

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen laboratorium dengan rancangan *posttest only control group design*. Rancangan ini merupakan desain penelitian eksperimental di mana subjek dibagi ke dalam kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, kemudian hanya dilakukan pengukuran setelah pemberian perlakuan tanpa adanya pengukuran awal (*pretest*). Desain ini bertujuan untuk mengevaluasi efek suatu perlakuan secara objektif dengan membandingkan hasil akhir antar kelompok (Sugiyono, 2019).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biofarmasetika dan Laboratorium Kimia Terpadu Stikes Panti Waluya Malang.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan April sampai dengan Juni 2026

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tanaman sereh merah (*Cymbopogon nardus*), khususnya bagian batang, yang digunakan sebagai bahan baku pembuatan ekstrak etanol 70%. Diperoleh dari daerah Desa Sitarjo, Kabupaten Malang khususnya di daerah Sumbergayam RT:60, RW:12 dan dilakukan identifikasi tanaman di UPT Materia Medica Batu (MMB) untuk memastikan kebenaran spesies.

3.3.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% batang sereh merah (*Cymbopogon nardus*).

3.4 Ethical Clearance

Persetujuan etik untuk penelitian ini diperoleh dari Komite Etik Institusi Universitas Surabaya melalui surat Nomor 840/KE/IV/2026.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *stopwatch* atau timer digital, batang pengaduk, jarum sonde, toples untuk maserasi, gelas ukur, Erlenmeyer, timbangan atau neraca analitik, mortir dan stamper, *waterbath*, *hot plate*, oven, dan gelas ukur.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain ekstrak batang sereh merah, aquadest, mencit jantan, CMC-Na, etanol 70%, kertas saring, ibuprofen, dan kertas *tissue*.

3.6 Identifikasi Variabel

3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% batang sereh merah (*Cymbopogon nardus*).

3.6.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas analgesik, yang dinilai berdasarkan peningkatan waktu latensi respon nyeri mencit jantan terhadap rangsangan panas setelah pemberian ekstrak etanol 70% batang sereh merah, yang diukur menggunakan metode *hot plate* dalam satuan detik.

3.7 Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

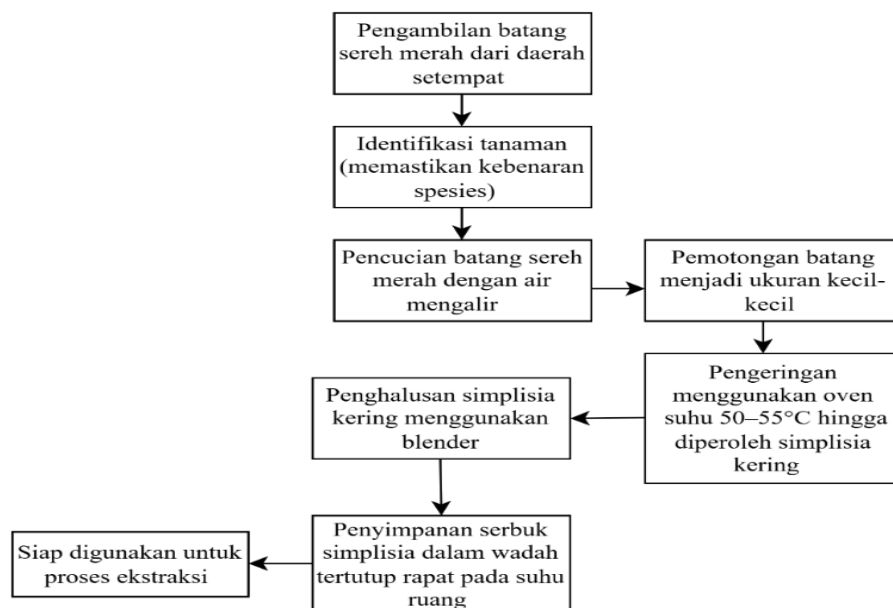
No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala	Parameter
1.	Batang sereh merah (<i>Cymbopogon nardus</i>)	Bagian batang tanaman sereh merah yang telah cukup umur panen, memiliki warna kemerahan pada pelepah batang, serta diambil dari bagian pangkal batang sekitar 5–10 cm dari permukaan akar, tidak rusak secara fisik, tidak kering, dan tidak berjamur.	Observasi morfologi tanaman dan identifikasi botani.	Nominal	Kriteria inklusi dan eksklusi
2.	Ekstrak etanol 70% batang sereh merah (<i>Cymbopogon nardus</i>)	Sediaan ekstrak kental hasil maserasi batang sereh merah dengan etanol 70%, diberikan per oral pada mencit sesuai dengan dosis.	Timbangan analitik, sonde oral	Ordinal	1.Dosis ekstrak 200 mg/kg BB 2.Dosis ekstrak 400 mg/kg BB 3.Dosis ekstrak 800 mg/kg BB
3.	Kontrol pengujian aktivitas analgesik	Kelompok mencit yang diberikan suspensi CMC-Na tanpa kandungan senyawa aktif analgesik sebagai kontrol negatif dan kelompok mencit yang diberikan obat standar analgesik ibuprofen secara	Timbangan analitik, sonde oral	Ordinal	1.Kontrol positif 2.Kontrol negatif

		per oral sebagai kontrol positif.			
4.	Hewan Uji	Hewan coba berumur 2-3 bulan, dengan berat badan 20-30 gram, sehat, tidak cacat.	Pemeriksaan visual, timbangan analitik	Nominal dan rasio	Kriteria inklusi dan eksklusi.
5.	Aktivitas analgesik	Efek penurunan nyeri yang ditunjukkan oleh peningkatan waktu latensi respon mencit berupa menjilat kaki atau melompat setelah diberikan rangsangan panas	<i>Hot plate, stopwatch</i>	Rasio	Waktu latensi respon nyeri (detik)
6.	Metode <i>Hot plate</i>	Metode pengujian analgesik dengan memberikan rangsangan panas pada permukaan plat yang bersuhu $55^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ terhadap telapak kaki mencit.	<i>Hot plate</i>	Rasio	Waktu latensi respon nyeri (detik)

3.8 Prosedur Kerja

3.8.1 Pengambilan dan Penyiapan Simplisia

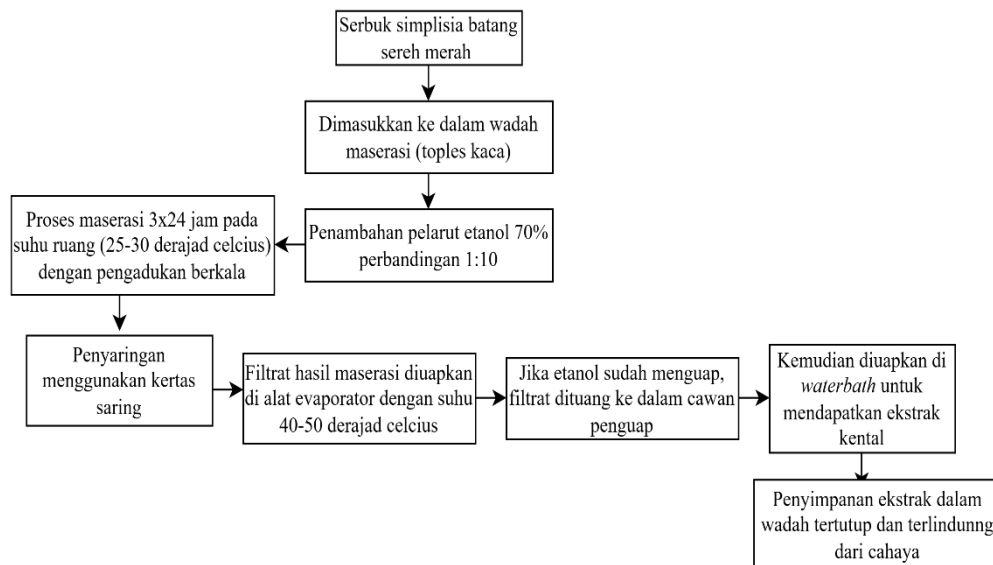
Batang sereh merah (*Cymbopogon nardus*) diperoleh dari Desa Sitiarjo, Kabupaten Malang, dan diidentifikasi di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu untuk memastikan kebenaran spesies. Batang kemudian dicuci, dipotong kecil-kecil, dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50–55°C hingga diperoleh simplisia kering. Pengeringan bertujuan menurunkan kadar air, menghambat aktivitas enzim dan pertumbuhan mikroorganisme, serta menjaga mutu simplisia. Suhu 50–55°C digunakan untuk mempercepat pengeringan dan meminimalkan perubahan senyawa bioaktif. Simplisia kering kemudian dihaluskan, diayak untuk memperoleh ukuran partikel yang seragam, dan disimpan dalam wadah tertutup hingga digunakan untuk proses ekstraksi. Pengambilan dan penyiapan simplisia dapat dilihat pada Gambar 3.1 berikut.



Gambar 3. 1 Pengambilan dan Penyiapan Simplisia

3.8.2 Pembuatan Ekstrak

Serbuk simplisia batang sereh merah dimasukkan ke dalam wadah maserasi dan direndam menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan bahan dan pelarut yang sesuai. Proses maserasi dilakukan selama 3×24 jam pada suhu ruang dengan pengadukan secara berkala. Setelah proses maserasi selesai, campuran disaring menggunakan kertas saring untuk memperoleh filtrat. Ekstrak hasil penyaringan kemudian diuapkan menggunakan *waterbath* pada suhu sekitar 50–55°C hingga pelarut menguap dan diperoleh ekstrak kental. Penggunaan suhu yang relatif rendah bertujuan untuk menjaga stabilitas senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak tanaman agar tidak mengalami kerusakan akibat pemanasan yang berlebihan (Pamungkas *et al.*, 2023). Proses pembuatan ekstrak batang sereh merah dapat dilihat pada gambar 3.2 berikut.



Gambar 3. 2 Pembuatan Ekstrak

3.8.3 Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji berupa mencit jantan (*Mus musculus*) diaklimatisasi selama ± 7 hari sebelum dilakukan perlakuan untuk menyesuaikan kondisi lingkungan laboratorium seperti suhu, kelembaban. Proses aklimatisasi bertujuan untuk meminimalkan stres pada hewan uji sehingga hasil penelitian lebih stabil dan dapat mengurangi bias pada pengamatan respon nyeri. Selama masa aklimatisasi mencit diberikan pakan standar dan air minum *ad libitum*. Sebelum pengujian aktivitas analgesik, mencit dipuasakan selama 6–8 jam dengan tetap diberikan air minum untuk mengosongkan lambung, meminimalkan interaksi antara pakan dan sediaan uji, serta menjaga kondisi fisiologis hewan uji tetap stabil (Azizah *et al.*, 2024). Disiapkan sebanyak 25 ekor mencit jantan *Mus musculus strain balb C*, yang berusia antara 2-3 bulan, memiliki berat badan antara 20-30 gram, sehat, dan tidak mengalami stres (beraktivitas normal), yang dibagi menjadi lima kelompok. Setiap mencit hanya diberikan 1 perlakuan sehingga jumlah mencit dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus *Federer* sebagai berikut:

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

$$(5 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$4(n - 1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan (termasuk kontrol)

n = jumlah hewan uji per kelompok

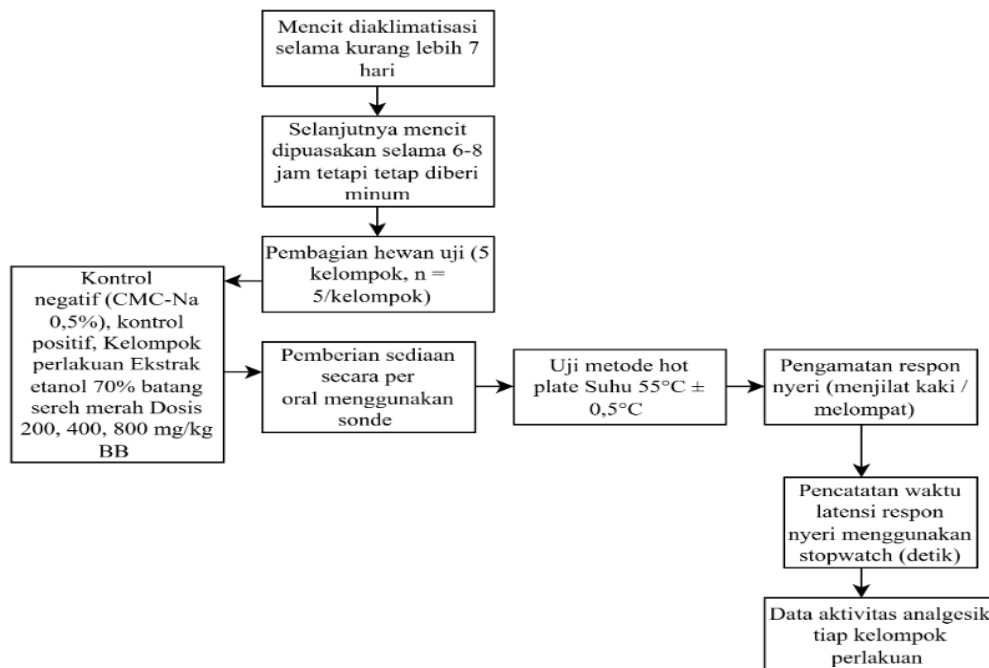
Jumlah hewan uji yang dibutuhkan dalam penelitian minimal pada setiap kelompok adalah 5 ekor dengan replikasi 3 kali, sehingga total hewan coba yang digunakan sebanyak 25 ekor mencit jantan.

3.8.4 Pengujian Aktivitas Analgesik

Mencit jantan diaklimatisasi selama ± 7 hari sebelum perlakuan dan dipuasakan selama 6–8 jam dengan tetap diberikan air minum *ad libitum*. Hewan uji dibagi menjadi lima kelompok, masing-masing terdiri dari lima ekor mencit, yaitu kelompok kontrol negatif (CMC-Na), kontrol positif (ibuprofen 400 mg/kg BB), serta tiga kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak etanol 70% batang sereh merah dengan dosis 200, 400, dan 800 mg/kg BB secara per oral sebanyak 0,2 ml menggunakan sonde. Setelah pemberian sediaan, mencit diuji menggunakan metode *hot plate* pada suhu $55^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Respon nyeri diamati berupa menjilat kaki belakang atau melompat, dan waktu latensi dicatat menggunakan *stopwatch* dalam satuan detik.

Obat standar seperti ibuprofen umumnya menunjukkan onset efek analgesik sekitar 30 menit setelah pemberian oral karena obat telah mencapai konsentrasi efektif dalam sirkulasi sistemik (Percie du Sert *et al.*, 2020). Setelah pemberian ibuprofen sebagai kontrol positif, CMC-Na sebagai kontrol negatif, dan ekstrak 70% batang sereh merah sebagai kelompok uji dengan pemberian secara oral, mencit diberikan waktu istirahat selama 30 menit sebelum dilakukan pengujian aktivitas analgesik. Waktu tunggu tersebut bertujuan untuk memberikan kesempatan bagi zat aktif dalam ekstrak untuk diserap melalui saluran pencernaan dan didistribusikan ke dalam sistem sirkulasi sehingga dapat menunjukkan efek farmakologisnya. Setelah waktu tersebut tercapai, mencit kemudian dilakukan pengujian nyeri menggunakan metode yang telah ditentukan untuk mengamati respon nyeri yang ditunjukkan oleh hewan uji (Percie du Sert *et al.*, 2020).

Pengamatan dilakukan untuk menilai aktivitas dari masing-masing kelompok perlakuan. Proses pengujian aktivitas analgesik dapat dilihat pada gambar 3.3 berikut.

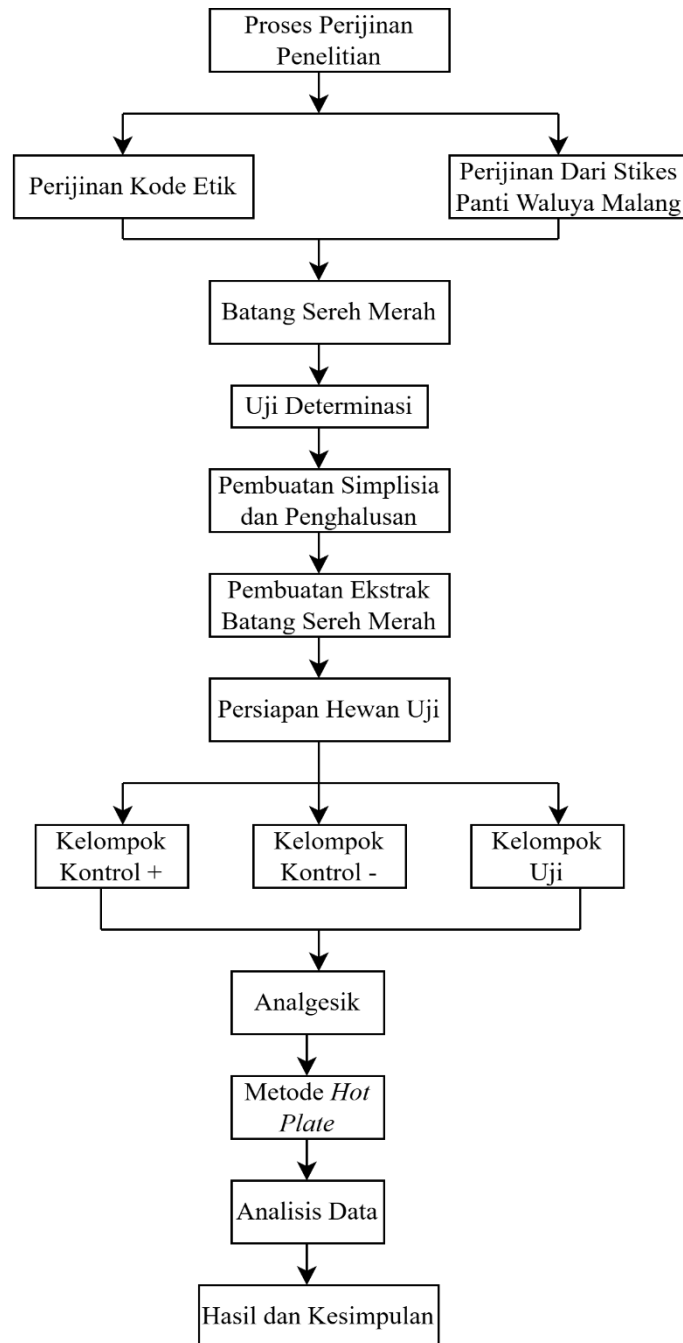


Gambar 3. 3 Pengujian Aktivitas Analgesik

3.9 Metode Analisis Data

Metode analisis data pada penelitian ini menggunakan pendekatan komparatif untuk mengevaluasi perbedaan aktivitas analgesik antara kelompok perlakuan ekstrak etanol 70% batang sereh merah (*Cymbopogon nardus*) dengan kelompok kontrol positif dan kontrol negatif. Sebelum dilakukan analisis, data terlebih dahulu diuji normalitas dan homogenitasnya sebagai syarat analisis parametrik. Apabila data berdistribusi normal dan homogen, analisis dilakukan menggunakan uji ANOVA satu arah (*one-way ANOVA*) untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Apabila hasil uji menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), analisis dilanjutkan dengan uji *post hoc* untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan bermakna. Apabila data tidak berdistribusi normal, digunakan uji *Kruskal–Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Mann–Whitney* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

3.10 Kerangka Kerja



Gambar 3. 4 Kerangka Kerja