

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tin yang diperoleh dari Jumantono, Karanganyar, Solo, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun yang masih segar, berwarna hijau tua dan bebas dari hama sehingga kandungan kimia yang terkandung pada tanaman optimal.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah serbuk daun tin yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.

Variabel utama yang kedua adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) jantan usia 2 bulan atau 70 hari dan mempunyai berat badan kurang lebih 120 - 250 gr.

Variabel utama yang ketiga adalah kadar kemampuan sediaan uji untuk memberikan efek antiinflamasi pada kaki tikus, serta pengaruhnya terhadap jumlah leukosit.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan dalam beberapa macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel independen adalah variabel yang sengaja diubah untuk menguji pengaruhnya terhadap variabel dependen. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak daun tin dengan pelarut etanol 70%.

Variabel dependen merupakan inti permasalahan yang menjadi kriteria penelitian ini. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah efek antiinflamasi ekstrak etanol daun tin pada pembengkakan kaki tikus, serta pengaruhnya terhadap jumlah leukosit.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel dependen. Variabel kontrol yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis tikus yaitu (*Rattus norvegicus*) dengan kelamin laki-laki, umur tikus 2 bulan atau 70 hari, berat badan tikus sekitar 120-250 g.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun tin adalah daun yang dipetik dalam keadaan masih segar dan berwarna hijau tua.

Kedua, serbuk daun tin yang didapat berasal dari daun tin yang telah dicuci bersih, dikeringkan dengan oven sampai kering kemudian dihaluskan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan nomor 40, 60, 80.

Ketiga, ekstrak etanol daun tin adalah ekstrak yang dibuat dari serbuk kering diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dan dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Keempat, hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan, usia 2 bulan atau 70 hari dengan berat antara 120 - 250 gram.

Kelima, daya antiinflamasi adalah persentase penurunan volume edema telapak kaki tikus yang dihasilkan akibat induksi putih telur diukur dengan plestimometer.

Keenam, dosis efektif adalah dosis terkecil yang memberikan aktivitas setara dengan kontrol positif.

Ketujuh, Putih telur digunakan sebagai induksi karena dapat menyebabkan udem pada hewan uji.

C. Alat, Bahan, dan Hewan Uji

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah, bejana maserasi, gelas ukur, bekkor glass, plestimometer, *burner*, *cotton buds*, *handscoon*, gunting, spidol, *rotary evaporator*, *juicer* buah, ayakan no.40 mesh, pipet mikro, neraca analitik, corong, kertas saring, cawan porselen, mortir, stamfer, *waterbath*.

2. Bahan

Tanaman tin (*Ficus carica* L.), natrium diklofenak, tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) dewasa 25 ekor, CMC-Na 0,5%, alkohol 70%, akuades, putih telur.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) yang berumur 2 bulan atau 70 hari dengan berat badan rata – rata 20 - 40 gram.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman tin

Tahap pertama pada penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel. Determinasi dilakukan di B2P2TOOT Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah dengan mencocokkan karakteristik dan morfologi tumbuhan yang akan diteliti.

2. Pembuatan serbuk daun tin.

Daun tin dibersihkan menggunakan air yang mengalir sampai bersih, lalu diangin-anginkan selama satu hari. Daun tin dipotong menjadi bagian kecil. Daun tin yang sudah dipotong dikeringkan menggunakan oven selama 2 -5 hari dengan suhu 50°C (Kiswandono, 2011). Pengerinan dilakukan untuk mengurangi kadar air yang terkandung pada tanaman sehingga mencegah pertumbuhan bakteri dan jamur, dan dapat mencegah perubahan kimia yang dapat menurunkan mutu. Daun tin yang telah kering, kemudian diblender hingga halus lalu diayak menggunakan ayakan nomor 40 mesh, 60 mesh, dan 80 mesh hingga menjadi serbuk simplisia (Arifin dan Yana, 2015).

3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun tin

Penentuan susut pengeringan ditentukan menggunakan *moisture balance* disuhu 105°C dengan menimbang 2g serbuk dimasukkan ke dalam alat serta tunggu 15 menit hingga hasil pengukuran muncul untuk setiap pengukuran dan diulang 3 kali ditandai dengan bobot yang konstan. Susut pengeringan yang baik tidak melebihi 10% (Depkes, 2000).

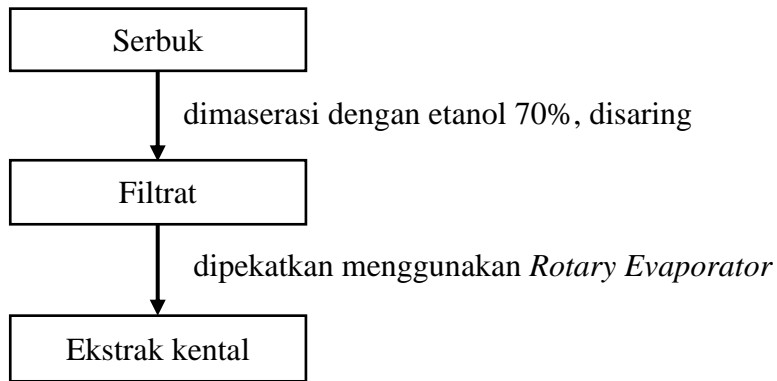
$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{bobot awal}} \times 100 \%$$

4. Pembuatan ekstrak etanol daun tin

Pembuatan ekstrak daun tin dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan serbuk dengan pelarut adalah 1:10 bagian. Serbuk simplisia dimasukkan ke dalam bejana maserasi, dan tambahkan pelarut etanol 70% sampai serbuk simplisia terendam selanjutnya diamkan campuran tersebut sambil sesekali diaduk untuk pelarut diganti setiap 24 jam dan proses maserasi dilakukan selama 6 hari, biasanya dilakukan dalam waktu 4 sampai 10 hari atau hasil maserasi yang diperoleh mendekati warna bening. Hasil dari proses maserasi kemudian disaring untuk pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak daun tin kemudian dipanaskan di atas penangas air untuk menghasilkan

ekstrak yang kental. Setelah diperoleh ekstrak kental daun tin dilakukan uji susut pengeringan serta uji skrining fitokimia.

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



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanol daun tin

5. Penetapan kadar air ekstrak

Kadar air ekstrak ditentukan dengan metode gravimetri. Ditimbang sejumlah 10 gram ekstrak dan dimasukkan ke dalam kurs porselin yang sebelumnya sudah ditara (Cahyanto, 2021). Ekstrak dimasukkan dalam oven bersuhu 105°C dalam waktu 5 jam. Selanjutnya keluarkan dan ditempatkan pada desikator. Penimbangan dan pengeringan dijalankan pada periode 1 jam sampai didapatkan bobot konstan dengan perbedaan tidak lebih dari 0,25% (FHI, 2017).

6. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun tin

6.1. Pemeriksaan flavonoid. Sebanyak 100mg ekstrak etanol 70% daun tin ditambahkan beberapa tetes HCl pekat yang kemudian ditambahkan sedikit serbuk Mg. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna merah dan orange dalam waktu 3 menit. Adanya flavonoid adalah akibat dari reduksi oleh asam klorida pekat dan magnesium yang diatndakan dengan adanya warna merah (Mustikasari dan Aryani, 2010).

6.2. Pemeriksaan saponin. Sampel sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 ml air panas. Biarkan dingin lalu kocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika busa setinggi 1-10 cm dan stabil selama minimal 10 menit dan busa tidak hilang ketika ditambahkan 1 tetes asam klorida 2N, hal ini menunjukkan adanya kandungan saponin. (Depkes RI, 1979).

6.3. Pemeriksaan tanin. Sampel ekstrak sebanyak 1 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi dengan 10 ml air panas dan dididihkan 5 menit, setelah itu filtrat ditambah FeCl_3 3 – 4 tetes. Apabila hasil berwarna hijau biru (hijau – hitam) menandakan adanya tannin katekol dan apabila hasil berwarna biru hitam menandakan adanya tannin pirogalol (Ergina *et al.*, 2014).

6.4. Pemeriksaan steroid. Ekstrak sebanyak 2 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dicampurkan dengan 2 ml etil asetat lalu dikocok. Pada plat tetes diteteskan lapisan etil asetat dan biarkan hingga kering. Setelah kering, tambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Jika hasil berwarna hijau menandakan adanya steroid (Ergina *et al.*, 2014).

6.5. Pemeriksaan terpenoid. Sampel ekstrak daun tin sebanyak 2 gram diambil lalu ditambahkan dengan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H_2SO_4 pekat. Apabila terbentuk warna merah atau ungu maka positif mengandung terpenoid (Ergina *et al.*, 2014).

6.6. Pemeriksaan alkaloid. Ekstrak sebanyak 2 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dicampurkan dengan 5 ml HCl 2 N lalu dipanaskan dan didinginkan lalu dibagi menjadi 3 bagian dengan takaran masing – masing 1 ml. Setiap tabung ditambahkan dengan masing pereaksi. Pada tabung yang ditambahkan pereaksi Mayer, jika terbentuk adanya endapan putih atau kuning maka terdeteksi adanya alkaloid. Pada tabung yang ditambahkan pereaksi Wagner akan terbentuk endapan coklat yang menandakan positif alkaloid. Pada penambahan pereaksi Dragendrof jika terbentuk endapan berwarna jingga maka akan menandakan adanya kandungan alkaloid pada ekstrak (Mustikasari dan Aryani, 2010).

6.7. Pemeriksaan triterpenoid. Uji senyawa triterpenoid dikerjakan dengan mengambil ekstrak sebanyak 2mL kemudian masukan dalam tabung reaksi lalu tambahkan 10 tetes asam asetat glasial lalu campurkan, 2 tetes asam sulfat pekat ditambahkan lalu dikocok. Hasil yang didapat warna merah atau ungu yang muncul maka dipastikan mengandung senyawa triterpenoid (Elsyana *et al.*, 2019).

7. Pembuatan larutan

7.1. Mucilago CMC-Na 0,5%. Cawan penguap ditaburi CMC-Na sebanyak 500 mg dan diberi 100 ml aquadest, kemudian diaduk sampai homogen.

7.4. Suspensi putih telur. Pembuatan putih telur 5% yaitu 0,5 ml putih telur dicampur dengan larutan NaCl fisiologis (NaCl 0,9%, b/v) sampai homogen dan di cukupnya sampai 30 mL.

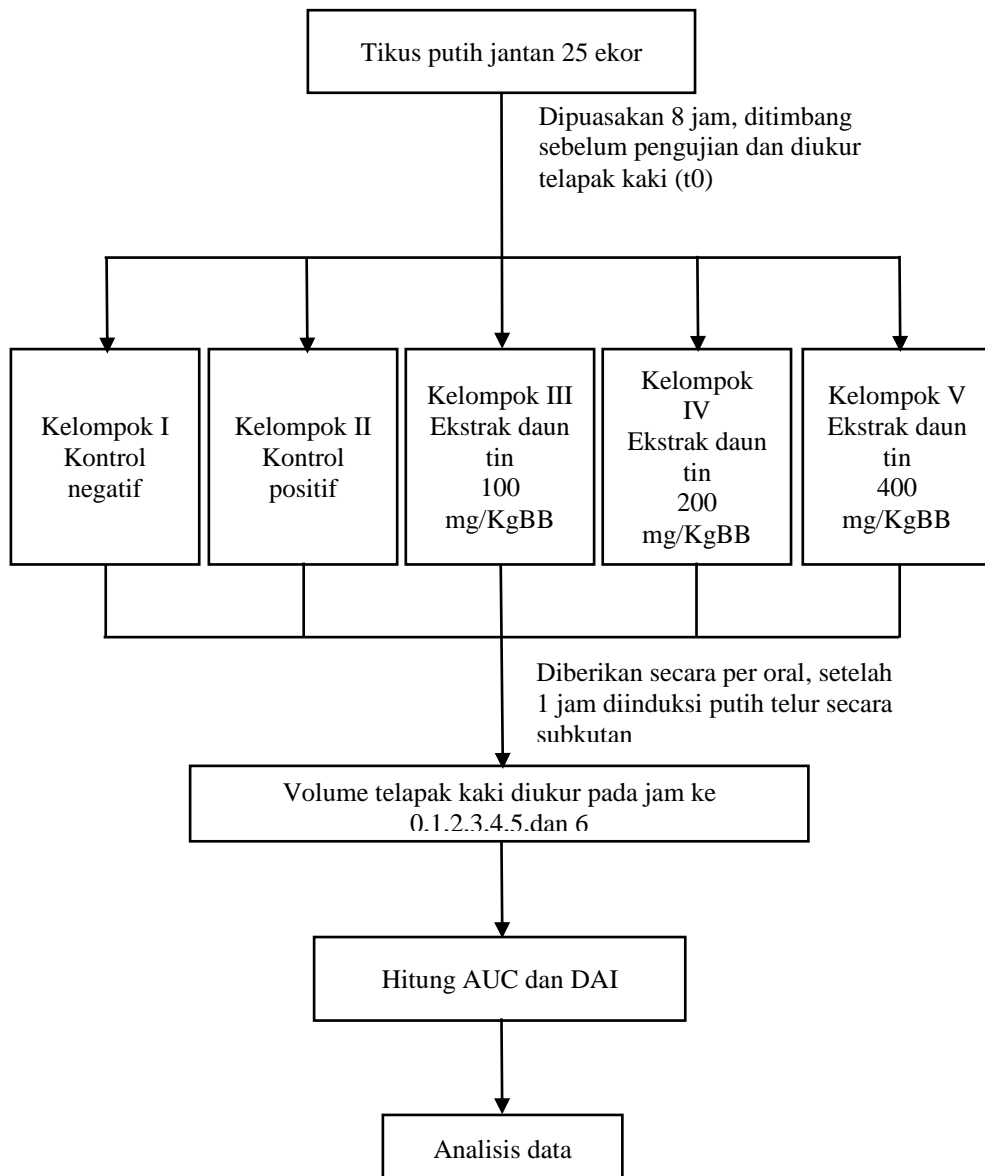
7.5. Pembuatan suspensi natrium diklofenak 4,5 mg/kgBB. Dosis Na-diklofenak untuk bobot tikus 200 g adalah 0,9 mg/200g BB tikus dimasukkan kedalam mortir yang sudah diisi dengan mocilago CMC-Na 0,5%, dihaluskan dengan ditambah air suling sampai volume mencapai 20 mL.

8. Uji antiinflamasi

Sebelum perlakuan tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 8 jam, tetapi tetap diberi air minum. Tikus ditimbang dan dikelompokkan secara acak dengan jumlah tikus perkelompok sebanyak 5 ekor tikus. Kaki kiri belakang pada tiap ekor tikus yang akan diinduksi diberi tanda pada mata kaki, kemudian diukur volumenya dengan memasukkan telapak kaki ke dalam raksa hingga mencapai batas tanda yang telah dibuat terlebih dahulu. Tikus diberikan perlakuan sesuai kelompok masing – masing.

- Kelompok 1 : 5 ekor tikus diberikan suspensi CMC-Na 0,5% sebagai kelompok kontrol negatif
- Kelompok 2 : 5 ekor tikus diberikan sediaan natrium diklofenak sebagai kelompok kontrol positif
- Kelompok 3 : 5 ekor tikus diberikan sediaan tunggal ekstrak daun tin dengan dosis 100 mg/kgBB sebagai kelompok hewan uji
- Kelompok 4 : 5 ekor tikus diberikan sediaan tunggal ekstrak daun tin dengan dosis 200 mg/kgBB sebagai kelompok hewan uji
- Kelompok 5 : 5 ekor tikus diberikan sediaan tunggal ekstrak daun tin dengan dosis 400 mg/kgBB sebagai kelompok hewan uji.

Setelah satu jam kemudian diinduksi secara subkutan larutan putih telur pada telapak kaki kiri belakang dengan volume 0,5 ml. Volume telapak kaki akan diukur tiap jam ke 0, 1, 2, 3, 4, 5, dan 6 jam setelah induksi, telapak kaki tikus dimasukkan ke dalam alat pletismometer sampai batas tanda. Hitung AUC dan DAI lalu analisis data. Alur uji antiinflamasi dapat dilihat pada bagan dibawah ini.



Gambar 4. Skema uji antiinflamasi induksi putih telur

9. Pemeriksaan hematologi tikus

Pengambilan sampel darah pada vena mata tikus masing-masing kontrol berjumlah 5 tikus sebanyak 1 - 5 ml. Dilakukan pengambilan darah pada 1 jam pertama dan 6 jam terakhir setelah diinduksi putih telur. Hasil sampel darah menggunakan *analyzer* dengan cara menempatkan darah pada tabung steril kemudian masukkan ke dalam batang alat dan tunggu beberapa saat untuk mengetahui hasilnya ditampilkan layar.

E. Analisis Data

Dihitung dengan menghitung volume edema.

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

Keterangan :

V_u : volume edema kaki tikus tiap waktu

V_t : volume edema kaki tikus setelah diradangkan dengan putih telur pada waktu (t)

V_o : volume edema kaki tikus sebelum diputih telur

Setelah didapatkan data volume edema, lalu dibuat kurva perbandingan volume edema versus waktu. Kemudian dihitung AUC (*Area Under the Curve*) yang merupakan luas area rata-rata dibawah kurva yang merupakan hubungan volume edema rata-rata tiap satuan waktu. Menggunakan rumus:

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

Keterangan :

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

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

Presentase daya antiinflamasi (penghambatan volume udem) dihitung berdasar pada harga AUC kontrol negatif dan harga AUC perlakuan pada tiap individu menggunakan rumus 3.

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

Keterangan :

% DAI = persen daya antiinflamasi

AUC_k = rata-rata kurva volume udem terhadap waktu untuk control negatif

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

Data AUC (*Area Under the Curve*) antara volume udem terhadap waktu dianalisis menggunakan uji Kolmogorov Smirnov untuk melihat apakah distribusi data tersebut normal atau tidak. Apabila didapatkan nilai signifikan $p > 0,05$ maka data tersebut terdistribusi normal, dan dapat dilanjutkan dengan uji homogenitas ONE WAY ANOVA dengan tarif kepercayaan 95%, kemudian dilakukan uji tukey untuk mengetahui adakah perbedaan bermakna. Analisis data pada penelitian ini menggunakan program SPSS.