

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang menjadi bahan percobaan ini adalah daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) siap panen pada usia 4 bulan yang diperoleh dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada percobaan ini adalah daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) usia 4 bulan dengan kondisi daun yang bersih, segar, lebar dan mengkilap yang diperoleh dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak etanol daun sirih merah. Variabel utama kedua adalah penurunan volume edema pada tikus putih jantan galur wistar. Variabel utama ketiga adalah efek keamanan ekstrak daun sirih merah terhadap lambung pada tikus putih jantan jalur wistar.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Klasifikasi variabel utama dibagi menjadi variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis sediaan uji ekstrak etanol daun sirih merah.

Variabel tergantung dalam percobaan ini adalah aktivitas antiinflamasi ekstrak daun sirih merah berupa penurunan volume edema, dan keamanan terhadap lambung setelah 7 hari pemberian pada skor tukak tikus putih jantan galur wistar.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah tikus galur wistar, kondisi kandang, makanan, bobot tikus, metode uji antiinflamasi, waktu pemberian

sediaan uji, proses pembuatan sediaan uji, cara pemberian sediaan uji, jenis kelamin, dan usia tikus galur wistar.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) adalah daun yang dipanen pada usia 4 bulan dengan kondisi daun yang bersih, segar, lebar dan mengkilap yang diperoleh dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua serbuk daun sirih merah adalah serbuk dari daun sirih merah yang telah dipilih kemudian dicuci bersih kemudian dilakukan perajangan dan dikeringkan menggunakan oven suhu 40⁰C - 50⁰C dibuat dalam bentuk serbuk dengan cara diblender, diayak dengan menggunakan ayakan 40 mesh.

Ketiga ekstrak daun sirih merah adalah ekstrak yang dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96 % kemudian dipekatkan dengan evaporator pada suhu 40⁰ - 50⁰C.

Keempat, hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar dengan berat 180 - 220 gram dan umur 2 – 3 bulan.

Kelima, inflamasi adalah peradangan pada kaki tikus yang diinduksi dengan karagenan 1 % diberikan secara subplantar.

Keenam efek antiinflamasi adalah volume edema pada kaki tikus yang diberi induksi karagenan diukur dengan plestimometer dikurangi volume kaki tikus yang diberikan sediaan uji.

Ketujuh, pemeriksaan efek keamanan terhadap lambung adalah pemeriksaan skor tukak lambung pada tikus jantan putih galur wistar setelah diberikan sediaan uji diamati makroskopis dan histopatologi lambung tikus.

C. Alat, Bahan dan Hewan Uji

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu seperangkat alat ekstraksi maserasi, rotari evaporator, *beaker glass*, oven, plestimometer, alat bedah, tabung reaksi, mortir, stamfer, timbangan neraca analitik, sendok tanduk, spatula,

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sirih merah yang diperoleh dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. yang dimaserasi dengan etanol 96%, untuk uji antiinflamasi bahan yang digunakan adalah penginduksi lamda karagenan 1%, Na Diklofenak, CMC Na 1%, bahan untuk uji histologi lambung adalah parafin, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 100%, hematoxylin-eosin, albumin, gliserol. Bahan untuk identifikasi kandungan senyawa ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) adalah NaCl, aquades, FeCl₃, amoniak, klorofom, metanol.

3. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar berumur 2 - 3 bulan dengan berat badan 180 - 220 gram sebanyak 25 ekor, hewan uji dibagi menjadi 5 kelompok pengelompokan dilakukan secara acak masing-masing 5 ekor tikus disetiap kelompok. Penetapan besar sampel dilakukan dengan menggunakan rumus Federer sebagai berikut :

$$(n-1) \times (t-1) > 15$$

Keterangan: n = besar sampel setiap kelompok

t = banyaknya kelompok (Rachmawati *et al.* 2010)

Perhitungan sampel = $(n-1) \times (5-1) > 15$

$$(n-1) \times 4 > 15$$

$$4n - 4 > 15$$

$$4n > 15 + 4$$

$$4n > 19$$

$$n > \frac{19}{4}$$

$$n > 4,75$$

Setiap kelompok minimal terdiri dari > 4,75 sampel sehingga pada penelitian ini digunakan 5 ekor tikus pada setiap kelompok.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi

Sebelum dilakukan penelitian harus memastikan kebenaran tanaman sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) dengan cara determinasi. Determinasi tanaman sirih merah dilakukan di laboratorium MIPA Fakultas Biologi Universitas Sebelas Maret Surakarta.

2. Pembuatan Simplisia

Memilih daun sirih merah yang digunakan dalam keadaan segar, bersih, lebar dan mengkilap mensortir adanya pengotor atau tidak pada daun sirih merah. Daun yang telah dipilih kemudian dicuci bersih menggunakan air sampai bersih kemudian dilakukan perajangan dan dikeringkan menggunakan oven suhu 40⁰ - 50⁰C sampai kering. Daun sirih merah yang sudah kering dibuat dalam bentuk serbuk dengan cara diblender, diayak dengan menggunakan ayakan mesh 40 kemudian diukur kelembapan dengan alat *moisture balance* (Puspitasari 2016).

3. Penetapan kelembapan serbuk daun sirih merah

Penetapan kelembapan serbuk daun sirih merah dilakukan menggunakan alat *moisture balance*, setelah alat dinyalakan atur suhu menjadi 105⁰ c kemudian serbuk daun sirih merah yang sudah diperoleh ditimbang sebanyak 2 gram pada alat moisture balance kemudian ditutup rapat dan tunggu sampai diperoleh kadar kelembapan serbuk daun sirih merah yang konstan replikasi sebanyak 3 kali.

4. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Pembuatan ekstrak etanol daun sirih merah dengan metode remaserasi dengan perbandingan 1 : 7,5. 1 bagian serbuk daun sirih merah di masukkan ke dalam botol gelap ditambahkan 7,5 bagian pelarut etanol 96% dan ditutup rapat serta terhindar dari cahaya matahari langsung selama 3 × 24 jam sambil sesekali digojog. Setelah 3 hari kemudian disaring dan diperoleh maserat ke 1. Ampas direndam kembali dengan 2,5 bagian pelarut etanol selama 24 jam, disaring kembali dan di peroleh maserat ke 2. Maserat 1 dan 2 digabungkan lalu

dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental etanol. Hitung rendemen yang diperoleh yaitu persentase bobot (*b/b*) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan (Puspitasari 2016).

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

5. Penetapan kadar air metode Sterling Bidwell

Menyiapkan serangkaian alat *Sterling Bidwell*, membersihkan tabung penerima dan pendingin kemudian dikeringkan dalam lemari pengering. Menimbang saksama sejumlah bahan yang diperkirakan mengandung I sampai 4 mL air, Dimasukkan ke dalam labu kering, untuk zat yang dapat menyebabkan gejolak mendadak saat mendidih, ditambahkan batu didih secukupnya. Ditambahkan lebih kurang 200 mL toluen jenuh air ke dalam labu, memasang rangkaian alat dan labu dipanaskan selama 15 menit.

Setelah toluen mulai mendidih, mengatur 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 toluen jenuh air, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan telah dibasahi dengan toluen jenuh air lanjutkan penyulingan selama 5 menit. Dinginkan tabung penerima hingga suhu ruang, baca volume air setelah air dan toluen memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b (FHI 2008)

6. Identifikasi senyawa

6.1 Flavonoid. Sebanyak 200 mg sampel tumbuhan yang telah diekstrak dengan 5 ml etanol dan dipanaskan selama lima menit di dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambah beberapa tetes HCl pekat. Kemudian ditambahkan 0,2 g bubuk Mg. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah tua (magenta) dalam waktu 3 menit (Sangi *et al.* 2008).

6.2 Tanin. Sebanyak 20 mg sampel tumbuhan yang telah dihaluskan, ditambah etanol sampai sampel terendam semuanya. Kemudian sebanyak 1 ml

larutan dipindahkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl_3 1% Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau. (Sangi *et al.* 2008).

6.3 Alkaloid. Sejumlah ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditetesi dengan HCl 2 N, lalu dibagi dalam beberapa tabung reaksi. Tiap tabung ditambahkan dengan masing-masing pereaksi. Pada penambahan pereaksi Mayer, positif mengandung alkaloid jika membentuk endapan putih atau kuning. Pada penambahan pereaksi Wagner, positif mengandung alkaloid jika terbentuk endapan coklat. Pada penambahan pereaksi Dragendorff, positif mengandung alkaloid jika terbentuk endapan jingga (Utami *et al.* 2016).

6.4 Saponin. Sejumlah ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan 10 mL air panas, dinginkan kemudian kocok kuat-kuat selama 10 detik. Positif mengandung saponin jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm selama tidak kurang dari 10 menit dan pada penambahan 1 tetes HCl 2 N, busa tidak hilang. (Utami *et al.* 2016).

6.5 Steroid. Analisis Steroid Sejumlah sampel diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sampel ditambahkan 2 tetes larutan CHCl_3 . Ditambahkan 3 tetes pereaksi Lieberman Burchard. Perubahan pada sampel diamati, terbentuknya warna merah pada larutan pertama kali kemudian berubah menjadi biru dan hijau menunjukkan reaksi positif (Purwati *et al.* 2017).

6.6 Triterpenoid. Sejumlah sampel diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sampel ditambahkan 2 tetes larutan CHCl_3 . Ditambahkan 3 tetes pereaksi Lieberman Burchard. Perubahan pada sampel diamati, reaksi positif jika terbentuknya warna merah ungu (Purwati *et al.* 2017).

7. Penentuan dosis

7.1 Dosis natrium diklofenak. Dosis penggunaan untuk natrium diklofenak adalah 50 - 75 mg qid pada penelitian ini menggunakan dosis 50 mg / kg BB (Katzung *et al.* 2012). Faktor konversi dosis dari manusia dengan berat badan 70 kg pada tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018. Sehingga

dosis Na diklofenak untuk 200 gram tikus adalah 50 mg di kali 0,018 diperoleh 0,9 mg/200 gram BB tikus (4,5 mg/kg BB tikus).

7.2 Dosis ekstrak daun sirih. Dosis daun sirih yang digunakan pada penelitian ini adalah 50 mg/kg BB dan 100 mg/kg BB berdasarkan hasil penelitian Fitriyani *et al.* (2011).

7.3 Dosis karagenan. Dosis karagenin 1% yang digunakan sebagai penginduksi pada penelitian ini adalah 0,05 ml berdasarkan hasil penelitian Fitriyani *et al.* (2011).

8. Pembuatan larutan uji

8.1 Suspensi CMC – Na 1 %. larutan CMC 1 % digunakan sebagai kontrol negatif cara pembuatannya dengan menimbang 1 gram CMC-Na kemudian dilebur ke dalam cawan penguap yang berisi sebagian air panas hingga mengembang. Dimasukkan pada mortir gerus ad homogen dan ditambahkan akuades sampai 100 mL.

8.2 Suspensi lamda karagenin 1%. Pembuatan suspensi lamda karagenin 1% diperoleh dengan mensuspensikan 1 gram karagenin tambahkan suspensi CMC 1% (qs). Lalu ditambahkan akuades sampai 100 mL.

8.3 Pembuatan suspensi natrium diklofenak 0,5%. Natrium diklofeank disuspensikan dengan CMC-Na 1%. Menimbang 50 mg natrium diklofenak dimasukkan dalam mortir ditambahkan suspensi CMC-Na 1 % (qs) digerus dan ditambahkan akuades ad 10 ml.

8.4 Pembuatan suspensi ekstrak daun sirih merah. Ekstrak daun sirih merah disuspensikan dengan CMC – Na 1%. Menimbang 1 gram ekstrak dimasukkan dalam mortir ditambahkan suspensi CMC-Na 1% secukupnya digerus dan ditambahkan akuades ad 100 ml.

9. Pengujian aktivitas antiinflamasi

Pada pengujian aktivitas antiinflamasi hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar yang berumur 2 – 3 bulan dengan berat badan 180 - 200 gram. Tikus dipuaskan selama kurang lebih 18 jam sebelum perlakuan namun air minum tetap diberikan. Tikus dikelompok menjadi 5 kelompok secara

acak masing – masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus, pada awal perlakuan setiap tikus ditimbang bobotnya lalu dibagi menjadi 5 kelompok secara acak kemudian tikus diberi tanda batas pada sendi belakang kaki kiri agar pemasukan kaki dalam pletismometer selalu sama lalu diukur volume awal kaki tikus dicatat sebagai volume dasar untuk tiap tikus. Perlakuan hewan uji dibagi menjadi beberapa kelompok yaitu :

kelompok 1 : kontrol negatif CMC-Na 1%

kelompok 2 : kontrol positif Na diklofenak dosis 4,5 mg/ kg BB tikus

kelompok 3 : kontrol uji ekstrak dosis 50 mg/kg BB tikus

kelompok 4 : kontrol uji ekstrak dosis 100 mg/kg BB tikus

kelompok 5 : kontrol normal

Satu jam setelah pemberian obat uji atau larutan kontrol secara peroral, disuntikkan larutan karagenan 1% pada telapak kaki kiri tikus sebanyak 0,05 mL penyuntikkan dilakukan secara subplantar. Kemudian setelah tiga puluh menit volume kaki yang disuntik karagen diukur pada alat (pletismometer air raksa) dengan cara mencelupkan telapak kaki kiri tikus ke dalam alat pletismometer air raksa sampai tanda dan dicatat volume kakinya. Lakukan pengukuran setiap 1 jam yaitu pada jam ke 1, 2, 3, 4, 5, 6 dan pada jam ke 24 setelah diinduksi karagenin 1%.

10. Pengujian Keamanan Lambung

10.1 Indeks tukak lambung. Uji keamanan lambung dilakukan pada kelompok uji yang sama dengan uji antiinflamasi hanya saja pemberian sediaan uji dilakukan secara terus-menerus sampai hari ke 7, sediaan diberikan sehari sekali dengan cara peroral sebanyak 2 mL. Pada hari ke 7 tikus dipuasakan selama 12 jam dan pada hari ke 8 hewan uji dikorbankan dengan cara dislokasi leher kemudian dilakukan pembedahan untuk diamati keadaan makroskopis organ lambungnya.

Tabel 1. Pengamatan jumlah tukak & keparahan tukak lambung

Nilai	Jumlah tukak	Keparahan tukak
1	Lambung normal	Lambung normal
2	Bintik pendarahan / jumlah tukak 1	Bintik pendarahan / tukak diameter 0,5 mm
3	Jumlah tukak 2 – 4	Diameter tukak 0,5 – 1,0 mm
4	Jumlah tukak 5 – 7	Diameter tukak 1,0 – 1,5 mm
5	Jumlah tukak 8 – 10	Diameter tukak 1,5 – 2,0 mm
6	Jumlah tukak > 10	Diameter tukak > 2,0 mm / perforasi

Sumber : Hanafi *et al.*(2014), Vogel (2002)

Indeks tukak dihitung dengan menjumlahkan skor yang didapat (Hanafi *et al.*2014, Vogel 2002) dengan rumus yaitu :

$$U = U_N + U_S + U_P \times 10^{-1}$$

Keterangan : U = indeks tukak

U_N = rata-rata jumlah tukak setiap hewan

U_S = rata-rata keparahan tukak

U_P = persentasi hewan dengan tukak

10.2 Pemeriksaan histopatologi lambung. Pembuatan preparat

histopatologi dilakukan dengan tahapan sebagai berikut :

- Tahap fiksasi menggunakan Netral Buffer formalin 10% (NFB). Pada proses ini organ lambung yang telah diambil difiksasi menggunakan Netral Buffer Formalin (NCB) 10% selama minimal 24 jam kemudian jaringan dipotong-potong dan dimasukkan ke dalam wadah spesimen yang terbuat dari plastik.
- Tahap dehidrasi. Proses selanjutnya adalah tahap dehidrasi pada konsentrasi alkohol bertingkat yaitu alkohol 70%, 80 %, 90% alkohol absolut I, absolut II masing –masing 2 jam. Kemudian dilakukan pembersihan dengan xylol.
- Pencetakan menggunakan parafin. Pencetakan menggunakan parafin di dalam blok – blok parafin dan disimpan dalam lemari es. Blok –blok parafin tersebut kemudian dipotong tipis 6-8 μ m menggunakan mikrotom. Hasil potongan diapungkan dalam air hangat bersuhu 60°C (*waterbath*) untuk

meregangkan agar jaringan tidak berlipat. Sediaan kemudian diangkat dan diletakkan pada gelas objek untuk dilakukan pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE).

- d. Tahap deparafinasi dan rehidrasi. Sediaan preparat pada gelas objek direndam dalam xylol 1 dan 2 selama masing-masing dua menit untuk dilakukan deparafinasi kemudian rehidrasi dengan perendaman secara berturut dalam alkohol absolut, alkohol 95%, dan alkohol 80% masing-masing selama dua menit, lalu dicuci dengan air mengalir.
- e. Pewarnaan hematoksilin-eosin. Pewarnaan dengan hematoksilin dilakukan selama 8 menit, selanjutnya dibilas dengan air mengalir, lalu dicuci dengan lithium karbonat selama 15-30 detik, dibilas dengan air mengalir, serta diwarnai dengan eosin selama 2-3 menit. Sediaan yang diwarnai eosin dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan. Sediaan dimasukkan ke dalam alkohol 95% dan alkohol absolut masing-masing sebanyak 10 kali celupan, lalu ke dalam alkohol absolut 2 selama 2 menit. Selanjutnya ke dalam xylol 1 selama 1 menit dan xylol 2 selama 2 menit. Sediaan kemudian ditetaskan dengan perekat permount dan ditutup dengan gelas penutup dan selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop.
- f. Pembacaan sampel. Pada tahapan ini pemeriksaan preparat histopatologi lambung masing-masing dilakukan 5 lapang pandang mikroskop, masing-masing pada pembesaran 100x dan 400x, perubahan histopatologi yang diamati berupa adanya nekrosis sel radang (Mustaba 2012).
- g. Tiga ciri-ciri utama dari sel atau jaringan yang mengalami nekrosis secara mikroskopik yaitu piknosis, karioreksis, dan kariolisis. Piknosis ditandai dengan inti sel yang mengkerut, sedangkan karioreksis ditandai dengan inti sel yang pecah-pecah menjadi keping-keping, serta kariolisis ditandai dengan hilangnya inti sel (Darmawan *et al.* 2018).

E. Analisis Data

Untuk uji antiinflamasi data kuantitatif penelitian berupa volume inflamasi/udem, persen inflamasi dan persen hambat inflamasi. Volume udem merupakan selisih dari volume kaki sebelum dan sesudah diinduksi dengan karagenin 1%. Perhitungannya dengan rumus :

$$V_u = V_t - V_0$$

Keterangan :

V_u : volume udem kaki tikus tiap waktu t

V_t : volume kaki tikus setelah diradangkan dengan karagenin 1% pada waktu tertentu

V_0 : volume awal kaki tikus sebelum diradangkan dengan karagenin 1%

Setelah pengamatan maka persentase inflamasi kaki kiri tikus putih jantan dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Inflamasi} = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100\%$$

Sedangkan persentase hambatan inflamasi dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\frac{a - b}{a} \times 100\%$$

Keterangan :

a = Persen inflamasi rata-rata kelompok kontrol negatif

b = Persen inflamasi kelompok perlakuan bahan uji atau obat pembanding

Data kuantitatif penelitian berupa AUC dari kurva volume udem rata-rata terhadap waktu dan persen efek antiinflamasi. Nilai AUC yaitu luas daerah rata – rata di bawah kurva yang merupakan hubungan volume udem rata-rata tiap satuan waktu dengan rumus yaitu :

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

Keterangan :

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

V_{t_n} = volume udem rata – rata pada t_n

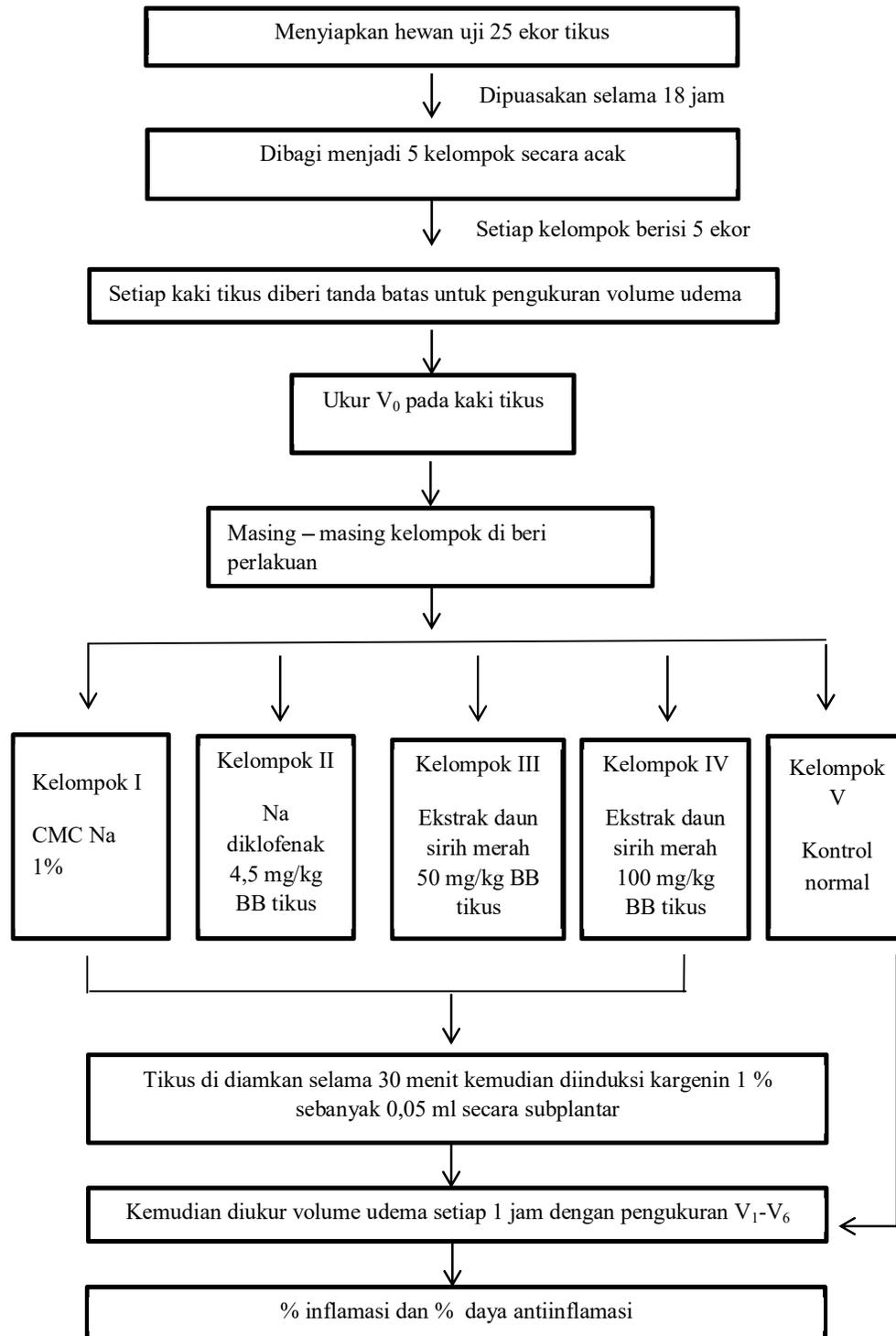
Persen daya antiinflamasi di hitung berdasarkan perseb penurunan udema menggunakan rumus :

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

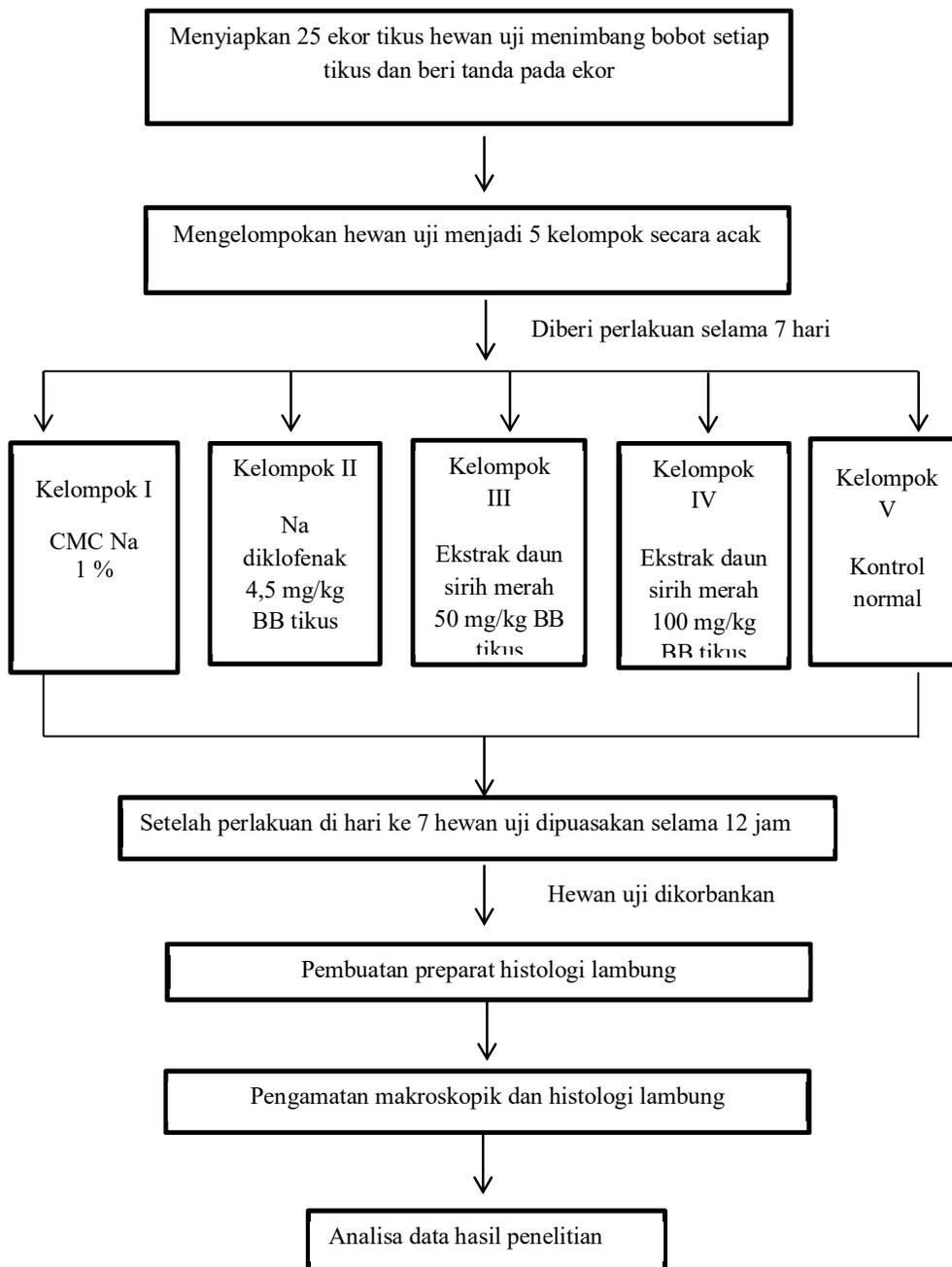
Keterangan : AUC_k = AUC kurva volume udema rata-rata terhadap waktu untuk kontrol negatif

AUC_p = AUC kurva volume udema rata-rata terhadap waktu untuk kontrol kelompok perlakuan pada tiap individu

Tahap awal analisis statistik hasil penelitian dilakukan dengan tes *Shapiro-Wilk* yang digunakan untuk mengetahui apakah data hasil penelitian terdistribusi normal atau tidak ($p > 0,05$), jika data terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji ANOVA *one way*. Tetapi jika data tidak terdistribusi normal maka dianalisis dengan uji Kruskal-Wallis untuk mengetahui adanya perbedaan pada setiap kelompok perlakuan. Jika terdapat perbedaan yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji Mann - Whitney untuk mengetahui letak perbedaanya.



Gambar 5. Skema uji antiinflamasi



Gambar 6. Skema uji efek keamanan lambung