

## **BAB III METODE PENELITIAN**

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

#### **1. Populasi**

Batang inggu (*Ruta graveolens* (L.) di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah merupakan populasi yang diambil pada penelitian ini.

#### **2. Sampel**

Penelitian ini menggunakan sampel berupa batang inggu (*Ruta graveolens* (L.), dipilih dalam keadaan bersih, bebas dari hama atau kotoran yang kemudian akan dibuat menjadi ekstrak etanol dari tanaman tersebut.

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi variabel utama**

Uji efektivitas antiinflamasi ekstrak etanol batang inggu (*Ruta graveolens* (L.) pada tikus putih jantan yang diinduksi karagenin merupakan variabel utama.

#### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel kendali termasuk dalam kategori variabel utama.

Variabel yang tidak direncanakan untuk dirubah dan diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung disebut variabel bebas. Contoh variabel tersebut antara lain variasi dosis ekstrak etanol batang inggu (*Ruta graveolens* (L.).

Variabel tergantung diakibatkan oleh variabel utama, dimana berpusat pada permasalahan yang termasuk dalam kriteria penelitian ini. Variabel tergantung tersebut yaitu selisih udem (bangkak) akibat inflamasi pada hewan uji sebelum dan setelah perlakuan.

Variabel terkendali merupakan variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung sehingga diperlukan kualifikasi yang bertujuan agar hasil pada penelitian ini tidak tersebar dan dapat dilakukan penelitian ulang yang dilakukan secara akurat oleh peneliti lain. Kondisi fisik hewan, seperti berat badan, usia, jenis kelamin, kondisi laboratorium, dan perawatan yang diberikan oleh peneliti, termasuk dalam variabel terkendali tersebut.

### 3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, bagian yang diambil dalam penelitian ini adalah simplisia batang tanaman inggu yang didapat dari petani di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, batang inggu (*Ruta graveolens* (L.) yang telah dikumpulkan kemudian dilakukan pencucian dengan air bersih lalu pengeringan dilakukan dengan oven pada suhu 50°C. Setelah kering, di sortasi kering dan dihaluskan dengan mesin gilling dan diayak dengan ayakan mesh no. 60.

Ketiga, ekstrak etanol batang inggu (*Ruta graveolens* (L.) hasil yang didapatkan dari serbuk batang inggu yang di larutkan dengan etanol 70 % dengan menggunakan metode maserasi dan dilanjutkan dengan remaserasi dan dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Keempat, etanol 70% adalah pelarut universal dapat menarik senyawa yang larut dalam pelarut non polar dan polar.

Kelima, maserasi adalah proses ekstraksi dengan merendam simplisia serbuk dengan pelarut dan dilakukan pengojogan pada suhu ruangan. Remaserasi dilakukan setelah didapatkan hasil penyaringan maserat dari maserasi dengan cara pengulangan ekstraksi dengan penambahan pelarut baru.

Keenam, penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih jantan jalur wistar yang memiliki berat badan 170-200 gram serta umur 2-3 bulan dalam keadaan sehat.

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

Kedelapan, aktivitas antiinflamasi adalah daya inflamasi terhadap udem yang terbentuk pada kaki tikus yang diinduksi karagenin.

Kedelapan, AUC adalah ukuran hasil cepat atau lambatnya metabolisme antiinflamasi di dalam tubuh hewan uji daya antiinflamasi.

## C. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Peralatan yang digunakan meliputi peralatan melakukan maserasi, kertas saring, kain flanel, sudip, *Beaker glass*, tabung reaksi, mesin penggiling, peralatan gelas, pipet tetes, penangas air, dan cawan penguap, ayakan mesh 60, neraca elektrik, kandang serta timbangan

untuk hewan uji, dan *rotary evaporator*. Alat untuk pengujian pada hewan uji yaitu jarum suntik untuk pemberian obat secara, plastimometer, pipa kapiler, *stopwatch*.

## 2. Bahan

**2.1 Bahan sampel.** Penelitian ini menggunakan batang inggu (*Ruta graveolens* (L.) sebagai sampel.

**2.2 Bahan kimia.** Penelitian ini menggunakan karagenin lambda ( $\lambda$ ) sebagai penginduksi inflamasi. Natrium diklofenak sebagai pembanding (kontrol positif), larutan fisiologis (NaCl 0,9%), CMC Na 0,5 % (kontrol negatif), aquadest, etanol 70%.

## 3. Hewan

Tikus putih jantan jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) digunakan dalam penelitian ini. Hewan uji tersebut dipilih sesuai dengan berat badan (BB) sekitar 150-200 gram dengan rentang usia tikus sekitar 2-3 bulan, tikus yang akan dipakai sebanyak 25 ekor tikus putih jantan dan dibagi menjadi 5 kelompok, dengan terdiri dari 5 ekor tikus tiap kelompok.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Determinasi tanaman

Determinasi sampel batang inggu (*Ruta graveolens* (L.) dilakukan di B2P2TOOT Tawangmangu. Tujuan dilakukan determinasi agar tanaman yang digunakan diketahui kebenarannya, meminimalisir terjadinya kesalahan selama proses pengumpulan bahan, dan terhindar dari campuran bahan lain lain yang kemungkinan memiliki kemiripan dengan cara mencocokkan ciri-ciri morfologi dengan pustaka yang ada.

### 2. Pengambilan dan pengolahan sampel

Sampel batang inggu (*Ruta graveolens* (L.) yang digunakan berasal dari petani di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Proses pencucian menggunakan air mengalir dan pengeringan sampel menggunakan oven.

### 3. Pembuatan serbuk batang inggu

Pencucian batang inggu (*Ruta graveolens* (L.) menggunakan air mengalir, setelah bersih batang inggu ditiriskan, kemudian dikeringkan menggunakan oven hingga batang kering, selanjutnya simplisia dilakukan sortasi kering untuk menghilangkan kotoran dan dipotong berukuran kecil kemudian dihaluskan dengan diglinding dengan *hammer* dijadikan serbuk lalu diayak dengan pengayak nomor *mesh* 60.

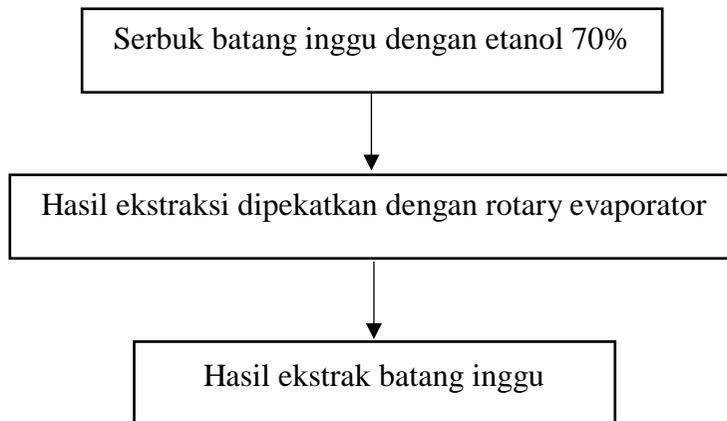
#### 4. Penetapan susut pengeringan

Pada tahap ini alat yang digunakan yaitu *moisture balance* untuk mempermudah proses penetapan susut kering agar sampel yang dihasilkan memiliki susut kering yang rendah untuk. Sampel selanjutnya dimasukan ke dalam cawan sebagai wadah pengering dan diberikan suhu 105°C selama beberapa menit hingga mencapai berat konstan. Tahap selanjutnya menimbang serbuk batang inggu pada cawan, masing-masing sebanyak 2 gram. Kemudian alat *moisture balance* dipasangkan untuk pengukuran susut kering, dan hasilnya dicatat. Syarat dari penetapan susut kering yang dilakukan terdapat serbuk simplisia yaitu <10%. Enzimatis yang terdapat di dalam sel tumbuhan, dan tidak mudah mengaktifkan organisme seperti bakteri, jamur, dan kapang (BPOM, 2014).

#### 5. Ekstraksi sampel

Maserasi digunakan sebagai metode dalam penelitian ini. Serbuk batang inggu (*Ruta graveolens* (L.) dibutuhkan sebanyak 600 gram, serbuk tersebut diletakkan di dalam wadah maserasi, selanjutnya etanol 70% sebanyak 6000 ml. Wadah maserasi ditutup dengan rapat dan ditinggalkan sekitar 2x24 jam sambil dilakukan pengadukan sekali-kali kemudian disaring. Etanol kemudian diuapkan serta dipekatkan sampelnya menggunakan *rotary evaporator*. Etanol dibebaskan pada hasil melalui pemberian 2 tetes air panas pada ekstrak kental. Ekstrak di simpan pada lemari es dengan suhu 8-10°C. Randemen yang didapat dihitung persenan dengan cara persentase bobot (b/b) antara randemen dengan bobot serbuk simplisia yang akan digunakan dengan penimbangan (Depkes RI, 2000).

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



Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanol batang inggu dengan metode maserasi.

## 6. Identifikasi zat berkhasiat

**6.1 Identifikasi flavonoid.** Metode yang digunakan adalah uji Sianidin/ Shinoda/ Shibata atau sering juga disebut uji Villstatter. Sebanyak 5 ml filtrat A dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan serbuk magnesium, asam hidroklorida pekat, dan amil alkohol. Campuran dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol. Jingga sampai merah untuk flavon, merah sampai merah tua flavonol, merah tua sampai magenta (merah keunguan) untuk flavanon (Farnsworth, 1966).

**6.2 Tanin.** Sebanyak 5 ml filtrat A dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan besi (III) klorida. Hasil positif fenolik ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau, violet, biru sampai hitam, sedangkan hasil positif tanin ditunjukkan dengan larutan menjadi biru kehitaman (tanin galat) atau hijau kehitaman (tanin katekol) (Farnsworth, 1966).

**6.3 Identifikasi alkaloid dengan pereaksi Mayer dan Dragendorff.** 500 mg serbuk simplisia, menambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, lalu mendinginkan dan menyaring. Memindahkan 3 tetes masing-masing pada 2 kaca arloji. Tambahkan 2 tetes Mayer pada kaca arloji pertama dan 2 tetes Bouchardat pada kaca arloji kedua. Hasil positif jika terdapat alkaloid adalah jika dengan Mayer terdapat endapan berwarna putih atau kuning larut dalam metanol dan Bouchardat terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam, maka kemungkinan terdapat alkaloid (Depkes RI, 1989)

**6.4 Identifikasi saponin.** Air panas sebanyak 10 ml diletakan dalam tabung reaksi untuk proses pendinginan, ditambahkan 0,5 gram serbuk simplisia dan digojok selama 10 detik. Timbulnya buih yang stabil selama  $\pm 10$  menit setinggi 1-10 cm menunjukkan reaksi yang positif. Jika ditambah HCl buih tidak hilang (Depkes RI, 1989).

## 7. Penentuan dosis

**7.1 Dosis natrium diklofenak.** Dosis yang diperlukan sebanyak 50 mg untuk manusia 70 kg, dosis lazim yang digunakan pada manusia 70 kg/ manusia dewasa tersebut kemudian dosis dikonversikan ke tikus. Faktor konversi 0,018 dari berat badan manusia dewasa 70 kg ke berat badan tikus 200 g adalah 50 mg dikali 0,018 = 0,9 mg/200 gram BB tikus.

**7.2 Dosis karagenin 1 %.** Dosis karagenin yang digunakan adalah 1% untuk menginduksi sebanyak 0,1 ml/ tiap tikus

**7.3 Dosis ekstrak etanol batang inggu.** Pemilihan dosis ekstrak etanol yaitu dengan menggunakan dosis 25 mg/KgBB, 50 mg/KgBB, dan 100 mg/KgBB. Landasan orientasi dosis menggunakan dosis acuan pada penelitian oleh Kusniawati *et al.*, (2023). Penelitian tersebut memerlukan dosis 100 mg/KgBB sudah memiliki efek antiinflamasi pada tikus putih.

**7.4 Dosis CMC-Na 0,5%.** Larutan CMC-Na 0,5% diberikan terhadap kelompok II sebagai kontrol negatif secara peroral.

## 8. Pembuatan larutan uji

**8.1 CMC Na 0,5%.** Larutan yang digunakan sebagai kontrol negatif disebut larutan Na 0,5%. Awalnya CMC Na 0,5% dibuat melalui penimbangan CMC-Na sebanyak 50 mg lalu memasukkan ke cawan porselin lalu menambahkan sedikit aquadest. Memanaskan CMC Na tersebut hingga mengembang, kemudian diletakkan ke dalam mortar lalu digerus sambil menambahkan aquadest secara perlahan hingga ad 100 ml, dan digerus sampai homogen.

**8.2 Larutan karagenin lambda ( $\lambda$ ) 1%.** Larutan karagenin diperoleh melalui beberapa tahap. Pertama, larutkan 40 mg karagenin dalam garam fisiologis (0,9) hingga 4 ml untuk mendapatkan larutan karagenin lambda ( $\lambda$ ) 1% (b/v). Larutan karagenin diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam sebelum injeksi (Bule, 2014). Jumlah yang akan disuntikkan adalah 0,1 ml di bawah telapak kaki tikus. Hal ini dapat menyebabkan edema yang terlihat jelas. (Falodun *et al.*, 2013).

**8.3 Suspensi natrium diklofenak.** Larutan stok ini dibuat dengan cara suspensi natrium diklofenak ke dalam CMC-Na. CMC-Na ditimbang sebanyak 500 mg selanjutnya dimasukkan ke dalam cawan penguap, ditambahkan ke dalam mortir sambil digerus hingga homogen. Menimbang 90 mg natrium diklofenak dimasukkan ke mortir yang berisi suspensi CMC-Na, digerus bersamaan dengan penambahan aquadest sampai volume 100 ml, hingga diperoleh konsentrasi 0,9 mg/ml.

**8.4 Pembuatan sediaan uji.** Menimbang CMC Na sebanyak 500 mg, selanjutnya cawan penguap yang berisi air panas dimasukkan CMC Na yang telah ditimbang, dan diaduk hingga mengembang. Menimbang 5 gram ekstrak kental dilarutkan ke dalam CMC lalu digerus sambil ditambahkan aquadest ad 100 ml hingga homogen.

## **9. Perlakuan hewan uji**

Tahap ini menggunakan hewan uji tikus yang telah dirawat dalam kandang dan diberikan pelet dan air *ad libitum* untuk kebutuhan pakannya. Hewan yang diperlukan sebanyak 25 ekor dengan umur 2-3 bulan, dan berat badan (BB) sekitar 150-200 gram. Aklimatisasi yang dilakukan pada hewan uji melalui beberapa tahap diantara yakni pada kondisi percobaan hewan uji dipelihara selama 7 hari bertujuan agar hewan uji mampu beradaptasi pada kondisi ini (percobaan) dan memonitor kesehatan hewan tersebut. Tahap selanjutnya diperlukan 5 kelompok hewan uji, setiap kelompok mendapatkan 5 ekor tikus dengan masing-masing diperlakukan berbeda-beda sebagai berikut :

Kelompok I : Kontrol negatif. diberikan CMC 0,5%.

Kelompok II : Kontrol pembanding diberikan natrium diklofenak 0,9 mg/ml.

Kelompok III : Kelompok perlakuan I membuat ekstrak batang inggu dengan dosis 25 mg/kg BB tikus.

Kelompok IV : Kelompok perlakuan II. Tikus diberikan ekstrak batang inggu dengan dosis 50 mg/kg BB tikus..

Kelompok V : Kelompok perlakuan III. Tikus diberikan ekstrak batang inggu dengan dosis 100 mg/kg BB tikus.

1 jam setelah penginduksi zat uji, kemudian diinduksi karagenin lambda ( $\lambda$ ) 1% dibagian telapak kaki kiri belakang dengan volume 0,1 ml. Volume telapak kaki diukur pada 0,5 jam, 1 jam, 2 jam, 3 jam, 4 jam, 5 jam, 6 jam dan 24 jam setelah diinduksi karagenin dengan cara memasukkan telapak kaki tikus ke dalam alat plestimometer hingga

tanda batas. Hitung volume edema sebelum dan sesudah diinduksi karagenin dengan rumus yaitu :

$$V_u = V_t - V_o$$

Keterangan :

- $V_u$  : volume edema kaki tikus tiap waktu (t)  
 $V_t$  : volume edema kaki tikus setelah diinduksi atau diradangkan k potodengan karagenin 1% pada waktu (t)  
 $V_o$  : volume edema kaki tikus sebelum diinduksi atau diradangkan dengan karagenin 1%

Data AUC (*Area Under Curve*) dan DAI (*Daya Antiinflamasi*) dapat dihitung menggunakan :

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

Keterangan :

$AUC_{\frac{t_n}{t_{n-1}}}$  : luas daerah dibawah kurva presentase radang terhadap waktu kelompok diperlakukan.

$V_{t_n}$  : volume edema (ml)

$t_n$  : waktu (jam)

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

Keterangan :

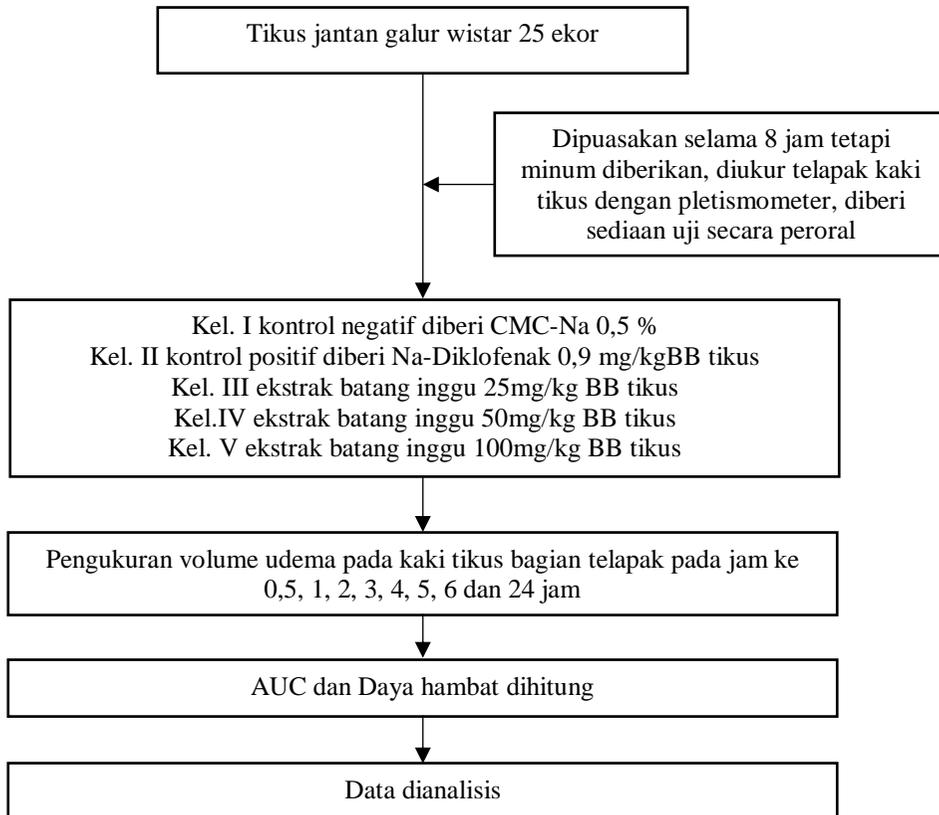
$AUC_k$  : AUC kurva volume edema rata-rata terhadap waktu untuk kontrol negatif

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

### E. Analisis Data

Data AUC dan daya antiinflamasi yang didapatkan pada penelitian ini selanjutnya akan dianalisis secara statistik untuk mengetahui distribusi data menggunakan uji *Shapiro wilk* dan menggunakan uji *Levene* untuk mengetahui homogenitas data. Data yang diketahui berdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) selanjutnya akan dianalisis menggunakan metode *ANOVA one way* dan uji LSD untuk mengetahui adanya perbedaan bermakna atau tidak. Salah satu syarat uji *ANOVA* jika tidak terpenuhi, akan dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui adanya perbedaan dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui adanya perbedaan di setiap kelompok perlakuan.

## F. Skema Penelitian



**Gambar 3. Skema penelitian.**