

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah dari daun tanaman kemangi yang diperoleh dari desa Tuban, kecamatan Gondangrejo, kabupaten Karanganyar, provinsi Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman kemangi (*Ocimum basilicum* L.) yang diperoleh di desa Tuban, kecamatan Gondangrejo, kabupaten Karanganyar, provinsi Jawa Tengah pada bulan Januari 2019. Sampel yang diambil adalah daun yang sudah tua, saat warna daun berubah menjadi hijau tua, sehat dan tidak berpenyakit.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dan efek anti inflamasi yang ditunjukkan sebagai volume udem kaki tikus.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama memuat identitas dari semua variabel yang diteliti langsung. Variabel utama yang telah identifikasi terdahulu dapat diklasifikasikan

dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel kendali.

Variabel bebas adalah variabel utama yang direncanakan untuk diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak daun kemangi (*Ocimum basilicum L.*).

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek anti inflamasi yang ditunjukkan dengan persentase penurunan volume udem kaki tikus.

Variabel kendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang di dapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara cepat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kondisi fisik dari hewan uji yang meliputi berat badan, lingkungan, tempat hidup, jenis kelamin dan galur.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, tanaman kemangi (*Ocimum basilicum L.*) adalah tanaman yang diperoleh di desa Tuban, kecamatan Gondangrejo, kabupaten Karanganyar, provinsi Jawa Tengah

Kedua, ekstrak daun kemangi adalah sari daun yang didapat dari proses maserasi. Ekstrak adalah sediaan cair yang dibuat dengan menyari simplisia dengan etanol 70 % selama 3-5 hari.

Ketiga, inflamasi adalah suatu respon jaringan terhadap rangsangan fisik atau kimiawi sel dengan reaksi radang berupa panas, nyeri, merah dan bengkak.

Keempat, kontrol negatif adalah kelompok perlakuan yang diberikan larutan non obat sehingga hewan uji tidak memberikan respon antiinflamasi.

Kelima, kontrol positif adalah kelompok perlakuan dengan pemberian obat sintetis yang responnya akan dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang diberikan dosis ekstrak.

Keenam, dosis efektif adalah dosis yang memberikan nilai daya antiinflamasi yang paling tinggi jika dibandingkan dengan dosis ekstrak etanol daun kemangi yang digunakan dalam penelitian ini.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan untuk pembuatan simplisia adalah timbangan, mesin penggiling, oven, dan ayakan no 40. Peralatan untuk melakukan ekstraksi daun kemangi antara lain botol reagen, corong, kain flanel dan evaporator. Identifikasi senyawa dilakukan dengan peralatan berupa tabung reaksi.

Peralatan untuk uji efek anti inflamasi adalah batang pengaduk, spuit injeksi dengan jarum oral (ujung tumpul), beaker glass, gelas ukur, pletismometer, stop watch, timbangan untuk tikus dan timbangan analitik.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kemangi yang diambil dari daerah Karanganyar, Jawa Tengah. Bahan lain yang digunakan adalah etanol 70, natrium diklofenak, putih telur 5%, CMC Na, dan aquadest.

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan dengan berat badan antara 150-200 gram dan berumur 2-3 bulan. Hewan uji tersebut diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi tanaman untuk menetapkan kebenaran tanaman yang digunakan berkaitan dengan ciri-ciri morfologi pada tanaman kemangi. Determinasi tanaman kemangi dilakukan di Laboratorium UPT Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta.

2. Pengambilan tanaman

Daun kemangi diambil dari daerah Gondangrejo, Karanganyar, Jawa Tengah. Daun kemangi yang digunakan masih segar, bebas dari hama, dan bakteri patogen. Daun kemangi yang sudah diperoleh dibersihkan, dipisahkan dari batangnya dan dicuci terlebih dahulu kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C.

3. Pembuatan serbuk daun kemangi

Daun kemangi yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan mesin penyerbuk dan diayak dengan no mesh 40 sampai diperoleh serbuk dengan derajat kehalusan yang diinginkan. Pembuatan serbuk ini bertujuan untuk memperoleh penyarian yang efektif.

4. Penetapan kadar kelembaban serbuk daun kemangi

Penetapan kadar kelembaban pada serbuk daun kemangi dilakukan menggunakan alat *mouisture balance*. Serbuk daun kemangi sebanyak 2 gram diletakkan ditempat yang telah disediakan kemudian diukur kelembabannya dan ditunggu sampai alat menunjukkan hasil kadar dalam satuan persen dengan kadar yang ditentukan kurang dari 10%.

5. Pembuatan ekstrak etanol daun kemangi

Pembuatan ekstrak etanolik dilakukan dengan metode maserasi, serbuk daun kemangi diekstraksi menggunakan etanol 70%. Serbuk daun kemangi sebanyak 500 gram dimasukkan ke dalam botol maserasi, dilakukan perendaman selama 5 hari menggunakan etanol 70% sebanyak 3500 ml dengan penggojokan 3 kali sehari. Penyaringan dilakukan setelah perendaman 5 hari kemudian ampas yang tersisa direndam kembali menggunakan pelarut yang sama sebanyak 1500 ml selama 2 hari sebagai pembilasan. Hasil perendaman yang diperoleh kemudian di kumpulkan lalu diuapkan menggunakan evaporator dengan suhu 40⁰C.

6. Uji kandungan senyawa kimia ekstrak etanol daun kemangi

6.1. Identifikasi flavonoid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun kemangi ditambahkan 10 ml air panas kemudian diaduk pada tabung reaksi ditambahkan Mg 0,5 g tetes HCL pekat. Campuran dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif (+) jika timbul warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan atas.

6.2. Identifikasi tanin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun kemangi ditambahkan 10 ml air panas kemudiak diaduk lalu pada tabung reaksi ditambah 3-

4 tetes larutan FeCl_3 , kemudian diamati terjadinya perubahan warnanya, jika terjadi warna hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin.

6.3. Identifikasi saponin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun kemangi diambil ditambahkan 10 ml air panas kemudian ditambahkan HCl 2N sebanyak 2 tetes. Larutan digojok kemudian diamati jika terbentuk buih/busa konstan menunjukkan adanya senyawa saponin.

7. Pembuatan larutan uji dan pelarut

Sebanyak 1 gram Na-CMC dimasukkan ke dalam 50 ml aquadest panas sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga larut dan homogen kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, volumenya dicukupkan dengan aquadest hingga 100 mL. Sebanyak 5 gram putih telur ditambahkan aquades sebanyak 50 mL, dihomogenkan kemudian dicukupkan volumenya hingga 100 mL. Tablet natrium diklofenak dengan sediaan 50 mg digerus dalam mortir kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur, ditambahkan aquadest sambil diaduk sampai larut dan homogen kemudian volumenya dicukupkan hingga 100mL.

8. Pengujian antiinflamasi

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang sehat dengan bobot badan berkisar 150-200 gram. Jumlah tikus yang digunakan sebanyak 25 ekor yang dibagi dalam 5 kelompok setiap kelompok terdiri dari 5 ekor. Masing-masing kelompok terdiri : Kelompok kontrol negatif diberi CMC-Na 1%, kelompok kontrol positif diberi Natrium diklofenak 0,9 mg/g BB tikus, kelompok uji 1 diberi ekstrak etanol daun kemangi dengan dosis 500mg/kgBB tikus, kelompok uji 2 diberi ekstrak etanol daun kemangi dengan

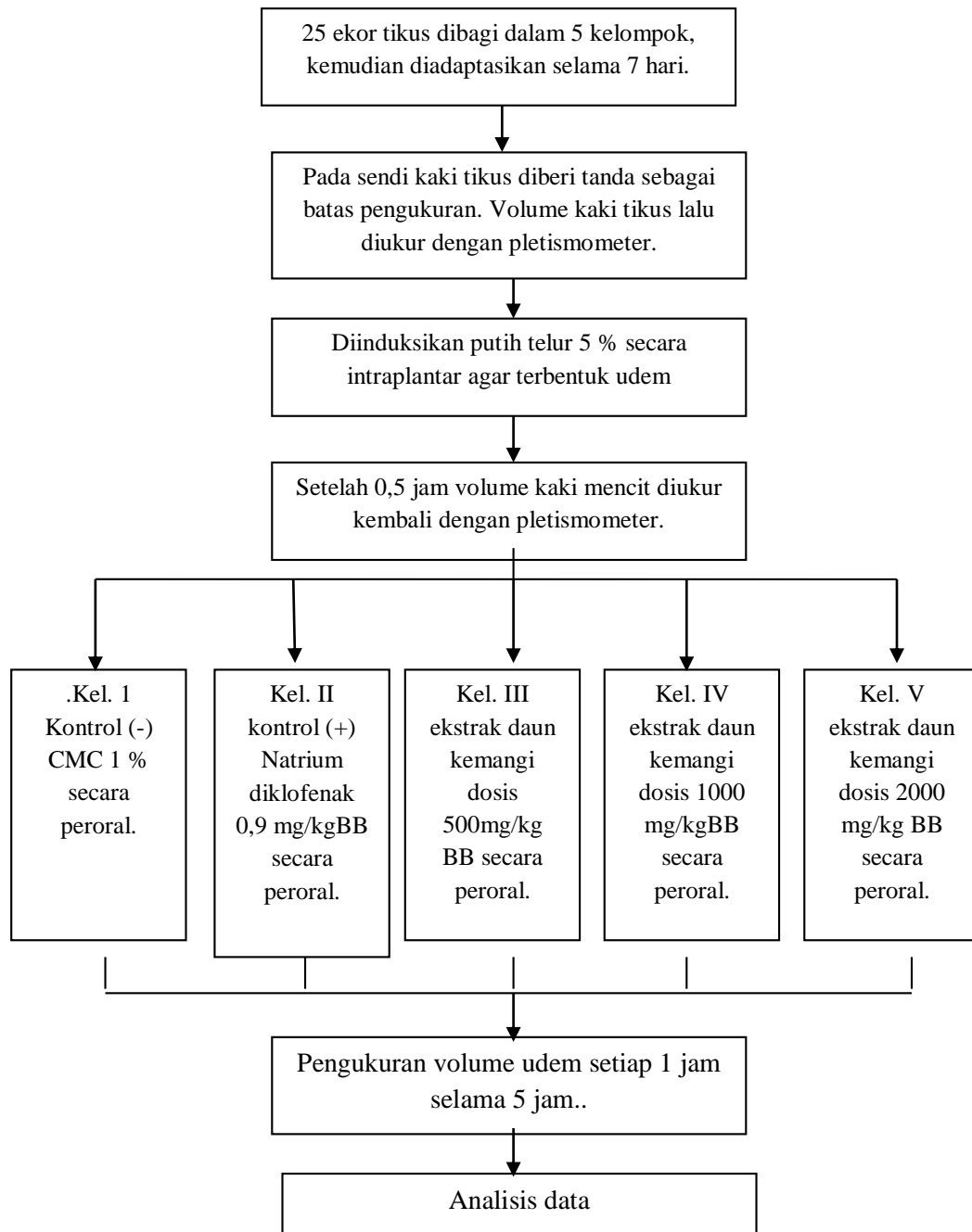
dosis 1000 mg/kgBB tikus, kelompok uji 3 diberi ekstrak etanol daun kemangi dengan dosis 2000 mg/kgBB tikus

Sebelum diberi perlakuan tikus dipuasakan selama 18 jam dengan air minum tetap diberikan kemudian ditimbang bobot badan awal lalu diberi tanda batas pada kaki tikus dan dilakukan pengukuran telapak kaki awal. Data yang diperoleh dari pengukuran volume kaki awal sebagai data T0.

Setelah diperoleh data T0, setiap kelompok perlakuan diinduksi putih telur 5% pada telapak kaki tikus secara subplantar. Pengukuran telapak kaki tikus tiap kelompok perlakuan dilakukan kembali setelah 30 menit induksi dan data yang diperoleh sebagai T1/2. Kemudian dilanjutkan pemberian kontrol negatif (CMC 1%), kontrol positif (natrium diklofenak), serta ekstrak etanol daun kemangi dosis 500mg/200gBB tikus, dosis 1000mg/200gBB tikus, dan 2000mg/200gBB tikus. Semua kelompok dibiarkan selama 1 jam untuk memberikan kesempatan obat terabsorpsi.

Pengukuran kaki tikus dilakukan kembali setelah satu jam pertama dan diperoleh data sebagai T1, masing-masing kelompok diukur volume udemnya tiap 1 jam selama 5 jam. Pengukuran selanjutnya dilakukan pada 1 jam kedua sampai 1 jam kelima dan diperoleh data sebagai T2, T3, T4 sampai T5.

Data yang sudah diperoleh dari masing-masing kelompok dihitung nilai Vu atau selisih volume udem, AUC atau kurva volume udem dengan waktu dan dihitung persen daya antiinflamasi kemudian dilakukan analisis menggunakan SPSS.



Gambar 5. Skema uji antiinflamasi

E. METODE ANALISIS

Data yang diperoleh berupa volume udem rata-rata waktu tertentu. Volume udem seslilih antar volume kaki tikus sebelum peradangan dan sesudah terjadinya peradangan.

$$Vu = Vt - Vo$$

Keterangan :

Vu : volume udem rata-rata pada waktu (t)

Vo : volume awal sebelum peradangan

Vt : volume sesudah peradangan pada waktu (t)

Volume udem rata-rata yang diperoleh dapat digunakan untuk menghitung nilai AUC (Area Under Curve) persentase kenaikan volume udem . AUC adalah luas daerah rata-rata dibawah kurva yang merupakan hubungan volume udem rata-rata tiap satuan waktu.

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

Keterangan :

$V_{t_{n-1}}$: rata-rata volume udem pada t_{n-1}

V_{t_n} : rata-rata volume udem pda t_n

Persentase penghambatan volume udem dihitung berdasarkan persen penurunan udem menggunakan rumus :

$$\%DAI = \frac{AUC_k - AUC_p}{AUC_k} \times 100\%$$

Keterangan :

AUC_k : AUC kurva volume udem rata-rata terhadap waktu untuk kontrol negatif

AUC_p : AUC kurva volume udem rata-rata terhadap waktu untuk kelompok perlakuan pada tiap individu.

Data hasil pengukuran kaki tikus dianalisis secara statistik dengan uji *Kolmogorof Smirnov* untuk mengetahui apakah data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak, jika data terdistribusi normal ($P < 0,05$) maka dilanjutkan dengan menggunakan metode *Oneway ANOVA (test of homogeneity of variance)*, apabila $P < 0,05$ maka varietas tidak sama, sedangkan $P > 0,05$ maka varietas sama, dan jika data menunjukkan ada perbedaan maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Test*.