

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kacang tujuh jurai (*Phaseolus lunatus* L) yang diambil dari Magetan, Jawa Timur Pada bulan Januari tahun 2019.

Sampel yang digunakan untuk penelitian ini adalah daun kacang tujuh jurai (*Phaseolus lunatus* L) dengan ciri-ciri berwarna hijau, tidak busuk, dan belum berubah warna.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Variabel utama pertama adalah ekstrak etanol 70% daun kacang tujuh jurai diekstraksi dengan metode remaserasi.

##### **2. Klasifikasi Variabel Utama**

**2.1 Variabel Bebas.** Variabel bebas adalah variabel utama yang sengaja diubah-ubah untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung berkaitan dengan perubahan. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak etanol 70% daun kacang tujuh jurai.

**2.2 Variabel Tergantung.** Variabel tergantung adalah suatu variabel yang variasinya dipengaruhi oleh variasi beberapa variabel lain. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol 70% daun kacang tujuh jurai.

**2.3 Variabel Kendali.** Variabel kendali adalah variabel yang dipengaruhi oleh variabel tergantung karena itu perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel kendali yang digunakan pada penelitian ini adalah kondisi sampel, waktu pengamatan, kondisi hewan uji, seperti jenis kelamin, usia, galur, serta kondisi peneliti.

### 3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun kacang tujuh jurai (*Phaseolus lunatus* L) segar, tidak busuk, berwarna hijau, yang diambil di Magetan, Jawa Timur.

Kedua, serbuk daun kacang tujuh jurai (*Phaseolus lunatus* L) dari daun yang segar tidak busuk, berwarna hijau, yang diambil di Magetan, Jawa Timur dicuci bersih dengan air mengalir, dirajang dan dikeringkan di dalam oven serta digiling dan diayak dengan pengayak nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai adalah serbuk kering yang diekstraksi menggunakan metode remaserasi menggunakan pelarut etanol 70%.

Kelima, remaserasi adalah suatu bagian serbuk kering simplisia ditambah 10 bagian pelarut, direndam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk dan didiamkan selama 18 jam. Maserat dipisahkan dengan cara pengendapan sentrifugasi dan filtrasi. Proses penyarian diulangi sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan pelarut yang sama.

Keenam, tikus putih jantan galur wistar adalah tikus putih jantan galur wistar yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan 150 – 200 gram dalam keadaan sehat.

Ketujuh, aktivitas antiinflamasi adalah daya antiinflamasi pada telapak kaki tikus yang dihasilkan akibat induksi karagenan diukur dengan *pletysmograph*.

### C. Alat, Bahan, dan Hewan Uji

#### 1. Alat

Mesin penyerbuk, ayakan no 40, neraca analitik, corong, botol untuk maserasi, kertas saring, *rotary evaporator*, breaker glass, gelas ukur, cawan porselin, mortir, stamfer, waterbath, alat Sterling-Bidwell, alat pengukur edema kaki tikus *pletysmograph*.

#### 2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan adalah daun kacang tujuh jurai (*Phaseolus lunatus* L). Bahan kimia yang digunakan antara lain karagenan, toluen untuk mengukur kadar air dalam serbuk, aquadest, etanol 70%, natrium diklofenak, dan CMC-Na.

### **3. Hewan Uji**

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih galur wistar dengan jenis kelamin jantan, umur 2-3 bulan dengan berat badan rata-rata 150-200 gram yang didapatkan dari pengelola Abimanyu Farm Surakarta.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi Tanaman**

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel yang akan digunakan penelitian yang berkaitan dengan ciri-ciri dan morfologi tumbuhan. Determinasi dilakukan di laboratorium Biologi Universitas Setia Budi Surakarta.

### **2. Pengumpulan Bahan**

Daun kacang tujuh jurai yang segar dan sudah di peroleh dari petani beralamat desa Gonggang RT 28 RW 03 Poncol Magetan, Jawa Timur. Ketinggian tanaman tumbuh 800 dc dari permukaan laut.

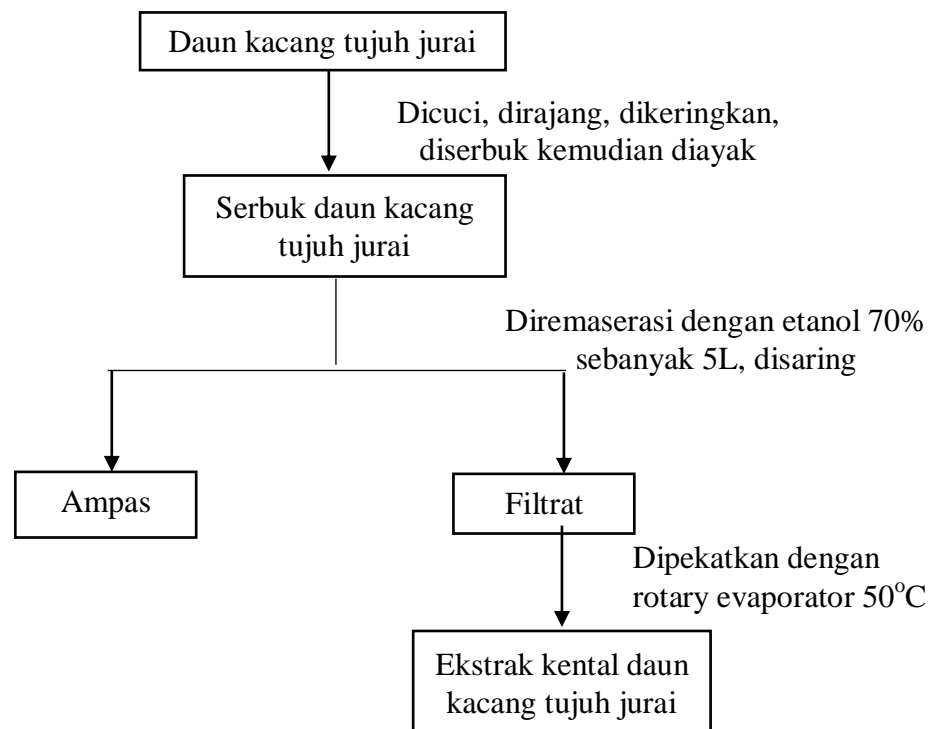
### **3. Pengeringan dan Pembuatan Serbuk Daun Kacang Tujuh Jurai**

Daun kacang tujuh jurai dikeringkan di atas loyang yang terbuat dari alumunium dan dikeringkan di dalam oven dengan suhu 40-50°C. Daun kacang tujuh jurai sudah kering dihaluskan dan diayak menggunakan ayakan nomor 40 sehingga diperoleh derajat kehalusan yang sesuai. Hasil serbuk disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat agar tidak terkena cemaran.

### **4. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kacang Tujuh Jurai**

Pembuatan ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai dibuat dengan menggunakan metode remaserasi. Dengan menimbang serbuk daun kacang tujuh jurai sebanyak  $\pm$  500 gram. Serbuk daun kacang tujuh jurai dimasukkan ke dalam botol maserasi dan ditambahkan etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Ekstraksi dilakukan pada botol kaca gelap yang kedap cahaya. Direndam selama 6 jam pertama sampai sekali kali dikocok atau diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam. Proses penyarian diulangi sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Hasil maserat dikumpulkan, kemudian diuapkan dengan menggunakan vakum atau mesin penguap tekanan rendah hingga

diperoleh ekstrak kental. Rendemen dihitung dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan (Depkes 2008), perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 5.



**Gambar 4. Cara pembuatan ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai.**

Selanjutnya dihitung persen rendemen dengan rumus berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang didapatkan}}{\text{Bobot serbuk simplisia yang diekstraksi}} \times 100\%$$

## 5. Penetapan Kadar Air Serbuk dan Ekstrak

Penetapan kadar air dilakukan dengan menggunakan alat Sterling-Bidwell, serbuk atau ekstrak daun kacang tujuh jurai ditimbang sebanyak 20 gram kemudian dimasukkan ke dalam labu alas bulat pada alat Sterling-Bidwell, kemudian dimasukkan  $\pm 100$  ml toluen jenuh air ke dalam labu, rangkaian alat dipasang. Toluene jenuh air dimasukkan ke dalam tabung penerima melalui pendingin hingga leher alat penampung. Labu dipanaskan selama 15 menit. Setelah toluene mendidih, atur penyulingan dengan kecepatan  $\pm 4$  tetes tiap detik, sampai sebagian air tersuling, lalu kecepatan penyulingan dinaikkan hingga 2 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci

dengan toluen jenuh air, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambung pada sebuah kawat yang telah dibasahi dengan toluen jenuh air. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima didinginkan pada suhu ruang. Jika ada tetes yang melekat maka tabung pendingin digosok menggunakan karet yang telah diikat pada kawat dan dibasahi dengan toluen jenuh air. Volume air dibaca setelah air dan toluene terpisah dengan sempurna (Depkes 2008). Perhitungan kadar air serbuk dan ekstrak dapat dilihat pada lampiran 6 dan lampiran 7.

Kadar air dihitung dalam % v/b dan kadarnya tidak lebih dari 10% (Depkes 1994).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume terbaca}}{\text{Bobot serbuk awal}} \times 100\%$$

## **6. Identifikasi Kandungan Kimia Serbuk dan Ekstrak Daun Kacang Tujuh Jurai**

**6.1 Uji Flavonoid.** Ekstrak 5 ml daun kacang tujuh jurai dilarutkan dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan tambahkan sebanyak 0,1 gram serbuk Mg dan 5 tetes HCl pekat, 2 ml amil alkohol, kemudian dikocok lalu biarkan sampai memisah. Jika terjadi perubahan warna merah atau jingga pada lapisan amil maka alkohol maka positif flavonoid (Ciulei 1984).

**6.2 Uji Saponin.** Sampel daun kacang tujuh jurai 0,05 mg dilarutkan dan dimasukkan ke dalam 20 ml air, kemudian dipanaskan dan disaring, dimasukkan 1 tetes HCl 2 N lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik kemudian dibiarkan selama 10 detik (Ciulei 1984).

**6.3 Uji Polifenol.** Ekstrak daun kacang tujuh jurai diambil 1ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl<sub>3</sub> 1%. Jika larutan menghasilkan warna hijau kebiruan atau biru tua, maka ekstrak tersebut mengandung polifenol (Halimah 2010).

## **7. Pembuatan Larutan dan Penetapan Dosis Terapeutik Antiinflamasi**

**7.1 Larutan CMC-Na 0,5%.** Ditimbang 500 mg CMC-Na lalu dimasukkan ke dalam cawan penguap tambahkan air suling secukupnya dan dipanaskan hingga mengembang. Kemudian dipindahkan kedalam mortir lalu

digerus sambil menambahkan air suling sedikit demi sedikit hingga 100 ml dan kemudian diaduk sampai homogen.

**7.2 Larutan Karagenan 0,8%.** Larutan karagenan ditimbang 40 mg, kemudian dilarutkan dengan larutan garam fisiologi (NaCl 0,9%) volume 5 ml, diaduk sampai homogen. Sebelum disuntikkan, karagenan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

**7.3 Suspensi Natrium Diklofenak 1%.** Natrium diklofenak ditimbang 100 mg, dimasukkan ke dalam mortir yang berisi larutan CMC-Na 10 ml diaduk sampai homogen.

**7.4 Pembuatan Sediaan Uji Ekstrak 3%.** Ekstrak daun kacang tujuh jurai ditimbang 3 gram, lalu dimasukkan ke dalam mortir setelah itu ditambahkan larutan CMC-Na 100 ml .

**7.5 Dosis Ekstrak Daun Kacang Tujuh Jurai.** Dosis sediaan uji diberikan berdasarkan orientasi dosis yang diambil dari dosis empiris yang telah dikonversikan ke dosis yang ditujukan pada tikus. Dosis tersebut divariasikan setengah dan dua kali lipatnya.

Secara empirik daun kacang tujuh jurai biasa digunakan sebanyak 7 helai daun, dari daun kacang tujuh jurai, atau 7 tangkai (Gugu D 2018; Altair 2018), maka dosis dihitung menggunakan rendemen dan konversi ke hewan uji tikus putih jantan sesuai berat badan. Perhitungan dosis ekstrak dapat dilihat pada lampiran 9.

**7.6 Dosis Natrium Diklofenak.** Rata-rata berat badan manusia 70 Kg dosis natrium diklofenak sebesar 50 mg/Kg BB, Faktor konversi dari manusia berat badan 70 Kg ke tikus dengan berat badan rata-rata 200 g adalah 0,018 maka dosis natrium diklofenak untuk tikus sebesar 4,5 mg/Kg BB tikus.

## **8. Prosedur Uji Efek Antiinflamasi Metode Induksi Karagenan**

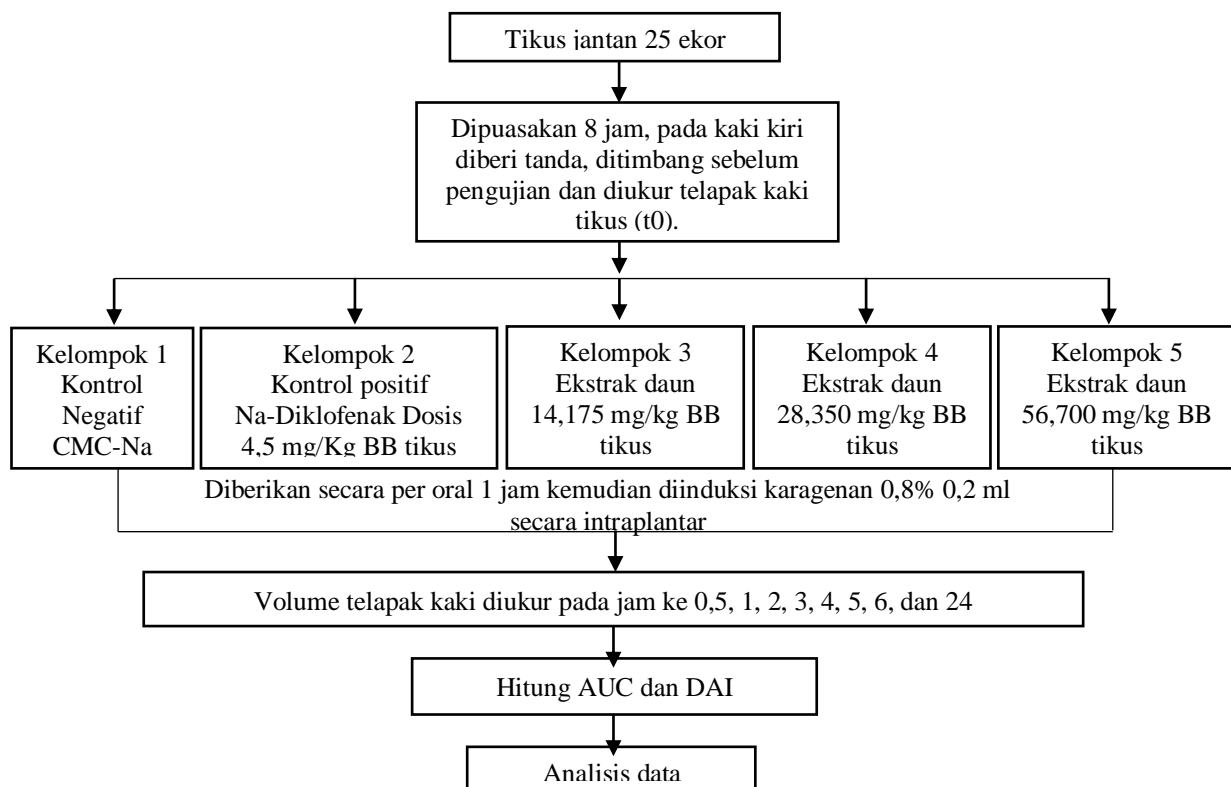
Pada penelitian ini tikus ditimbang dan dikelompokkan secara acak. Ada 25 ekor tikus yang dikelompokkan menjadi 5 kelompok. Prosedur ujinya yaitu tikus dipuaskan selama 8 jam sebelum pengujian, tetap diberi minum. Dari 5 kelompok tersebut masing-masing kaki tikus bagian kiri yang akan diinduksi diberi tanda sampai mata kaki. Kemudian diukur volumenya terlebih dahulu

dengan cara memasukkan kaki tikus ke dalam raksa hingga tanda. Setiap tikus diberi perlakuan sesuai kelompoknya.

**Tabel 1. Perlakuan uji antiinflamasi**

Kelompok	Perlakuan
I	Kontrol negatif (CMC-Na)
II	Kontrol positif (Na-diklofenak) dosis 4,5 mg/Kg BB tikus
III	Ekstrak daun kacang tujuh jurai 14,175 mg/kg BB tikus
IV	Ekstrak daun kacang tujuh jurai 28,350 mg/kg BB tikus
V	Ekstrak daun kacang tujuh jurai 56,700 mg/kg BB tikus

Satu jam kemudian diinduksi larutan karagenan 0,8% pada telapak kaki kiri belakang tikus dengan volume 0,2 ml. Selanjutnya telapak kaki tikus diukur pada jam ke 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 dan 24 setelah induksi karagenan, telapak kaki tikus dimasukkan ke dalam alat *pletysmograph* hingga tanda batas. Dihitung AUC (Area Under Curva) dan DAI (Daya Antiinflamasi). Semua data yang diperoleh dianalisis secara statistik terhadap volume telapak kaki tikus dan dihitung persentase penghambat edema (Patel *et al.* 2012). Alur pengujian antiinflamasi dapat dilihat pada gambar 5.



**Gambar 5. Skema uji metode induksi karagenan.**

### E. Analisis Data

Metode induksi karagenan dilakukan dengan menghitung volume edema pada pemberian ekstrak etanol 70 % daun kacang tujuh jurai terhadap aktivitas antiinflamasi.

$$V_u = V_t - V_o \dots \dots \dots (1)$$

$V_u$  : Volume edema kaki tikus tiap waktu t

$V_t$  : Volume edema kaki tikus setelah diinduksi dengan karagenan 0,8 % pada waktu (t)

$V_o$  : Volume edema kaki tikus sebelum diinduksi dengan karagenan 0,8 %

Setelah data volume edema didapat, selanjutnya dibuat kurva perbandingan volume edema versus waktu. Kemudian dihitung AUC (*area under the curve*) yaitu luas daerah rata-rata dibawah kurva yang merupakan hubungan volume edema rata-rata tiap satuan waktu.

$$AUC_{n-1}^n = \frac{V_{t_{n-1}} + V_{t_n}}{2} (t_n - t_{n-1}) \dots \dots \dots (2)$$

Keterangan :

$V_{t_{n-1}}$  : volume edema pada  $t_{n-1}$

$V_{t_n}$  : volume pada  $t_n$

Daya anti inflamasi dapat dihitung dengan rumus sabagai berikut :

$$DAI = \frac{AUC_k - AUC_p}{AUC_k} \times 100 \% \dots \dots \dots (3)$$

Keterangan :

$AUC_k$  : AUC kurva volume edema total terhadap waktu untuk kontrol negatif

$AUC_p$  : AUC kurva volume edema total terhadap waktu untuk kelompok perlakuan tiap individu

Data yang diperoleh dianalisis dengan uji *Kolmogorrov Smirnov* untuk melihat distribusi data dan dianalisis dengan *Shapiro Wilk* dan *Levene* untuk melihat homogenitas data. Jika data terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji analisis varian (ANOVA) satu arah dengan taraf



kepercayaan 95 % dan dilanjutkan uji LSD untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan bermakna. Apabila dari salah satu syarat untuk uji ANOVA tidak dipenuhi, maka dilakukan uji Kruskal-Wallis untuk melihat adanya perbedaan. Apabila ada perbedaan bermakna dilakukan uji Mann-Whitney untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.