSD pada $\alpha = 0,05$.



BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1. Pembuatan Ekstrak

Sebanyak 250 g serbuk halus daun *M. crenata* di ekstraksi secara bertingkat dengan 3 pelarut yang berbeda sifat kepolarannya yaitu yang pertama n-heksana, etil asetat dan kemudian etanol 80%. Hasil akhir dari ekstraksi bertingkat tersebut didapatkan ekstrak etanol 80% sebanyak 46,04 g, sehingga dapat dihitung rendemen ekstrak etanol 80% adalah sebesar 18%.

Serbuk Halus	250 g
Ekstrak Etanol 80%	46,04 g
Rendemen Ekstrak	18%

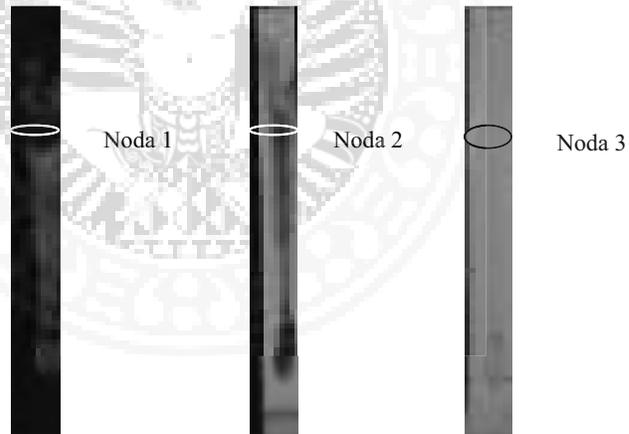
5.2. Skrining Fitokimia dengan Kromatografi Lapis Tipis

5.2.1. Identifikasi Terpenoid

Ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* dilakukan identifikasi golongan senyawa terpenoid dengan Kromatografi Lapis Tipis. Hasil dari identifikasi tersebut adalah ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* tidak menunjukkan adanya noda positif golongan terpenoid.

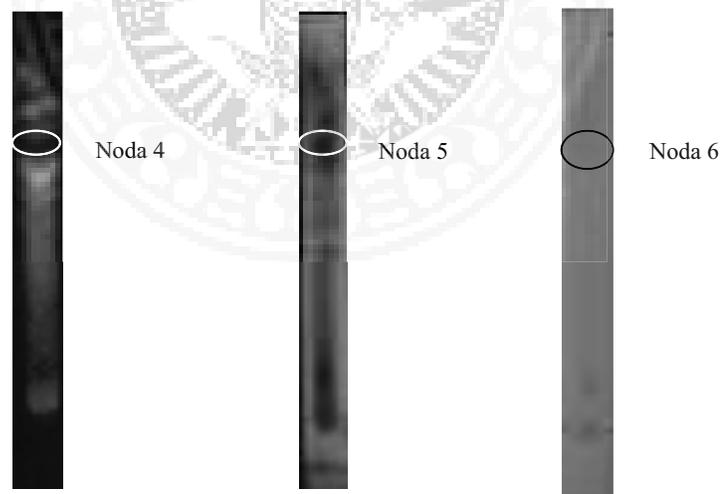
5.2.2. Identifikasi Flavonoid

Ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* dilakukan identifikasi flavonoid dengan metode Kromatografi Lapis Tipis, dan didapatkan hasil positif mengandung flavonoid. Identifikasi menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis menggunakan fase diam silica gel 60 F-254 dan fase gerak butanol : asam asetat : air (4:1:5), didapatkan hasil setelah dieluasi kemudian dilihat pada UV 254 terdapat noda berwarna gelap, dilihat pada UV 366 noda pada Rf yang sama tersebut juga berwarna gelap dan setelah disemprot dengan pereaksi asam sitrat borat, noda pada Rf yang sama tersebut menjadi berwarna kuning, hasil kromatogram tertera pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1. Hasil KLT identifikasi golongan flavonoid pada ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* dengan fase diam = silica gel 60 F 254, fase gerak = butanol : air : asam asetat (4 : 1 : 5), pengamatan dibawah UV 254 nm, pengamatan dibawah UV 366 nm, dan setelah diberi penampak noda asam sitrat borat.

Langkah identifikasi flavonoid selanjutnya yaitu KLT dengan fase diam dan fase gerak yang sama, kemudian diberi penampak noda uap ammonia. Dari hasil kromatogram yang tertera pada Gambar 5.2, pelat KLT setelah dieluasi, lalu dilihat dibawah sinar UV 254, terdapat noda pada Rf yang sama pada KLT yang diberi penampak noda asam sitrat borat, berwarna gelap. Begitu pula jika dilihat pada UV 366 muncul noda tersebut berwarna gelap. Dan setelah diberi penampak noda uap ammonia, noda tersebut menjadi kuning. Rf dan warna noda dapat tertera pada table V.1.



Gambar 5.2. Hasil KLT identifikasi golongan flavonoid dengan KLT pada ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* dengan fase diam Silica Gel 60 F-254 dan fase gerak butanol:air:as.asetat (4:1:5), pengamatan dibawah UV 254 nm, pengamatan dibawah UV 366 nm, dan diberikan uap ammonia.

Tabel V.1. Rf dan warna noda pada KLT identifikasi flavonoid ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* dengan fase diam silica gel 60 F-254, dan fase gerak butanol:as.asetat:air (4:1:5)

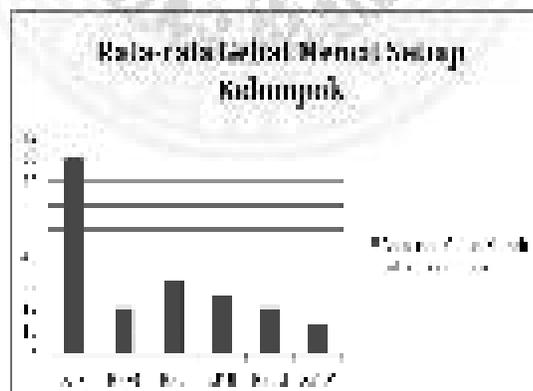
Noda	Warna Noda	Rf
Noda 1	Hitam	0,71
Noda 2	Hitam	0,71
Noda 3	Kuning	0,71
Noda 4	Hitam	0,71
Noda 5	Hitam	0,71
Noda 6	Kuning	0,71

5.3 Uji Aktivitas Analgesik

Hasil jumlah geliat pada mencit setelah diinduksi asam asetat, dihitung selama 30 menit, tertera pada Tabel V.2. Grafik perbandingan rata-rata antar kelompok uji tertera pada Gambar 5.3.

Tabel V.2. Jumlah geliat mencit dan rata-rata geliat mencit dari setiap kelompok uji

Mencit	Kelompok Kontrol Negatif	Kelompok Kontrol Positif	Kelompok Perlakuan I	Kelompok Perlakuan II	Kelompok Perlakuan III	Kelompok Perlakuan IV
1	50	24	27	32	24	10
2	72	19	29	22	13	18
3	88	18	40	23	23	11
4	104	28	24	27	19	14
5	100	10	28	22	18	17
6	65	17	31	18	15	6
Rata-rata jumlah geliat \pm SD	$80 \pm 21,11$	$19 \pm 6,19$	$30 \pm 5,49$	$24 \pm 4,86$	$19 \pm 4,32$	$13 \pm 4,54$



Gambar 5.3 Grafik rata-rata jumlah geliat mencit antar kelompok uji.

Keterangan : K(-) = kontrol negatif

K (+) = kontrol positif

KP I = Kelompok perlakuan I

KP II = Kelompok perlakuan II

KP III = Kelompok perlakuan III

KP IV = Kelompok perlakuan IV

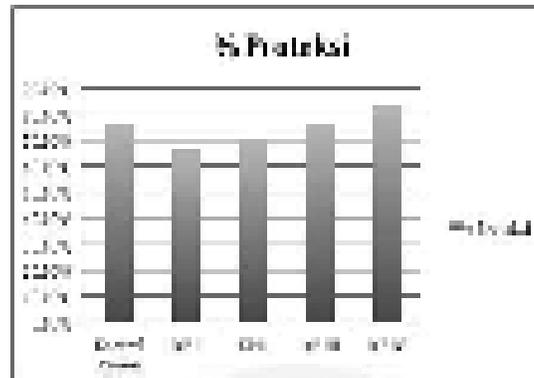
Rata-rata jumlah geliat dari setiap kelompok perlakuan kemudian digunakan untuk menghitung % Proteksi geliat yaitu dengan rumus:

$$\% \text{ Proteksi} = \frac{\text{Rata-rata geliat kelompok kontrol negatif} - \text{Rata-rata geliat kelompok uji} \times 100\%}{\text{Rata-rata geliat kelompok kontrol negatif}}$$

Hasil % Proteksi dari masing-masing kelompok perlakuan setelah dilakukan perhitungan tertera pada Tabel V.3. Dan grafik perbandingan % Proteksi antar kelompok uji tertera pada Gambar 5.4.

Tabel V.3. Hasil perhitungan % Proteksi masing-masing kelompok uji

Kelompok	% Proteksi
Kontrol Positif	76.25%
Kelompok Perlakuan I	62.50%
Kelompok Perlakuan II	70.00%
Kelompok Perlakuan III	76.25%
Kelompok Perlakuan IV	83.75%



Gambar 5.4 Grafik perbandingan % Proteksi antar kelompok. Ket: K(-)= kontrol negatif; K(+)= kontrol positif; KP I= kelompok perlakuan I, KP II= kelompok perlakuan II, KP III= kelompok perlakuan III, KP IV= kelompok perlakuan IV

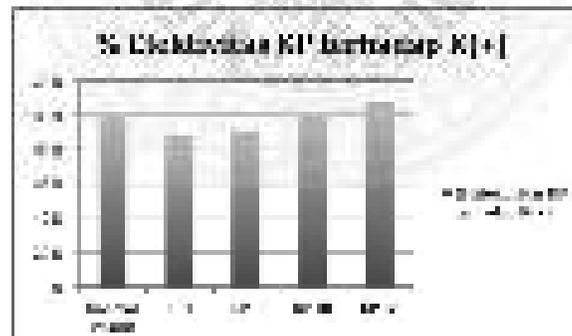
Dari hasil % Proteksi tersebut dapat dihitung % Efektivitas kelompok perlakuan terhadap kontrol positif ibuprofen, yaitu dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Efektivitas} = \frac{\% \text{ Proteksi Kelompok Uji} \times 100\%}{\% \text{ Proteksi Kontrol Positif}}$$

Hasil % Efektivitas dari masing-masing kelompok perlakuan tertera pada Tabel V.4. Dan grafik perbandingan % Efektivitas antar kelompok perlakuan terhadap kontrol positif ibuprofen tertera pada Gambar 5.4.

Tabel V.4. Hasil % Efektivitas masing-masing kelompok perlakuan

Kelompok	% Efektivitas
Kontrol Positif	100%
Kelompok Perlakuan I	81,97%
Kelompok Perlakuan II	91,80%
Kelompok Perlakuan III	100%
Kelompok Perlakuan IV	108,23%



Gambar 5.5 Grafik perbandingan % Efektivitas antar kelompok perlakuan terhadap K(+). Ket: K(-)= kontrol negatif, K(+)= kontrol positif, KP I= kelompok perlakuan I, KP II= kelompok perlakuan II, KP III= kelompok perlakuan III, KP IV= kelompok perlakuan IV

5.4. Analisis Statistika

Data jumlah geliat dari setiap mencit dalam setiap kelompok perlakuan yang sudah didapat, kemudian di analisis secara statistika. Analisis statistik yang digunakan yaitu analisis secara deskriptif dan menggunakan *One Way Anova* yang kemudian dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* metode LSD. Berikut adalah table hasil analisis statistic untuk mengetahui kelompok yang berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif :

Tabel V.5. Hasil uji *One Way ANOVA*

Jumlah Geliat	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Kuadrat Rata-rata	F	Sig.
Antar Kelompok	18482,917	5	3696,583	41,506	0,000
Dalam Kelompok	2671,833	30	89,061		
Total	21154,750	35			

Hasil *One Way ANOVA* tersebut memberikan nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($p < 0,05$) yaitu sebesar 0,000. Artinya dari semua kelompok uji terdapat minimal satu pasang kelompok yang mempunyai perbedaan bermakna. Kemudian untuk mengetahui adanya kelompok yang berbeda, dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* metode LSD.

Tabel V.6. Tabel perbedaan rata-rata jumlah geliat pada mencit antar kelompok dari hasil uji statistic *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* metode LSD ($p < 0,05$).

	Kontrol (-)	Kontrol (+)	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3	Dosis 4
Kontrol (-)		0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
Kontrol (+)	0,000*		0,198	0,450	0,903	0,231
Dosis 1	0,000*	0,198		0,586	0,161	0,017*
Dosis 2	0,000*	0,450	0,586		0,382	0,056
Dosis 3	0,000*	0,903	0,161	0,382		0,280
Dosis 4	0,000*	0,231	0,017*	0,056	0,280	

BAB VI PEMBAHASAN

Daun *M. crenata* diduga memiliki aktivitas sebagai analgesik ditinjau dari latar belakang yang telah dipaparkan sebelumnya. Pada penelitian ini dilaksanakan uji aktivitas analgesik ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* menggunakan metode geliat pada hewan uji mencit. Ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* pada penelitian ini didapatkan dari proses ekstraksi bertingkat. Ekstraksi bertingkat dilakukan dengan maserasi menggunakan tiga pelarut yang berbeda kepolarannya, yaitu, n-heksana sebagai pelarut non polar, etil asetat sebagai pelarut semi polar dan etanol 80% sebagai pelarut polar.

Alasan pemilihan etanol 80% sebagai pelarut yaitu karena sebelumnya, telah dilakukan uji pendahuluan untuk menentukan konsentrasi etanol yang akan digunakan untuk ekstraksi, uji pendahuluan dilakukan dengan analisis kandungan flavonoid pada ekstrak dengan metode KLT. Uji pendahuluan dilakukan pada 3 ekstrak dengan 3 konsentrasi etanol yang berbeda, yaitu 96%; 80%; dan 70%, ketiga ekstrak tersebut, juga didapatkan dari proses ekstraksi bertingkat. Identifikasi flavonoid pada KLT yang dilakukan menggunakan penampak noda asam sitrat borat dan uap ammonia. Hasil uji tersebut, dapat dilihat bahwa pada profil KLT etanol 96%, terdapat noda kuning yang kurang terlihat jelas pada kedua plat yang diberi penampak noda asam sitrat borat maupun uap ammonia, sedangkan pada profil KLT etanol 70% tidak terdapat noda kuning yang menandakan tidak ada kandungan flavonoid yang terekstrak

pada ekstrak etanol 70% tersebut. Dan pada profil KLT ekstrak etanol 80%, didapatkan hasil bahwa, terdapat noda kuning yang lebih intensif jika dibandingkan dengan noda kuning yang terdapat pada profil KLT ekstrak etanol 96%. Dari hasil tersebut, maka dipilih etanol 80% sebagai pelarut yang digunakan pada penelitian ini.

Ekstrak etanol 80% yang didapat dari proses ekstraksi bertingkat pada penelitian ini yaitu sebesar 46,04 g. Perbandingan antara bobot ekstrak yang dihasilkan dengan bobot simplisia awal yang diekstrak disebut rendemen ekstrak. Rendemen ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* yang didapat dari ekstraksi bertingkat tersebut yaitu sebesar 18%. Rendemen ekstrak menunjukkan banyaknya senyawa yang larut dalam pelarut tersebut sesuai dengan polaritasnya. Senyawa yang dimungkinkan akan larut dalam ekstrak etanol 80% ini, adalah senyawa yang bersifat polar. Senyawa yang bersifat non polar sebelumnya akan banyak larut dalam pelarut n-heksana yang juga bersifat non polar, kemudian pelarut semi polar etil asetat akan menarik senyawa yang bersifat semi polar, maka pada ekstraksi terakhir dengan etanol 80%, akan lebih banyak menarik senyawa yang lebih polar.

Ekstrak etanol 80% tersebut kemudian selanjutnya diuji aktivitasnya sebagai analgesik. Uji aktivitas analgesik pada penelitian ini menggunakan metode geliat. Efek analgesik dapat dilihat dari kemampuan bahan uji menurunkan jumlah geliat pada hewan uji yang telah diinduksi nyeri. Geliat pada hewan uji merupakan suatu respon dari terjadinya nyeri pada hewan uji. Hewan uji yang digunakan yaitu adalah mencit jantan dengan galur

tertentu. Mencit jantan digunakan dengan alasan kondisi biologisnya stabil bila dibandingkan dengan mencit betina yang kondisi biologisnya dipengaruhi siklus hormonal. Disamping keseragaman jenis kelamin, hewan uji digunakan juga mempunyai keseragaman berat badan (20-30 g), umur (2-3 bulan), dan galur. Hal ini bertujuan untuk memperkecil variabilitas biologis antar hewan uji yang digunakan, sehingga dapat memberikan respon yang relatif lebih seragam terhadap rangsang kimia yang digunakan dalam penelitian ini. Pengelompokan hewan uji dilakukan secara acak, yaitu setiap anggota dari masing-masing kelompok perlakuan memiliki kesempatan yang sama untuk dijadikan sampel. Mencit yang digunakan dalam penelitian ini merupakan mencit galur BALB/c sebanyak 36 ekor, yang terbagi ke dalam 6 kelompok, yaitu 2 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan.

Alasan penentuan waktu pemberian induksi nyeri pada mencit yaitu, dikarenakan ibuprofen sebagai kontrol positif dalam penelitian ini, memiliki *onset of action* sebesar 30 menit, yang artinya bahwa ibuprofen akan mulai memberikan efek sebagai analgesik setelah 30 menit pemberian oral. Waktu 30 menit tersebut juga sudah merupakan hasil optimasi yang telah dilaksanakan sebelumnya. Induksi nyeri yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam asetat. Asam asetat yang diinduksi secara intraperitoneal akan menimbulkan rasa nyeri pada bagian perut mencit. Nyeri tersebut disebabkan oleh karena sifat asam dari asam asetat yang akan menimbulkan iritasi atau inflamasi lokal yaitu pelepasan asam arakidonat dari jaringan fosfolipid melalui jalur

siklooksigenase dan menghasilkan prostaglandin di dalam cairan peritoneal mencit. Prostaglandin tersebut yang selanjutnya menyebabkan rasa nyeri dan meningkatkan permeabilitas kapiler. Ibuprofen sebagai kontrol positif akan bekerja sebagai analgesik dengan menghambat pada jalur siklooksigenase, sehingga menghambat terbentuknya prostaglandin. Terhambatnya pengeluaran prostaglandin akan mengurangi respon nyeri maka geliatan pada mencit juga akan berkurang (Vogel, 2002; Marlyne, 2012).

Induksi nyeri dari asam asetat akan menimbulkan geliat pada mencit, yang kemudian jumlah geliatnya dihitung dan kemudian dilihat rata-rata nya dari setiap kelompok uji dan dihitung persentase proteksi sebagai analgesik dan persentase efektivitas ekstrak terhadap kontrol positif ibuprofen. Suatu bahan uji dapat dikatakan memiliki efek analgesik jika terjadi penurunan jumlah geliat pada kelompok uji jika dibandingkan dengan jumlah geliatan pada kelompok kontrol negatif.

Hasil perhitungan jumlah geliat rata-rata mencit menunjukkan bahwa terdapat penurunan jumlah geliat rata-rata mencit pada kelompok kontrol positif maupun pada kelompok dosis ekstrak bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak dan kontrol positif dapat mengurangi terjadinya geliat pada mencit. Semakin sedikit jumlah geliat rata-rata yang diberikan oleh kelompok mencit menunjukkan semakin baik efek analgesik pada suatu bahan uji. Dari hasil perhitungan, dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol 80% daun *M.*

crenata pada ke 4 dosis tersebut memiliki aktivitas sebagai analgesik.

Jumlah geliatan tersebut selanjutnya digunakan untuk menghitung persentase proteksi bahan uji, yaitu kemampuan bahan uji dalam mengurangi respon geliat mencit yang disebabkan induksi asam asetat, persentase ini menggambarkan kemampuan bahan uji dalam menurunkan geliatan pada mencit. Persentase proteksi dihitung dengan membandingkan jumlah geliatan kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa, semakin meningkatnya dosis ekstrak yang diuji dalam penelitian ini, maka semakin besar potensinya dalam menurunkan jumlah geliatan mencit dan semakin besar pula persentase proteksinya. Dari persentase proteksi ini dapat dilihat, dosis yang dapat efektif sebagai analgesik yaitu, dosis pada kelompok perlakuan yang memberikan hasil persentase proteksi lebih dari sama dengan 70%. Jika dilihat dari persentase proteksi setiap kelompok, maka dapat dikatakan dosis yang efektif sebagai analgesik yaitu dosis KP II, KP III dan KP IV (Vogel, 2002).

Persentase proteksi tersebut kemudian dihitung persentase efektivitas bahan uji terhadap kontrol positif ibuprofen. Efektivitas menunjukkan efektivitas bahan uji sebagai analgesik bila dibandingkan dengan kontrol positif ibuprofen pada penelitian ini. Persentase efektivitas dapat dilihat dari perbandingan persentase proteksi kelompok dosis uji terhadap persentase proteksi dari kontrol positif ibuprofen. Hasil perhitungan pun menunjukkan bahwa kelompok perlakuan III dapat memberikan efektivitas sebagai

analgesik yang setara terhadap kontrol positif ibuprofen, dan kelompok perlakuan IV dapat memberikan efektivitas sebagai analgesik yang lebih besar terhadap kontrol positif ibuprofen pada penelitian ini.

Hasil geliat dari setiap kelompok mencit kemudian dilakukan analisis secara statistika untuk melihat adanya perbedaan hasil antar kelompok. Analisis statistika dilakukan dengan *anova one way* dan uji lanjut LSD. Hasil statistik menunjukkan bahwa kelompok perlakuan kontrol positif dan ke empat kelompok perlakuan, menunjukkan efek analgesik yang berbeda bermakna ($p < 0,05$) terhadap kelompok negatif, sehingga dapat dikatakan bahwa ke 4 kelompok perlakuan memiliki efek analgesik.

Dari hasil perhitungan tersebut menunjukkan bahwa, dalam penelitian ini, KP III (6,75 mg/20 g BB mencit) memiliki potensi dan efektivitas sebagai analgesik yang setara terhadap kontrol positif ibuprofen, sedangkan KP IV (9 mg/20 g BB mencit) merupakan dosis yang dapat memberikan potensi paling besar sebagai analgesik dan melebihi potensi dari kontrol positif ibuprofen pada penelitian ini. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut setelah ini untuk mengetahui berapa dosis optimal maksimum sebagai analgesik dari ekstrak etanol 80% daun *M. crenata*. Efek analgesik yang ditimbulkan oleh ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* tersebut, dapat menjawab teori pada latar belakang, yaitu bahwa pada penelitian sebelumnya didapatkan hasil, adanya efek nyaman hilangnya rasa pegal setelah mengkonsumsi ekstrak etanol daun *M. crenata* pada wanita pascamenopause, hal tersebut mungkin dikarenakan adanya

efek analgesik dari daun *M. crenata*. Nyeri yang dirasakan oleh wanita pascamenopause tersebut berasal dari terjadinya penurunan fungsi ovarium yang mengakibatkan hilangnya estrogen, kadar estrogen yang menurun akan berdampak pada meningkatnya sekresi berbagai sitokin seperti *Interleukin-1* (IL-1), *Interleukin-6* (IL-6) dan *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α). Ketika terjadi peningkatan kadar sitokin proinflamasi tersebut dalam tubuh, maka sitokin tersebut akan merangsang terjadinya nyeri. Sitokin IL-1, IL-6 dan TNF- α akan berpengaruh pada neuron sensoris, dan secara langsung dapat merangsang nosiseptor dan secara tidak langsung akan merangsang terbentuknya prostaglandin, menginduksi terjadinya sensitisasi perifer, dan terjadilah respon nyeri. Efek analgesik dari ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* kemungkinan akan dapat mengurangi jumlah dari sitokin-sitokin tersebut dan menghambat sensitisasi nyeri yang kemudian menghambat terbentuknya prostaglandin, sehingga respon nyeri yang dirasakan oleh wanita pascamenopause tersebut akan berkurang (Ganong, 2002; Laswati, 2009; Silalahi, 2012).

Adanya efek analgesik dari ekstrak etanol 80% daun *M. crenata*, dapat juga dikaitkan dengan kandungan senyawa yang terkandung didalamnya. Penelitian ini juga melakukan identifikasi terhadap golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol 80% daun *M. crenata*. Identifikasi yang dilakukan yaitu identifikasi terhadap golongan terpenoid, dan flavonoid. Alasan dilakukan identifikasi terhadap terpenoid dan flavonoid, karena dalam penelitian sebelumnya telah dilakukan skrining fitokimia dari daun

M. crenata dan didapatkan hasil bahwa daun *M. crenata* mengandung terpenoid dan flavonoid (Laswati, 2009). Hasil dari identifikasi pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* tidak mengandung senyawa golongan terpenoid, hal ini mungkin disebabkan kandungan terpenoid yang terkandung dalam daun *M. crenata* sudah tertarik dalam pelarut-pelarut sebelumnya yang sifat kepolarannya mendekati sifat kepolaran terpenoid, yaitu pelarut non-polar n-heksana dan pelarut semi-polar etil asetat, sehingga saat pada proses ekstraksi terakhir dengan etanol 80% yang sifatnya lebih polar dibanding pelarut lain, tidak ada lagi terpenoid yang dapat diekstraksi.

Hasil identifikasi terhadap flavonoid menunjukkan bahwa, ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* mengandung senyawa golongan flavonoid. Dilihat dari timbulnya warna kuning pada plat KLT setelah disemprot dengan penampak noda asam sitrat borat dan timbulnya warna kuning ketika pada plat KLT lain diberikan uap amonia. Alasan flavonoid dapat larut dalam ekstrak etanol 80% ini dikarenakan sifat kepolaran dari flavonoid. Flavonoid memiliki sejumlah gugus hidroksil, dan ada pula flavonoid yang terikat dengan suatu gugus gula dalam strukturnya, maka flavonoid yang polar tersebut akan cukup larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, air dan lain lain. Flavonoid merupakan salah satu golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman. Salah satu fungsi dari flavonoid itu sendiri adalah sebagai analgesik. Salah satu contoh flavonoid yang memiliki aktivitas sebagai analgesik, yaitu quercetin. Terdapat kemungkinan daun *M. crenata* mengandung quercetin

melalui pendekatan kemotaksonomi, karena pada penelitian lain ditemukan adanya kandungan quercetin pada daun *M. quadrifolia* dan *M. minuta* yang masih satu genus dengan *M. crenata*. Mekanisme quercetin bekerja sebagai analgesik, yaitu dengan menghambat kerja enzim siklooksigenase, yang akan mengurangi produksi prostaglandin oleh asam arakidonat dan mengurangi rasa nyeri. Selain itu, quercetin juga dapat menghambat degranulasi neutrofil sehingga akan menghambat pengeluaran sitokin, radikal bebas, serta enzim yang berperan dalam peradangan. Mekanisme tersebut sesuai dengan jalur mekanisme nyeri yang ditimbulkan oleh induksi nyeri dalam penelitian ini, yaitu asam asetat. Maka terdapat kemungkinan bahwa efek analgesik yang ditimbulkan dari ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* didapatkan dari mekanisme kerja senyawa flavonoid sebagai analgesik yang mungkin terkandung didalam ekstrak tersebut. Lebih lanjut, perlu dilakukan penelitian lebih spesifik untuk mengetahui senyawa yang berperan dalam aktivitas daun *M. crenata* sebagai analgesik dan juga senyawa flavonoid yang terkandung didalam daun *M. crenata* (Yasuda *et al.*, 2005; Patel, 2008; Sulistyawati, 2016).

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* dengan dosis 2,25; 4,5; 6,7; dan 7,2 mg/20 g BB mencit dapat menimbulkan aktivitas analgesik melalui uji dengan metode geliat.

7.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian toksisitas akut dan kronis untuk menunjang tingkat keamanan penggunaan daun *M. crenata* sebagai sediaan herbal. Perlu juga dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kandungan senyawa dalam ekstrak etanol 80% daun *M. crenata* yang berperan dalam menimbulkan efek sebagai analgesik.