

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah daun duwet (*Syzygium cumini* (L.)) yang diambil dari daerah Pitu Kabupaten Ngawi, Jawa Timur.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun duwet (*Syzygium cumini* (L.)) secara acak yang masih berwarna hijau dan tidak rusak yang diambil dari daerah Pitu, Kabupaten Ngawi, Jawa Timur pada bulan November 2018.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini adalah dosis dari ekstrak etanol daun duwet (*Syzygium cumini* (L.)).

Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah efek antiinflamasi dari ekstrak etanol daun duwet (*Syzygium cumini* (L.)) terhadap tikus putih jantan galur wistar pada berbagai dosis.

Variabel utama ketiga pada penelitian ini adalah keamanan lambung ekstrak etanol daun duwet pada tikus putih jantan galur wistar.

Variabel utama keempat dalam penelitian ini adalah peneliti, kondisi laboratorium, kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, usia, jenis kelamin dan galur.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang sudah teridentifikasi dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah variabel yang bisa diubah-ubah yang dapat mempengaruhi variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini

adalah ekstrak etanol daun duwet yang diberikan pada tikus dengan berbagai variasi dosis.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah variabel yang dipengaruhi atau menjadi akibat karena adanya variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol daun duwet terhadap tikus putih jantan dan keamanannya terhadap lambung.

Variabel kendali pada penelitian ini adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel kendali pada penelitian ini adalah peneliti, kondisi laboratorium, kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, usia, jenis kelamin, galur, dan waktu pengamatan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun duwet (*Syzygium cumini* (L.)) adalah daun dari tanaman duwet yang diambil dari daerah Pitu Kabupaten Ngawi, Jawa Timur pada bulan November 2018.

Kedua, serbuk daun duwet (*Syzygium cumini*) merupakan serbuk yang berasal dari daun duwet yang telah dikeringkan, digiling dan diayak dengan ayakan no. mesh 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun duwet adalah ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi serbuk daun duwet dengan pelarut etanol 96%, selanjutnya dipekatkan menggunakan *vacum evaporator* hingga diperoleh ekstrak pekat daun duwet.

Etanol 96% adalah pelarut yang dapat melarutkan senyawa yang bersifat polar dan non polar secara lebih selektif. Maserasi adalah proses pengekstraksian simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali penggojokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar).

Keempat, aktivitas antiinflamasi adalah daya antiinflamasi ditunjukkan oleh kemampuan dalam menghambat volume udem telapak kaki yang dihasilkan akibat

induksi karagenan 1% secara subplantar pada telapak kaki tikus dan diukur dengan *plestymograph*.

Kelima, AUC adalah luas permukaan di bawah kurva yang menggambarkan volume edema terhadap waktu.

Keenam, efek keamanan terhadap lambung adalah tidak menimbulkan iritasi pada lambung setelah diberi perlakuan pada tikus yang dapat dilihat gambaran makroskopis pada tikus.

Ketujuh, tikus yang digunakan adalah tikus jantan galur wistar yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan sekitar 150-250 gram dalam keadaan sehat.

Kedelapan, dosis efektif adalah dosis yang memiliki aktivitas antiinflamasi dan aman pada lambung.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun duwet (*Syzygium cumini* (L.)) yang diambil pada bulan November 2018 dari daerah Pitu Kabupaten Ngawi, Jawa Timur.

1.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 96%, bahan penginduksi lamda karagenan (*Sigma Chemical*), Natrium Diklofenak sebagai pembanding (kontrol positif), larutan fisiologis (NaCl 0,9%), CMC Na 0,5% (kontrol negatif) dan aquadest.

2. Alat

Alat yang dipakai untuk membuat simplisia daun duwet adalah penghalus yang berfungsi untuk menghancurkan daun duwet, oven, mesin penggiling, ayakan nomor mesh 40. Alat penyari untuk daun duwet yang digunakan antara lain alat-alat gelas, peralatan maserasi yang terdiri dari botol cokelat, *vacum evaporator*. Alat yang digunakan untuk mengukur kadar air adalah *Sterling-Bidwell*, alat-alat gelas, timbangan elektrik, mortir dan stamfer, batang pengaduk. Alat yang digunakan untuk perlakuan hewan uji yaitu timbangan, spuit oral, jarum suntik, dan kandang tikus.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih galur wistar kelamin jantan, umur 2-3 bulan dengan berat badan rata-rata 150-250 g sebanyak 30 ekor. Pengelompokan dilakukan secara acak masing-masing 5 ekor per kelompok. Semua tikus dipelihara dengan cara yang sama, mendapat diet yang sama, ukuran kandang yang sesuai dengan temperature $30\pm 10^{\circ}\text{C}$. Penerangan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap. Selama penelitian kebutuhan makanan dan minuman harus selalu terkontrol agar mencegah kematian tikus.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi daun duwet (*Syzygium cumini* (L.)) yang bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel yang dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri dan morfologi yang ada pada daun duwet yang dibuktikan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Sebelas Maret Surakarta.

2. Pengambilan dan pembuatan serbuk daun duwet

Sampel penelitian yang digunakan adalah daun duwet yang diambil dari daerah Pitu Kabupaten Ngawi, Jawa Timur. Sampel daun duwet yang diperoleh disortasi basah lalu dicuci. Sampel kemudian dirajang dan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C , kemudian dilakukan sortasi kering dan diserbukkan.

3. Pembuatan ekstrak etanol daun duwet

Pembuatan ekstrak yang dilakukan dengan metode maserasi dengan perbandingan 1:10. Caranya ditambahkan satu bagian serbuk kering simplisia ke dalam maserator, ditambahkan 10 bagian pelarut, lalu direndam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Selanjutnya dipisahkan maserat dengan cara pengendapan, sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan

penguap vakum atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental. Hitung rendemen yang diperoleh yaitu persentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot ekstrak simplisia yang digunakan dengan penimbangan (Kemenkes 2013).

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat serbuk}} \times 100 \%$$

4. Penetapan kadar air ekstrak daun duwet

Penetapan kadar air ekstrak daun duwet dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Caranya dibersihkan tabung penerima dan pendingin dengan asam pencuci, bilas dengan air, kemudian dikeringkan dalam lemari pengering. Timbang dengan saksama sejumlah bahan yang diperkirakan mengandung 1 sampai 4 ml air, lalu dimasukkan ke dalam labu kering. Ditambahkan lebih kurang 200 mL toluena jenuh air ke dalam labu, pasang rangkaian alat. Ditambahkan toluena jenuh air ke dalam tabung penerima melalui pendingin sampai leher alat penampung. Panaskan labu hati-hati selama 15 menit.

Setelah toluena mulai mendidih, atur penyulingan dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik, hingga sebagian besar air tersuling, kemudian naikan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluena jenuh air. Selanjutnya dilakukan penyulingan selama 5 menit. Dinginkan tabung penerima hingga suhu ruang. Jika ada tetes air yang melekat, gosok tabung pendingin dan tabung penerima dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluena jenuh air hingga tetesan air turun. Baca volume air setelah toluen dan air memisah sempurna, kadar air dihitung dalam % v/b (Kemenkes 2011).

5. Uji bebas alkohol ekstrak etanol daun duwet

Uji bebas alkohol dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak tersebut bebas dari etanol. Tes bebas alkohol ekstrak etanol daun duwet dilakukan dengan cara ekstrak daun duwet ditambah asam asetat encer dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan. Bila tidak ada bau ester (etil asetat) berarti sudah tidak ada etanol (Depkes 1979).

6. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun duwet

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk memastikan kebenaran zat kimia yang terkandung di dalam daun duwet. Identifikasi senyawa meliputi senyawa flavonoid, tanin, saponin, steroid, dan triterpenoid.

Pada identifikasi senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun duwet berdasarkan reaksi warna menggunakan tabung reaksi dan bahan-bahan kimia seperti berikut :

6.1 Identifikasi flavonoid. Sejumlah tertentu ekstrak dilembabkan dengan 100 mL aquades panas kemudian didihkan selama 5 menit, disaring dan ambil filtratnya 5 mL dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan serbuk magnesium secukupnya, 1 mL asam klorida dan 2 mL amil alkohol. Selanjutnya campuran dikocok kuat lalu dibiarkan memisah. Reaksi positif ditunjukkan dengan warna merah/kuning/jingga (Sarker 2006).

6.2 Identifikasi tanin. Sejumlah ekstrak ditambah 20 mL air panas kemudian didihkan selama 15 menit, setelah dingin disaring. Sebanyak 5 ml filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi larutan besi (III) klorida 1%. Jika tanin positif maka akan terbentuk warna hijau violet setelah direaksikan dengan larutan besi (III) klorida (Depkes 1995).

6.3 Identifikasi saponin. Sejumlah tertentu ekstrak ditambah dengan air panas 10 ml, didinginkan lalu dikocok selama 10 detik. Kemudian didiamkan selama 10 menit. Saponin positif bila muncul buih yang tinggi 1-10 cm. Pada penambahan satu tetes asam klorida 2N buih tidak hilang (Robinson 1995).

6.4 Identifikasi steroid dan terpenoid. Sejumlah tertentu ekstrak ditambahkan dengan satu tetes Liebermann Burchard yang terdiri dari 1 mL asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat 1 tetes. Terpenoid menunjukkan reaksi positif dengan adanya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan. Sedangkan, steroid menunjukkan reaksi positif apabila muncul cincin biru kehijauan (Sarker 2006).

6.5 Uji alkaloid. Sebanyak 1 gram ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah dengan 5 tetes amonia pekat. Setelah itu disaring kemudian ditambah 2 ml asam sulfat 2 N, kemudian dikocok perlahan. Didiamkan beberapa

saat sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan atas yang jernih dibagi dua, 1 bagian ditambahkan 2-3 tetes pereaksi Dragendorff dan bagian berikutnya ditambahkan 2-3 tetes pereaksi Mayer. Endapan merah bata yang terbentuk oleh pereaksi Dragendorff dan endapan putih oleh pereaksi Mayer menunjukkan adanya senyawa alkaloid (Farnsworth 1996).

7. Pembuatan larutan uji

7.1 Larutan CMC Na 0,5%. Larutan CMC Na konsentrasi 0,5% dibuat dengan cara menimbang serbuk 500 mg kemudian dimasukkan dalam cawan penguap dan ditambah sedikit aquadest. Selanjutnya dipanaskan sampai mengembang kemudian dimasukkan ke dalam mortir dan menggerusnya dan menambahkan sedikit demi sedikit aquadest hingga 100 ml, diaduk hingga homogen.

7.2 Larutan karagenan lambda 1%. Larutan karagenan dibuat dengan cara menimbang 40 mg karagenan, dilarutkan dalam larutan NaCl fisiologis. (0,9 %) hingga volume 4 ml, akan diperoleh larutan lambda karagenan 1% (b/v). Sebelum disuntikkan larutan lambda karagenan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam (Bule 2014). Volume injeksi secara subplantar pada telapak kaki setiap tikus sebanyak 0,1 ml sudah dapat menimbulkan udem yang teramati dengan jelas (Falodun *et al.* 2013).

7.3 Suspensi natrium diklofenak. Larutan ini dibuat dengan cara menimbang 100 mg CMC-Na kemudian dimasukkan ke dalam cawan penguap, ditambahkan aquadest secukupnya dan dipanaskan sampai mengembang. Dimasukkan ke dalam mortir sambil digerus hingga homogen. Menimbang 9 mg natrium diklofenak dimasukkan ke dalam mortir berisi suspensi CMC-Na, gerus sambil menambahkan aquadest sampai volume 20 ml, hingga diperoleh konsentrasi 0,45 mg/ml.

7.4 Suspensi ekstrak daun duwet. Dibuat mucilago CMC dengan mencampur 150 gram serbuk CMC-Na ke dalam cawan yang telah diisi air panas secukupnya. Sebanyak 1,5 gram ekstrak daun duwet digerus dalam mortir, selanjutnya ditambah mucilago CMC Na diaduk hingga homogen kemudian

dituang dalam botol yang telah dikalibrasi 30 ml, lalu ditambah air suling ad tanda batas.

8. Penentuan dosis

8.1 Dosis CMC Na 0,5%. Larutan CMC Na 0,5% diberikan terhadap kontrol negatif pada tikus secara peroral.

8.2 Dosis natrium diklofenak. Dosis natrium diklofenak dari faktor konversi manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 g adalah 0,018. Dosis terapi untuk manusia 70 kg adalah 50 mg. Dosis untuk tikus (200 g) adalah 50 mg dikali 0,018 sehingga diperoleh 4,5 mg/kg BB tikus.

8.3 Sediaan uji. Dosis yang diberikan pada tikus mengacu pada dosis ekstrak etanol daun duwet dari Jain *et al.* (2010) mengatakan bahwa dapat menghasilkan efek antiinflamasi pada dosis 200 mg/kg BB tikus secara p.o. Penentuan dosis dilakukan setelah melakukan orientasi dengan mengkonversi rendemen pengeringan dan ekstrak daun duwet dari manusia 70 kg ke tikus 200 gram (faktor konversi 0,018), maka dosis yang diberikan kepada tikus dalam penelitian ini yaitu dosis I (75 mg/kg BB tikus), dosis II (150 mg/kg BB tikus), dan dosis III (300 mg/kg BB tikus) banyaknya ekstrak kental daun duwet yang digunakan dan dihitung berdasarkan berat badan dari masing-masing tikus.

8.4 Dosis karagenan 1%. Dosis karagenan 1% sebagai penginduksi yaitu 0,2 ml/ ekor tikus.

9. Penentuan hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar dan tidak cacat dengan berat sekitar 180-220 g sebanyak 30 ekor yang kemudian dibagi menjadi 6 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Tikus-tikus tersebut kemudian diaklimatisasi selama satu minggu.

10. Uji antiinflamasi

Tikus yang telah beradaptasi dengan lingkungannya kemudian ditimbang, tikus yang digunakan sebanyak 25 ekor secara acak yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor, sebelumnya tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 8 jam sebelum diberi perlakuan.

- Kelompok 1 : kontrol negatif (tikus diberikan CMC Na 0,5%)
- Kelompok 2 : kontrol positif (tikus diberikan natrium diklofenak 4,5 mg/kg BB tikus)
- Kelompok 3 : tikus diberikan ekstrak etanol daun duwet dengan dosis 75 mg/kg BB tikus.
- Kelompok 4 : tikus diberikan ekstrak etanol daun duwet dengan dosis 150 mg/kg BB tikus.
- Kelompok 5 : tikus diberikan ekstrak etanol daun duwet dengan dosis 300 mg/kg BB tikus.

Satu jam setelah pemberian zat uji, kemudian diinduksi karagenan lambda 1% pada telapak kaki kiri belakang dengan volume 0,1 ml. Volume telapak kaki diukur pada jam ke 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 24 jam setelah diinduksi karagenan dengan cara memasukkan telapak kaki tikus ke dalam alat *plestimograph* hingga tanda batas. Hitung volume udem sebelum dan sesudah penginduksian karagenan dengan rumus sebagai berikut:

$$V_u = V_t - V_o$$

Keterangan:

V_u : Volume udem kaki tikus tiap waktu (t)

V_t : Volume udem kaki tikus setelah diradangkan dengan karagenan 1% pada waktu (t)

V_o : Volume udem kaki tikus sebelum diradangkan dengan karagenan 1%

Daya antiinflamasi obat uji ditunjukkan oleh kemampuan dalam menghambat volume udem telapak kaki yang dihasilkan akibat induksi karagenan (Winter *et al.* 1962). Hitung AUC (*Area Under Curve*) dan DAI (Daya Antiinflamasi). Data AUC dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

V_{t_n} = volume edema rata-rata t_n

$V_{t_{n-1}}$ = volume edema rata-rata t_{n-1}

Persentase daya antiinflamasi dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Daya antiinflamasi} = \frac{AUC_k - AUC_p}{AUC_k} \times 100\%$$

Keterangan:

AUC_k = AUC kurva volume edema rata-rata terhadap waktu untuk kontrol negatif

AUC_p = AUC kurva volume edema rata-rata terhadap waktu untuk kelompok perlakuan tiap individu

Tabel 1. Kelompok uji antiinflamasi

| Kelompok | Perlakuan |
|----------|--|
| I | Kontrol negatif (CMC Na) |
| II | Kontrol positif (Na diklofenak) dosis 4,5 mg/kg BB |
| III | Ekstrak daun duwet dosis 75 mg/kg BB tikus |
| IV | Ekstrak daun duwet dosis 150 mg/kg BB tikus |
| V | Ekstrak daun duwet dosis 300 mg/kg BB tikus |

11. Pemeriksaan makroskopik pada lambung

Pemeriksaan makroskopik pada lambung dilakukan pada kelompok yang sama pada uji antiinflamasi, selanjutnya dengan penambahan kelompok normal. Pemberian sediaan uji dilakukan secara terus menerus hingga hari ke-5 sebanyak 1 kali sehari secara peroral sesuai dosis masing-masing sediaan yang diberikan. Pada hari ke-5, tikus-tikus tersebut dipuasakan selama 12 jam (diberi air seperlunya). Selanjutnya pada hari ke-6 hewan uji dikorbankan dengan cara decapitation (perusakan otak lewat leher). Decapitation dilakukan dengan jalan memotong kepala hewan dengan menggunakan peralatan tajam dengan tujuan untuk memutus kepekaan saraf tulang belakang. Pemeriksaan makroskopik pada lambung dilakukan dengan cara bagian perut diambil dan dicuci dengan air mengalir. Irisan membujur sepanjang lengkungan terbesar dilakukan dengan gunting bedah. Bagian perut dibalik dan diletakkan di atas styrofoam dan diamati ada atau tidaknya iritasi lambung. Kriteria dan skor kerusakan pada lambung tikus ditunjukkan pada tabel 2.

Tabel 2. Skoring keparahan tukak (Gusdinar 2009; Vogel 2002)

| Jumlah tukak | Skor | Diameter tukak | Skor |
|-----------------------|------|---------------------------|------|
| Lambung normal | 1 | Lambung normal | 1 |
| Bintik berdarah | 2 | Bintik berdarah | 2 |
| Jumlah tukak 1-3 buah | 3 | Diameter tukak 0,5-1,5 mm | 3 |
| Jumlah tukak 4-6 buah | 4 | Diameter tukak 1,6-4,0 mm | 4 |
| Jumlah tukak 7-9 buah | 5 | Diameter tukak >4,0 mm | 5 |
| Jumlah tukak >9 buah | 6 | Perforasi | 6 |

Lambung yang telah mengalami tukak diambil gambarnya dan dihitung jumlah tukak serta pengukuran diameter tukak, yang kemudian dibandingkan

dengan kelompok kontrol. Tingkat keparahan tukak dinyatakan sebagai indeks tukak kemudian dianalisa secara statistik. Indeks tukak dihitung dengan cara:

$$\text{Indeks tukak} = A + B$$

Keterangan:

A: rata-rata skor jumlah tukak

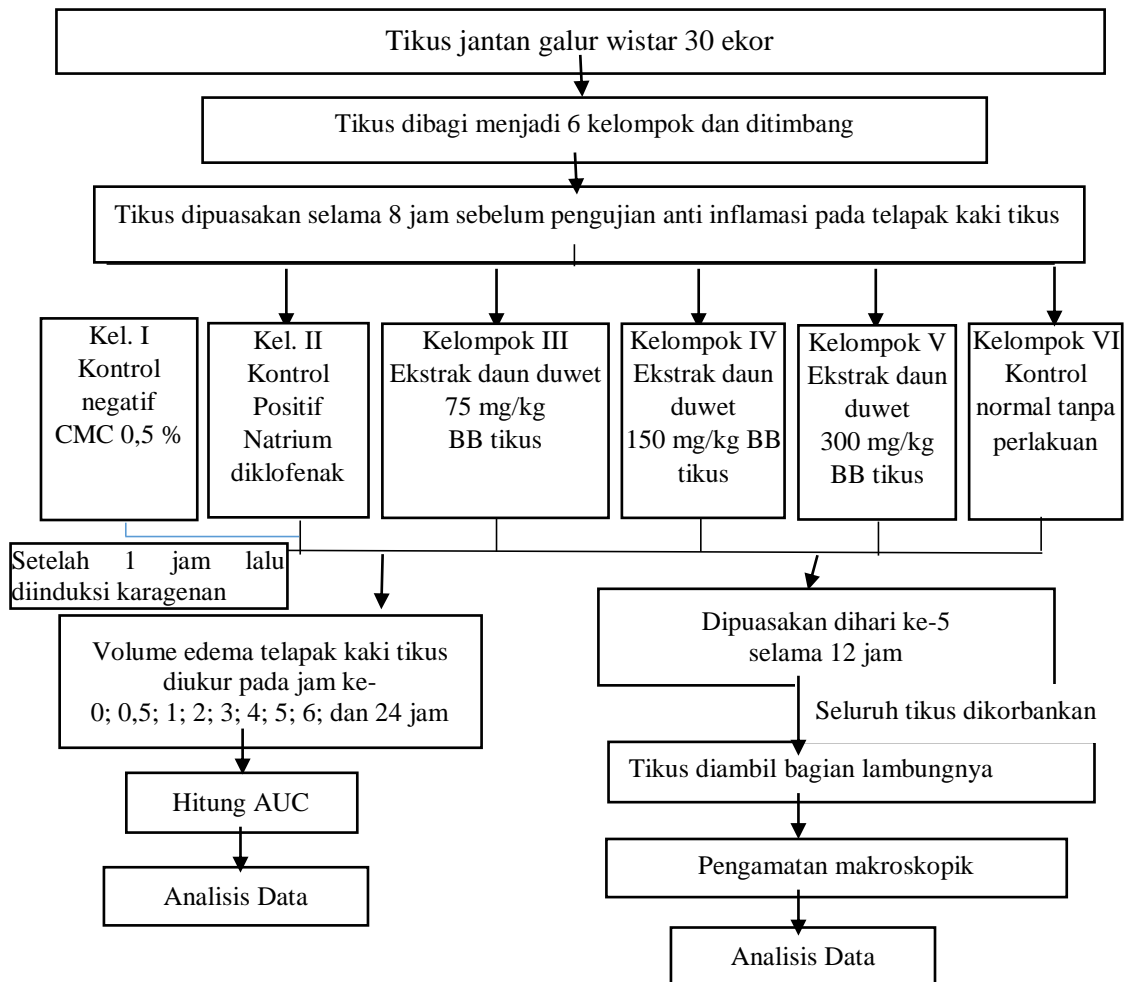
B: rata-rata skor diameter tukak (Gusdinar 2009; Vogel 2002)

E. Analisa Statistik

Analisa statistik yang pertama digunakan dalam penelitian ini adalah untuk melihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak yaitu dengan menggunakan uji distribusi normal (*Saphiro Wilk*). Jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$), analisis data dilanjutkan dengan uji parametrik (*One Way ANOVA*) untuk mengetahui perbedaan yang nyata diantara perlakuan. Jika hasil uji *One Way ANOVA* dan uji *Lavene Statistic* menunjukkan hasil yang homogen ($p > 0,05$).

Data hasil pengamatan pada ulkus lambung akan diuji menggunakan uji distribusi normal (*Saphiro Wilk*) untuk melihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak. Jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$), analisis data dilanjutkan dengan uji parametrik (*One Way ANOVA*) dan uji *Lavene Statistic* menunjukkan hasil yang homogen ($p > 0,05$).

F. Skema Penelitian



Gambar 1. Skema jalannya penelitian uji antiinflamasi dan uji keamanan lambung tikus.

