

BAB III METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental, dengan melakukan ekstraksi daun sambiloto, rimpang jahe merah dan batang brotowali kemudian dilakukan dengan pengujian aktivitas antiarthritis sehingga diperoleh hasil peningkatan berat badan tikus, penurunan jumlah leukosit, penurunan volume udem, perbaikan profil uji histopatologi yang dimana dihasilkan dari setelah penginduksian tikus dengan CFA.

B. Subjek dan Lokasi Penelitian

Subjek penelitian ini adalah tikus galur wistar yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan berkisar antara 120-200 gram, mempunyai aktivitas yang normal dan dalam kondisi sehat. Tikus diperoleh dari Fam Farm Tikus Putih Solo

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakogi Universitas Setia Budi, Surakarta

C. Populasi dan Sampel

Populasi adalah seluruh individu yang menjadi sumber sampel. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sambiloto, rimpang jahe merah dan batang brotowali yang diambil dari petani binaan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT) Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah.

Sampel mewakili populasi yang dijadikan sumber segala informasi yang diperlukan untuk menyelesaikan masalah penelitian. Oleh karena itu, sampel adalah bagian dari populasi. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sambiloto dengan rimpang jahe merah dan batang brotowali yang diperoleh bersih, kering dan tidak busuk.

D. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol tunggal dan kombinasi daun sambiloto, rimpang jahe merah dan batang brotowali yang diperoleh dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96 %

dengan pemberian secara oral dan topikal pada sediaan tunggal dan kombinasi. Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah peningkatan berat badan tikus. Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah penurunan jumlah leukosit pada tikus. Variabel utama keempat dalam penelitian ini adalah persentase penurunan volume udem pada kaki tikus. Variabel utama kelima dalam penelitian ini adalah perbaikan profil uji histopatologi persendian pada kaki tikus.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terdahulu dapat diklasifikasikan berdasar pola hubungan sebab akibat ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel kendali.

Variabel bebas merupakan variabel yang sengaja diubah-ubah untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol dalam sediaan tunggal dan kombinasi daun sambiloto, rimpang jahe merah dan batang brotowali dalam bentuk sediaan oral dan topikal yang di uji antiartritis.

Variabel tergantung merupakan titik pusat persoalan yang menjadi kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah peningkatan berat badan tikus, penurunan jumlah leukosit, persentase penurunan volume udem, dan profil histopatologi persendian pada kaki tikus setelah diinduksi pereaksi CFA.

Variabel kendali merupakan variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel bebas, sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kondisi laboratorium, kondisi fisik peneliti, induksi pereaksi CFA, alat ukur plethysmograph, bilik hitung *Neubauer chamber*, metode uji dan kondisi fisik dari hewan uji yang meliputi galur, jenis kelamin, usia, berat badan, lingkungan tempat hidup, dan pakan.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung selain variabel bebas yaitu kondisi pengukuran, laboratorium, dan kondisi fisik dari yang akan di uji seperti jenis kelamin, umur, lingkungan, pakan, suhu pada inkubasi dan lama perlakuan.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun sambiloto adalah daun dari tanaman sambiloto yang diambil dari petani binaan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT) Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah pada bulan September 2023.

Kedua, rimpang jahe merah adalah rimpang dari tanaman jahe merah yang diambil dari petani binaan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT) Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah, pada bulan September 2023.

Ketiga, batang brotowali adalah batang dari tanaman brotowali yang diambil dari petani binaan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT) Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah, pada bulan September 2023.

Keempat, serbuk daun sambiloto dengan rimpang jahe merah dan batang brotowali adalah serbuk yang diambil dalam keadaan bersih, kering, dan tidak busuk, kemudian dicuci dengan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel, setelah itu dikeringkan dalam lemari pengering bersuhu 40 °C, dihaluskan, dibuat serbuk dan diayak.

Kelima, ekstrak etanol daun sambiloto dengan rimpang jahe merah dan batang brotowali adalah ekstrak yang diperoleh dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% sehingga hasil maserasi yang telah dikentalkan menggunakan rotary evaporator.

Keenam, induksi pereaksi CFA adalah CFA yang diinjeksikan ke dalam kaki tiap tikus, kemudian diukur volume udem kaki tiap hewan dengan alat plethysmograph.

Ketujuh, antiarthritis adalah zat untuk mengurangi inflamasi pada penyakit arthritis dari kombinasi ekstrak etanol daun sambiloto dengan rimpang jahe merah dan batang brotowali dengan parameter berat badan, jumlah leukosit, persentase penurunan volume udem, dan profil histopatologi persendian pada tikus.

Kedelapan, efek anti arthritis tunggal ekstrak etanol daun sambiloto, rimpang jahe merah, batang brotowali, kombinasi ekstrak etanol daun sambiloto dengan rimpang jahe merah dan batang brotowali adalah efek yang akan dibuktikan dengan adanya peningkatan berat badan, penurunan jumlah sel darah putih, dan penurunan volume udem sendi kaki tikus dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Kesembilan, efek anti artritis tunggal ekstrak etanol daun sambiloto, rimpang jahe merah, batang brotowali, kombinasi ekstrak etanol daun sambiloto dengan rimpang jahe merah dan batang brotowali adalah efek artritis yang akan terlihat derajat histopatologi kaki tikus dengan teknik Hematoxylin Eosin (HE) melalui pengamatan mikroskop dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Kesepuluh, hewan coba yang digunakan adalah tikus wistar albino sehat. Tikus yang akan digunakan berumur 2 sampai 3 bulan, biasanya berbobot 180 sampai 200 g, ditempatkan dalam kandang dengan kondisi laboratorium standar (24 jam, suhu 25 ± 5 °C), dan dilepasliarkan sebagai tikus komersial. Makanan dan air akan disediakan sesuai kebutuhan.

E. Alat, Bahan dan Hewan Uji

1. Bahan

Bahan uji yang digunakan untuk penelitian ini adalah simplisia sambiloto dengan rimpang jahe merah dan brotowali yang disari dengan cara maserasi.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol, air, akuadest, pereaksi CFA, EDTA, reagen Hayem, formal saline 10%, larutan Von Ebner's, amonium oksalat 5%, alkohol 70%, alkohol 90%, alkohol 95%, alkohol 100%, xylol, parafin, canada balsem, hematoksilin dan eosin.

2. Alat

Peralatan produksi ekstrak etanol daun sambiloto dengan rimpang jahe merah dan batang brotowali adalah wadah maserasi yang berisi bahan yang akan dimaserasi, tutup wadah, pengaduk mekanis, wadah berisi hasil maserasi dan alat pengaduk. Alat yang digunakan untuk mengukur derajat edema tungkai pada tikus adalah plethysmometer. Alat untuk menghitung jumlah sel darah putih adalah Neubauer chamber. Alat pemeriksaan histopatologi antara lain pengaduk magnet, mikrotom, mikroskop, dan peralatan gelas. Peralatan lain yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang hewan coba, timbangan hewan coba, timbangan filter, lemari pengering, evaporator, ayakan no. 40, dan beberapa gelas.

3. Hewan Uji

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus wistar albino berumur 2 - 3 bulan dengan berat badan 100 - 200 g yang diperoleh dari Fam Farm Tikus Putih Solo, Jawa Tengah.

F. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi Uji Makroskopis Sambiloto, Jahe Merah dan Brotowali

Tahap awal dilakukan identifikasi tanaman sambiloto, jahe merah dan brotowali yang dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta. Uji makroskopis dan mikroskopis ini dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri sampel secara utuh dengan ciri-ciri tanaman sambiloto pada jurnal penelitian milik (Ischak & Botutihe, 2018). Pada pengujian makroskopis dan mikroskopis ini dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri sampel secara utuh dengan ciri-ciri tanaman jahe merah pada jurnal penelitian milik (Anindita, 2018). Untuk uji makroskopis dan mikroskopis ini dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri sampel secara utuh dengan ciri-ciri tanaman brotowali pada jurnal penelitian milik (Safitri, 2018).

2. Pembuatan Serbuk Daun Sambiloto, Rimpang Jahe Merah dan Batang Brotowali

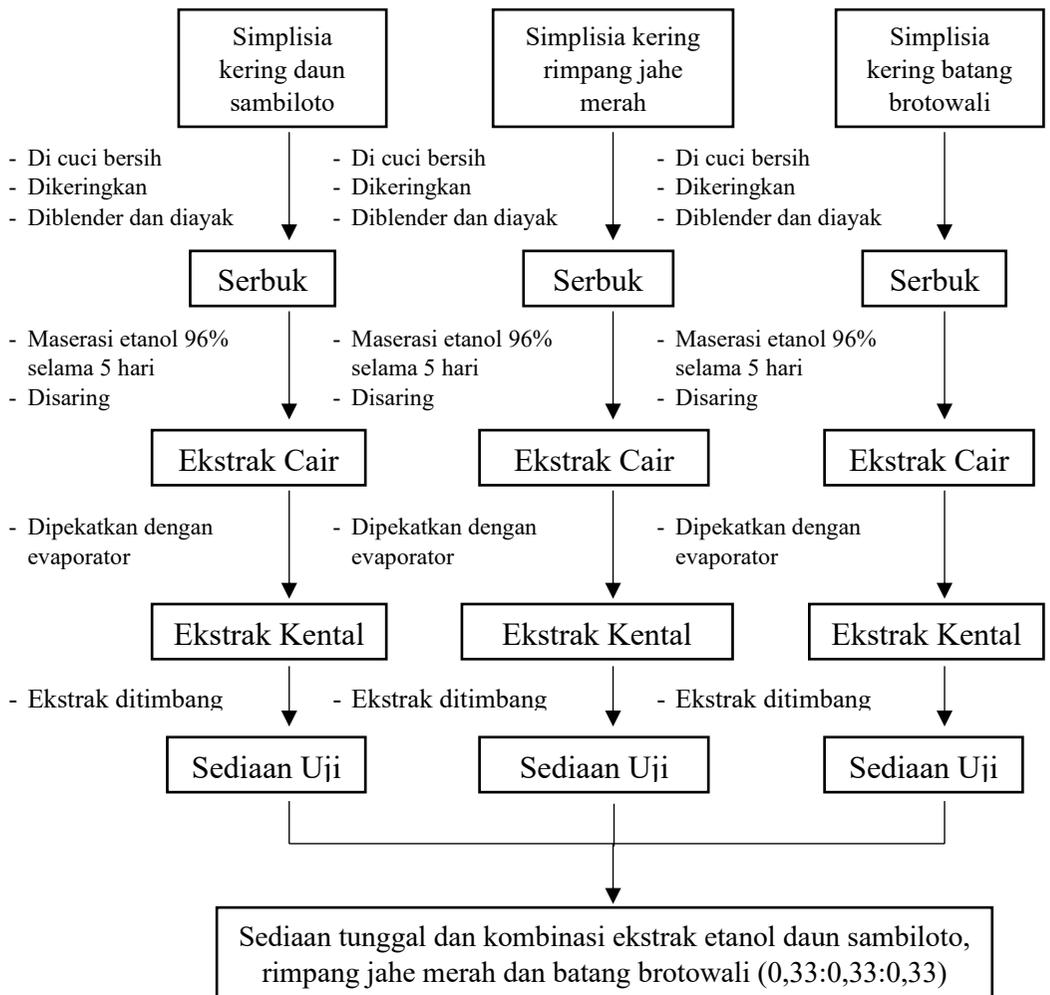
Daun sambiloto, rimpang jahe merah dan batang brotowali dikumpulkan dalam keadaan bersih, kering dan tidak busuk, kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa debu, kemudian dikeringkan pada suhu 40 °C dalam oven pengering, dihaluskan hingga menjadi bubuk dan disaring menggunakan ayakan nomor 40.

3. Penetapan Susut Pengeringan Serbuk Sambiloto, Rimpang Jahe Merah dan Brotowali

Ditimbang serbuk herba sambiloto dengan rimpang jahe merah dan batang brotowali masing-masing sebanyak 2 g, lalu dimasukkan ke dalam cawan yang ada pada alat moisture balance kemudian diukur kelembabannya saat alat tersebut menunjukkan hasil kadar dalam satuan persen.

4. Pembuatan Ekstrak Etanol Sambiloto, Jahe Merah dan Brotowali

Ekstrak etanol sambiloto dengan rimpang jahe merah dan brotowali dibuat dengan cara maserasi. Ekstrak sambiloto dengan rimpang jahe merah dan brotowali 10% b/v dibuat dengan cara menimbang 10 bagian serbuk sambiloto dengan jahe merah dan brotowali kemudian ditambah 75 bagian etanol, ditutup, dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya, sambil sering diaduk. Setelah 5 hari, campuran tersebut diserkai sarinya, ampas diperas dan ditambah dengan etanol secukupnya, lalu diaduk dan diserkai lagi sampai diperoleh sari sebanyak 100 bagian ekstrak etanol sambiloto dengan rimpang jahe merah dan brotowali. Ekstrak dipindahkan ke wadah kedap udara, diletakkan di tempat sejuk, terlindung dari cahaya selama 2 hari, kemudian disaring. Ekstrak kemudian diuapkan atau diuapkan pada tekanan rendah pada suhu di bawah 50 °C sampai konsentrasi yang diinginkan (Anief 1997). Prosedur pembuatan ekstrak etanol sambiloto rimpang jahe merah dan brotowali pada gambar 1.



Gambar 2. Prosedur Pembuatan Ekstrak Etanol Sambiloto, Jahe Merah dan Brotowali

5. Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia Ekstrak Sambiloto, Jahe Merah dan Brotowali

5.1. Identifikasi flavonoid. Identifikasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis, fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase geraknya n-butanol:asam asetat:air (4:1:5). Dideteksi di bawah sinar UV 254 nm berwarna gelap dan di bawah sinar UV 366 nm berwarna biru, kuning atau ungu. Pereaksi semprot yang digunakan uap amoniak dan sitro borat (Lakoan *et al.*, 2020).

5.2. Identifikasi glikosida. Identifikasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis, fase diam silika gel GF 254 nm dan fase geraknya benzene P-etanol 95% (7:3). Semprot kromatogram pertama dengan anisaldehyd-asam sulfat LP Amati dengan sinar UV 254 nm dan UV 366 nm. Muncul bercak biru menandakan adanya glikosida. Semprot kromatogram kedua dengan asam perklorat. Amati dengan sinar UV 254 nm dan UV 366 nm. Tidak adanya fluoresensi menandakan adanya glikosida (Lakoan *et al.*, 2020).

5.3. Identifikasi steroid. Uji ini menggunakan pereaksi Lieberma-Buchard. Untuk mengetahui adanya senyawa steroid maka dilakukan identifikasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis, fase diam silika gel GF 254 nm dan fase gerak dengan tiga sistem eluen yaitu eluen kloroform:n-Heksan (9:1), n- Heksan:etilasetat (7:3), kloroform:etilasetat (5:5). Dideteksi di bawah sinar UV 254 nm dan di bawah sinar UV 366 nm berwarna hijau (Lakoan *et al.*, 2020).

5.4. Identifikasi alkaloid. Identifikasi alkaloid dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis, fase diam silika gel GF 254 nm dan fase gerak campuran metanol-kloroform (0,5:9,5). Amati dibawah sinar UV 254 dan UV 366 dengan pereaksi Dragendorff untuk mendeteksi bercak coklat jingga yang menunjukkan adanya alkaloid (Lakoan *et al.*, 2020).

Tabel 1. Pengujian Senyawa Kimia dengan KLT pada Ekstrak Etanol Sambiloto, Jahe Merah dan Brotowali

Senyawa Kimia	Fase Diam	Fase Gerak	Warna Bercak
Alkaloid	Silika GF ₂₅₄	metanol-kloroform (0,5:9,5)	coklat jingga
Flavonoid	Silika GF ₂₅₄	n-butanol:asam asetat:air (4:1:5)	biru, kuning atau ungu
Steroid	Silika GF ₂₅₄	<ul style="list-style-type: none"> • kloroform:n-Heksan (9:1), • n- Heksan:etilasetat (7:3), • kloroform:etilasetat (5:5) 	hijau
Glikosida	Silika GF ₂₅₄	benzene P-etanol 95% (7:3)	biru

6. Penetapan Dosis

6.1. Dosis ekstrak sambiloto. Dosis ekstrak herba sambiloto yang ditetapkan pada tikus adalah 20 mg/200 g BB, berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh (Gupta *et al.*, 2018). Berdasarkan perhitungan matematis, dosis tersebut setara dengan 20 mg/200 g BB tikus sehingga setiap pembuatan larutan stok mengandung 1 g ekstrak herba sambiloto tiap 100 ml larutan. Hal ini didapat dari: dosis tanaman sambiloto pada tikus = 100 mg/kg BB = 100 mg/1000 g BB = 20 mg / 200 g BB tikus.

$$\text{Larutan stok} = 20 \text{ mg} / 2 \text{ ml} \times 100 \text{ ml} = 1,0 \text{ g}/100 \text{ ml}$$

6.2. Dosis ekstrak rimpang jahe merah. Menurut penelitian sebelumnya yang dilakukan Tukiran *et al.* (2023), dosis ekstrak rimpang jahe merah yang dianjurkan adalah 33 mg / 200 g berat badan pada tikus. Saat ini, jumlah larutan hewan yang diberikan kepada tikus bergantung pada berat badan masing-masing tikus. Cara pemberian ekstrak pada penelitian ini adalah secara oral dan volume larutan maksimal yang dapat diberikan pada tikus adalah 5,0 ml. Jadi, disini digunakan 2 ml larutan setiap kali pembuatan larutan stok, maka diperoleh 1,6 g ekstrak rimpang jahe merah per 100 ml larutan stok, yang setara dengan 33 mg per 200 g berat badan tikus. Hal ini didapat dari:

$$\text{Larutan stok} = 33 \text{ mg} / 2 \text{ ml} \times 100 \text{ ml} = 1,6 \text{ g}/100 \text{ ml}$$

6.3. Dosis ekstrak brotowali. Dosis ekstrak batang brotowali yang ditetapkan pada tikus adalah 40 mg/200 g BB, berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Lakoan *et al.* (2020). Berdasarkan perhitungan matematis, dosis tersebut setara dengan 40 mg/200 g BB tikus sehingga setiap pembuatan larutan stok mengandung 1 g ekstrak batang brotowali tiap 100 ml larutan. Hal ini didapat dari: dosis batang brotowali pada tikus = 200 mg/kg BB = 200 mg/1000 g BB = 40 mg / 200 g BB tikus.

$$\text{Larutan stok} = 40 \text{ mg} / 2 \text{ ml} \times 100 \text{ ml} = 2,0 \text{ g}/100 \text{ ml}$$

6.4. Dosis triamsinolon asetonid. Dosis triamsinolon asetonid dihitung berdasarkan faktor konversi sebesar 0,018. Dosis lazim triamsinolon asetonid pada manusia adalah 4 mg, sehingga jika diberikan ke tikus menjadi sebesar 0,072 mg/200 g BB (0,36 mg/kg BB) tikus (Lakoan *et al.*, 2020).

Tabel 2. Penetapan Dosis ke Tikus

Nama Bahan / Senyawa	Dosis	Pustaka
Ekstrak Sambiloto	20 mg / 200 g BB tikus	(Gupta <i>et al.</i> , 2018)
Ekstrak Jahe Merah	33 mg / 200 g BB tikus	(Tukiran <i>et al.</i> , 2023)
Ekstrak Brotowali	40 mg / 200 g BB tikus	(Lakoan <i>et al.</i> , 2020)
Triamsinolon Asetonid	0,072 mg / 200 g BB tikus	(Lakoan <i>et al.</i> , 2020)

7. Perlakuan Hewan Uji

Tikus yang digunakan adalah tikus wistar albino jantan, berumur 2-3 bulan, dengan berat badan 120-200 g. Tikus diisolasi selama 3 hari untuk menyesuaikan diri dengan kehidupan dan menghindari stres. Selama masa pengkondisian, tikus mendapat makanan dan air secara *ad libitum*. Tikus-tikus tersebut dibagi menjadi 13 kelompok besar. Yaitu ekstrak rimpang jahe merah tunggal dengan dosis efektif, ekstrak daun sambiloto tunggal dengan dosis efektif, ekstrak batang brotowali tunggal dengan dosis efektif, ekstrak daun sambiloto dengan ekstrak rimpang jahe merah kombinasi pertama dengan perbandingan dosis efektif 1:1, ekstrak daun sambiloto dan batang brotowali kombinasi kedua dengan perbandingan dosis efektif 1:1, ekstrak daun sambiloto dengan ekstrak rimpang jahe merah kombinasi ketiga dengan perbandingan dosis efektif 0,5:0,5 dengan ditambahkan pemberian topikal aloe vera, ekstrak daun sambiloto dengan ekstrak batang brotowali kombinasi keempat dengan perbandingan dosis efektif 0,5:0,5 dengan ditambahkan pemberian topikal aloe vera, ekstrak daun sambiloto dengan ekstrak rimpang jahe merah kombinasi kelima dengan perbandingan dosis efektif 0,5:0,5 dengan ditambahkan pemberian kombinasi topikal aloe vera, ekstrak sambiloto, ekstrak rimpang jahe merah, ekstrak daun sambiloto dengan ekstrak batang brotowali kombinasi keenam dengan perbandingan dosis efektif 0,5:0,5 dengan ditambahkan pemberian kombinasi topikal aloe vera, ekstrak sambiloto, ekstrak brotowali ekstrak daun sambiloto dengan ekstrak rimpang jahe merah dan ekstrak brotowali kombinasi ketujuh dengan perbandingan dosis efektif 0,33:0,33:0,33 dengan ditambahkan pemberian kombinasi topikal

aloe vera, ekstrak sambiloto, ekstrak rimpang jahe merah, ekstrak brotowali, kontrol negatif, kontrol positif, kontrol normal.

Tiap kelompok berjumlah 5 ekor. Perawatan berlangsung 14 hari. Tikus kontrol normal pemberian makan dan minum secara normal, tikus kontrol negatif diberi larutan CMC 1%, kelompok kontrol positif pertama diberi triamsinolon oral dan topikal 1 hingga 14 hari, dan kelompok kontrol kedua positif mendapat triamsinolon oral selama 1-14 hari. 1 hingga 14 hari. hari 1 sampai 14. Ekstrak tunggal rimpang jahe merah, ekstrak daun sambiloto tunggal, ekstrak tunggal batang brotowali, kombinasi pertama ekstrak daun sambiloto dan rimpang jahe merah, serta kombinasi kedua ekstrak daun sambiloto dan batang brotowali hingga kombinasi ketujuh diberikan dalam kelompok terorganisir selama 1 hingga 14 hari.

Tabel 3. Kelompok Perlakuan

Kelompok	Jumlah tikus	Perlakuan
I (kontrol normal)	5	-
II (kontrol negatif)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar) dan diberikan Na-CMC 1% (p.o)
III (kontrol positif p.o dan topikal)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), triamsinolon 0,072 mg/200 g BB (p.o) dan diberikan triamsinolon (topikal)
IV (sediaan uji 1)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), sambiloto 20 mg / 200 g BB (p.o) ditambahkan Na-CMC 1% (p.o)
V (sediaan uji 2)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), jahe merah 56 mg / 200 g BB (p.o) ditambahkan Na-CMC 1% (p.o)
VI (sediaan uji 3)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), brotowali 40 mg / 200 g BB (p.o) ditambahkan Na-CMC 1% (p.o)
VII (sediaan uji 4)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), dikombinasikan sambiloto 20 mg / 200 g BB (p.o) dan jahe merah 56 mg / 200 g BB (p.o) serta diberikan Na-CMC 1% (p.o)

Kelompok	Jumlah tikus	Perlakuan
VIII (sediaan uji 5)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), dikombinasikan sambiloto 20 mg / 200 g BB (p.o) dan brotowali 40 mg / 200 g BB (p.o) serta diberikan Na-CMC 1% (p.o)
IX (sediaan uji 6)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), kombinasi sambiloto 20 mg / 200 g BB (p.o), dengan jahe merah 56 mg / 200 g BB (p.o) perbandingan dosis (0,5 : 0,5) masing - masing ditambahkan Na-CMC 1% (p.o) dan topikal aloe vera
X (sediaan uji 7)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), kombinasi sambiloto 20 mg / 200 g BB (p.o), dengan brotowali 40 mg / 200 g BB (p.o) perbandingan dosis (0,5 : 0,5) masing - masing ditambahkan Na-CMC 1% (p.o) dan topikal aloe vera
XI (sediaan uji 8)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), kombinasi sambiloto 20 mg / 200 g BB (p.o dan topikal), dan jahe merah 56 mg / 200 g BB (p.o dan topikal) perbandingan dosis (0,5 : 0,5) masing - masing ditambahkan Na-CMC 1% (p.o)
XII (sediaan uji 9)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), kombinasi sambiloto 20 mg / 200 g BB (p.o dan topikal), dengan brotowali 40 mg / 200 g BB (p.o dan topikal) perbandingan dosis (0,5 : 0,5) masing - masing ditambahkan Na-CMC 1% (p.o)
XIII (sediaan uji 10)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), kombinasi sambiloto 20 mg / 200 g BB (p.o dan topikal), brotowali 40 mg / 200 g BB (p.o dan topikal) dengan brotowali 40 mg / 200 g BB (p.o dan topikal) perbandingan dosis (0,5 : 0,5)

Kelompok	Jumlah tikus	Perlakuan
		masing - masing ditambahkan Na-CMC 1% (p.o)

8. Pengujian Aktivitas Antiartritis Untuk Skrining Ekstrak

Tikus albino galur wistar dengan berat sekitar 180-200 gram digunakan untuk pengujian antiartritis. Hewan coba ditempatkan dalam kandang dengan kondisi laboratorium standar (24 jam suhu 25 °C). Hewan diberi pakan tikus yang dijual komersial dan air sesukanya. Hewan dikelompokkan atas 5 ekor tiap kelompok.

8.1. Uji aktivitas antiartritis diinduksi pereaksi CFA. Sejumlah 0,01 ml pereaksi CFA diinjeksikan pada permukaan plantar kaki belakang tikus kemudian diamati derajat pembengkakan yang terjadi. Jika telah terjadi udem pada kaki tikus tersebut dan belum diberi perlakuan ekstrak uji disebut sebagai hari ke-0 (Tuntreated) sedangkan pemberian ekstrak uji dilakukan pada hari ke-1 sampai hari ke-20 (Treated). Dari hari ke-0 hingga hari ke-20, berat badan tiap tikus ditimbang dan derajat pembengkakan kaki tiap tikus diukur dengan alat plethysmograph.

Hewan coba dibagi menjadi 20 kelompok yaitu kelompok kontrol normal, kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif peroral (triamsinolon 0,072 mg / 200 g BB tikus), kelompok kontrol positif topikal, kelompok kontrol positif kombinasi peroral dan topikal, kelompok uji peroral ekstrak etanol daun sambiloto (20 mg / 200 g BB tikus), kelompok uji peroral ekstrak etanol rimpang jahe merah (56 mg / 200 g BB tikus), kelompok uji peroral ekstrak etanol batang brotowali (40 mg / 200 g BB tikus), kelompok uji topikal ekstrak etanol daun sambiloto, kelompok uji topikal ekstrak etanol rimpang jahe merah, kelompok uji topikal ekstrak etanol batang brotowali, kelompok kombinasi uji peroral ekstrak etanol daun sambiloto dan rimpang jahe merah, kelompok kombinasi uji peroral ekstrak etanol daun sambiloto dan batang brotowali, kelompok kombinasi uji topikal ekstrak etanol daun sambiloto dan rimpang jahe merah, kelompok kombinasi uji topikal ekstrak etanol daun sambiloto dan batang brotowali, kelompok kombinasi uji peroral dan topikal ekstrak etanol daun sambiloto, kelompok kombinasi uji peroral dan topikal ekstrak etanol rimpang jahe merah, kelompok kombinasi uji peroral

dan topikal ekstrak etanol batang brotowali, kelompok kombinasi uji peroral dan topikal ekstrak etanol daun sambiloto dan rimpang jahe merah, kelompok kombinasi uji peroral dan topikal ekstrak etanol daun sambiloto dan batang brotowali. Ekstraksi eksperimental dilakukan pada kelompok ekstraksi tunggal dan gabungan dari hari ke-1 hingga hari ke-20. Ukuran kaki diukur dengan plethysmograph dari hari ke-0 hingga ke-20. Pada hari ke-25, hewan dibunuh dan sendi kaki yang bengkak dikumpulkan dan dilakukan pemeriksaan histopatologi.

8.2. Penggunaan alat plethysmograph. Prinsip kerja plethysmograph ini mengikuti hukum Archimedes. Pengukuran dilakukan dengan cara mencelupkan kaki tikus ke dalam tabung yang berisi larutan pengukur (air raksa) sampai batas tanda pada kaki, kemudian tekan pedal plethysmometer untuk mendapatkan volume yang konstan. Perubahan larutan akan terlihat pada garis volume alat plethysmograph (Khoirunnisa, 2016).

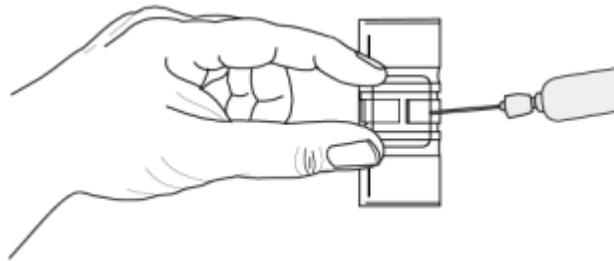
9. Estimasi Parameter Leukosit.

Percobaan ini dilakukan pada hari ke 25 dengan cara mengambil darah vena orbital posterior tikus kontrol, dimasukkan ke dalam tabung berisi EDTA (*ethylenediaminetetraacetate*) dan direaksikan dengan reagen Turk. Selanjutnya, jumlah leukosit total ditentukan dengan metode *Chesbrough and McArthur* menggunakan *Neubauer chamber*. Tahap-tahap proses prosedur sebagai berikut :

9.1. Pengisian Pipet Leukosit. Untuk cara pembuatannya adalah, alat dan bahan yang akan digunakan disiapkan di atas meja praktikum. Darah diisap dengan Pipet thoma leukosit hingga skala 0,5 tepat. Dihapus kelebihan darah yang melekat pada ujung pipet. Dimasukkan ujung Pipet dalam larutan Turk sambil menahan darah pada garis tanda tadi. Pipet dipegang dengan sudut 45 derajat dan larutan Turk diisap perlahan-lahan sampai garis tanda 11. Hati-hati jangan sampai terjadi gelembung udara. Diangkat Pipet (lati cairan. tutup ujung pipet dengan ujung jari lalu lepaskan karet pengisap. Pipet tersebut dikocok selama 15-30 detik. Jika tidak segera akan dihitung, diletakkan dalam sikap horizontal.

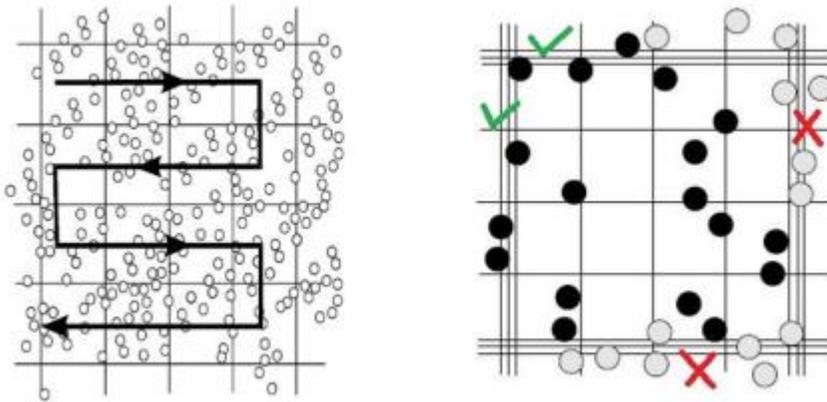
9.2. Pengisian Kamar Hitung. Untuk cara pembuatannya yaitu, Diletakkan kamar hitung yang bersih dengan kaca penutupnya terpasang mendatar di atas meja. Dikocok Pipet yang diisi tadi selama 3 menit terus menerus, dijaga jangan sampai ada cairan terbuang dari dalam Pipet itu selama

waktu mengocok. Dibuang semua cairan yang ada di dalam batang kapiler Pipet (3 atau 4 tetes) dan segera sentuh ujung pipet itu dengan sudut 30 derajat pada permukaan kamar hitung dengan menyinggung pinggir kaca penutup. Biarkan kamar hitung itu terisi cairan perlahan-lahan dengan daya kapilaritasnya. Biarkan kamar hitung itu selama 2 atau 3 menit supaya leukosit dapat dihitung. Jika tidak segera dihitung maka kamar hitung dapat diletakkan pada sebuah cawan petri tertutup yang berisi segumpal kapas basah



Gambar 3. Teknik Mengisi Kamar Hitung

9.3. Menghitung Jumlah Sel. Sebagaimana mestinya untuk cara perhitungannya yaitu, dipakai lensa objektif kecil, yaitu dengan pembesaran 10x. Turunkan lensa kondensor atau kecilkan diafragma. Meja mikroskop harus dalam posisi datar. Kamar hitung dengan bidang bergarisnya diletakkan di bawah obyektif dan fokus mikroskop diarahkan kepada garis bagi itu. Dengan sendirinya leukosit jelas terlihat. Hitunglah semua leukosit yang terdapat dalam keempat bidang besar pada sudut-sudut seluruh permukaan yang dibagi. Mulailah menghitung dari sudut kiri atas, terus ke kanan, kemudian turun ke bawah dan kanan ke kiri, lalu turun lagi ke bawah dan dimulai lagi dari kiri ke kanan. Cara seperti ini dilakukan pada keempat bidang besar. Kadang-kadang ada sel-sel yang letaknya menyinggung garis batas sesuatu bidang sel-sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri atau garis atas haruslah dihitung. Sebaiknya sel-sel yang menyinggung garis batas sebelah kanan atau bawah tidak boleh dihitung.



Gambar 4. Teknik Menghitung Sel Darah Putih (Leukosit)

Berikut rumus perhitungan jumlah leukosit :

$$\text{Jumlah Leukosit Total} = \frac{\text{Jumlah sel terhitung} \times \text{faktor dilusi}}{\text{Volume terhitung}}$$

$$\text{Faktor dilusi} = \frac{\text{Volume bohlam pipet Thoma}}{\text{Volume darah}}$$

10. Uji Histopatologi Persendian

Uji histopatologi terhadap persendian dilakukan pada hari ke-25 dengan tahapan sebagai berikut:

10.1. Fiksasi jaringan dengan formalin dalam PBS pH 7,4. Tahap fiksasi jaringan dengan formalin dalam PBS pH 7,4 dilakukan dengan prosedur sebagai berikut: 10 ml PBS pH 7,4 dimasukkan dalam gelas ukur 100 ml kemudian ditambahkan 10 ml formalin 37% dan akuades sampai 100 ml untuk membuat larutan fiksatif. Selanjutnya, larutan tersebut dimasukkan dalam gelas beaker 100 ml dan goyangkan hingga tercampur rata. Langkah berikutnya, jaringan hasil biopsi atau nekropsis diletakkan di atas paraffin wax dan diiris dengan silet (ketebalan maksimal 0,5 cm, lebar 1 cm, panjang 1 cm). Irisan jaringan tersebut lalu dimasukkan ke dalam botol kaca plastik dengan sendok berlubang dan ditambah larutan fiksatif dengan perbandingan 1:20. Setelah itu, diberi label (berupa kertas kecil yang ditulisi dengan pensil 2B) lalu dimasukkan ke dalam botol. Botol tersebut kemudian diletakkan di suhu ruang minimal selama 2 jam dan jaringan dapat diproses pada hari berikutnya.

Bila akan disimpan sebaiknya jaringan dalam fiksatif diletakkan pada suhu 4 °C.

10.2. Tahap dekalsifikasi dengan metode *von ebner's*. Proses dekalsifikasi adalah sebagai berikut: larutan *Von Ebner's* disiapkan dalam botol reagen tutup kaca transparan sebanyak 200 ml, lalu jaringan yang sudah difiksasi kimiawi dimasukkan dalam botol tersebut dan didiamkan selama 1 hari dalam suhu kamar. Pada hari berikutnya, dilakukan tes sempurna tidaknya dekalsifikasi dengan cara mengambil 5 ml larutan *Von Ebner's* (larutan perendam jaringan) ditambah 1 ml larutan amonium oksalat 5%, kemudian diamati ada tidaknya endapan putih. Kalau terjadi endapan putih berarti proses dekalsifikasi belum sempurna sehingga harus dilanjutkan.

Cara melanjutkan proses dekalsifikasi ini adalah dengan membuang larutan perendam jaringan, lalu ditambah larutan dekalsifikasi yang baru (stok) sebanyak 200 ml serta HCl pekat 1 ml. Kemudian dilakukan lagi pengecekan pada hari berikutnya untuk melihat ada tidaknya endapan yang terbentuk. Apabila masih terjadi endapan, proses dekalsifikasi dilanjutkan lagi hingga tidak terlihat endapan putih saat pengecekan. Setiap pergantian larutan stok dibutuhkan HCl pekat yang semakin lama semakin bertambah banyak (1 ml). Jika setelah pengecekan tidak terdapat endapan putih berarti proses dekalsifikasi telah sempurna.

Setelah dehidrasi sempurna, jaringan ditempatkan dalam larutan *Von Ebner's* segar yang ditambahkan sejumlah HCl sama dengan volume akhir HCl dan dibiarkan selama 24 jam. Setelah 24 jam, jaringan diambil dan dibungkus dengan kain kasa, dan bilas sisa larutan pembersih dengan air mengalir selama minimal 2 jam. Jaringan dicuci dengan air suling dan difiksasi dalam formalin PBS pH 7,4 selama 2 jam. Jika tidak segera diolah maka tisu disimpan pada suhu 4 °C sehingga tisu siap diproses hingga tahap pengeringan.

10.3. Tahap pembuatan blok parafin. Prosedur pada tahap pembuatan blok parafin adalah sebagai berikut: jaringan dalam botol yang berisi cairan fiksatif PBS formalin disiapkan dengan ketebalan maksimal 0,5 x 1 x 1 cm kemudian dilakukan proses dehidrasi.

Proses dehidrasi adalah sebagai berikut: cairan fiksatif dibuang ke dalam botol penampung namun jaringan dan label tetap dijaga berada di dalam pot dan tidak ikut terbang. Kemudian alkohol 30% sebanyak 30 ml (baru atau dari botol penampung alkohol 30% II yang telah digunakan sebelumnya) dimasukkan, pot ditutup dan ditunggu hingga 20 menit sambil digoyang

sesekali. Proses tersebut diulang sebanyak 3 kali, cairan pertama dibuang ke bak cuci sedangkan cairan kedua dan ketiga dimasukkan ke dalam botol penampung yang telah diberi label (alkohol 30% II dan alkohol 30% III). Proses ini diulangi untuk alkohol 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, dan alkohol absolut. Untuk proses dehidrasi terakhir (alkohol absolut III) digunakan alkohol absolut baru. Setelah itu dilanjutkan dengan proses *clearing*.

Proses *clearing* dilakukan dengan cara: jaringan dan label diambil dengan sendok berlubang dan dimasukkan dalam botol kaca bening berisi 100 ml campuran toluol alkohol (1:1) kemudian didiamkan selama 20 menit. Setelah itu jaringan dan label diambil lagi dengan sendok berlubang dan dikeringkan dengan kertas saring lalu dimasukkan ke dalam botol kaca bening berisi 100 ml toluol murni sampai transparan (\pm 60 menit). Selanjutnya dilakukan proses *embedding*.

Embedding dilakukan dengan cara sebagai berikut: jaringan dan label diambil dengan sendok berlubang dan dimasukkan ke dalam botol bening berisi campuran 50 ml toluol parafin jenuh selama semalam dalam suhu ruang. Kemudian dilakukan proses infiltrasi di dalam inkubator suhu 60 °C secara berturut-turut sebagai berikut: jaringan dan label diambil dengan sendok berlubang, lalu dimasukkan ke dalam botol bening berisi parafin cair I dan didiamkan selama 15 menit. Proses tersebut diulangi untuk parafin cair II, III, dan IV. Dalam hal ini, parafin dicairkan menggunakan ceret di dalam inkubator 60 °C.

Setelah proses *embedding* selesai, jaringan ditanam dalam cetakan atau kaset dengan cara menuangkan parafin cair ke dalam cetakan atau kaset dan jaringan diletakkan di dalamnya. Pada proses ini perlu diperhatikan orientasi jaringan agar sesuai dengan potongan yang direncanakan. Kemudian pada cetakan diberi label unik dengan kertas HVS atau label dituliskan pada kaset dengan spidol permanen, lalu data unik sampel dimasukkan ke dalam dokumen sampel. Setelah itu, cetakan atau kaset diletakkan di suhu ruang hingga beku dan membentuk blok, lalu disimpan pada suhu 4 °C.

10.4. Tahap deparafinasi dan rehidrasi. Prosedur pada tahap deparafinasi dan rehidrasi adalah sebagai berikut: larutan alkohol konsentrasi 70%, 80%, 90%, 95%, dan alkohol absolut disiapkan, kemudian slide yang akan diwarnai diatur dalam staining jaringan (maksimum 15 slide). Setelah itu dilakukan proses perendaman slide dalam larutan alkohol secara berturut-turut yaitu xylol I, xylol II (masing-masing selama 10 menit), alkohol 100% ke-1,

alkohol 100% ke-2 (masing-masing selama 5 menit), alkohol 95%, 90%, 80%, 70% (masing-masing selama 1 menit), dan terakhir dicuci dengan akuades. Setelah perendaman selesai, slide di sekeliling jaringan dibersihkan dari sisa parafin dengan kertas tissue, kemudian slide siap dibaca.

10.5. Tahap pewarnaan hematoksin-eosin. Proses - proses pewarnaan ini adalah sebagai berikut. Setelah menyiapkan slide (maksimal 15 slide) yang telah melalui proses deparafinisasi dan siap untuk pewarnaan jaringan, tambahkan 75 ml larutan hematoksin dan tunggu pewarnaan. 3-5 menit (waktu inkubasi dalam hal ini tergantung pada pengangkatan jaringan dan dosis). Setelah itu, larutan hematoksin dituangkan ke dalam botol penyimpanan dan dicuci tiga kali selama 1 menit dengan air suling (air sulingan dibuang setiap selesai pencucian). Setelah dicuci, tambahkan alkohol gosok ke kain bernoda dan biarkan selama 30 detik. Alkohol asam dituangkan ke dalam botol penyimpanan, dibilas dengan air mengalir selama 3 sampai 5 menit sambil difiksasi dalam hematoksin, dan kemudian dibilas lagi dengan air suling.

Larutan eosin 1% kemudian ditambahkan ke jaringan yang diwarnai dan dibiarkan selama 1 hingga 2 menit tergantung jenis jaringannya. Setelah itu, larutan eosin dituangkan ke dalam botol penyimpanan dan film dicuci tiga kali dengan air suling. Air kotor dibuang setelah setiap pencucian.

Setelah tahap pewarnaan selesai, dilakukan proses dehidrasi kemudian dilanjutkan dengan proses mounting, lalu hasil diamati di bawah mikroskop.

10.6. Tahap dehidrasi (sesudah pewarnaan). Prosedur pada tahap dehidrasi adalah sebagai berikut : disiapkan larutan alkohol konsentrasi 70%, 80%, 90%, 95%, alkohol absolut, xilol 1 dan xilol 2. Slide yang telah diwarnai disiapkan dalam staining jaringan (maksimum 15 slide). Setelah itu dilakukan proses perendaman slide dalam larutan alkohol mulai dari alkohol 70% selama kurang lebih 1 menit. Perendaman dilanjutkan dengan menggunakan alkohol 80%, 90%, 95%, 100%, xylol 1 hingga tahap terakhir yaitu xylol 2 menggunakan prosedur yang sama. Setelah dehidrasi, slide dibersihkan menggunakan kertas tissue hingga kering dan selanjutnya dilakukan proses mounting.

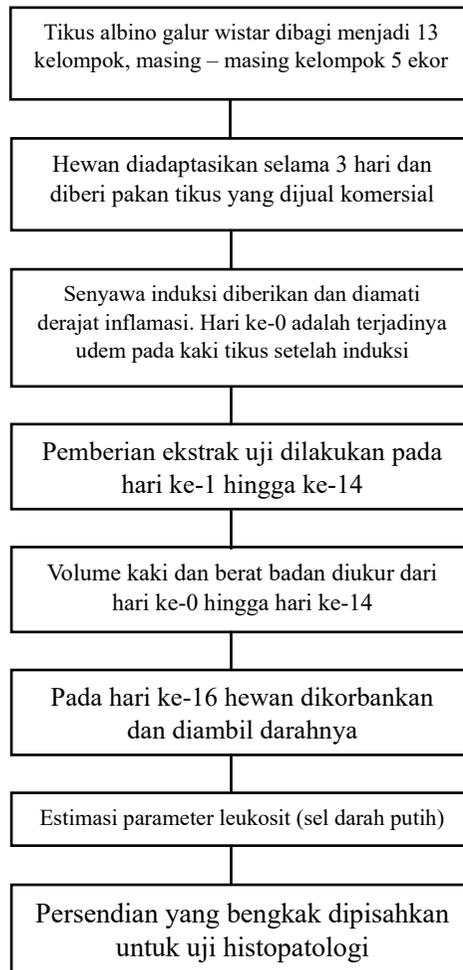
10.7. Proses mounting. Proses *mounting* dilakukan dengan tahap sebagai berikut: sediaan histologi dicuci dengan akuades 3 kali kemudian diberi perlakuan berturut-turut yaitu, didehidrasi dengan alkohol 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, dan 100% masing-masing selama 1 menit dan dilanjutkan

dengan xylol I, II, III, masing-masing selama 3 menit. Kemudian sediaan ditutup dengan canada balsem dan ditutup lagi segera dengan gelas penutup sesuai besarnya sediaan.

10.8. Tahap pembacaan sampel. Langkah ini merupakan bagian terakhir dari pemeriksaan histopatologi jaringan sendi. Tujuannya adalah untuk mengamati area kerusakan jaringan yang diinginkan dan menggambarkan parameter perubahan histologis pada jaringan ikat sebagai persiapan pengujian, termasuk masuknya sel inflamasi, hiperplasia sinovial, akumulasi sel monomorfonuklear dan polimorfonuklear di intraartikular.

G. Analisa Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini dipilih berdasarkan data yang diperoleh. Uji distribusi normal (Kolmogorov-Smirnov) digunakan untuk memeriksa apakah data distribusi normal. Apabila data tidak berdistribusi normal ($p < 0,05$), dilanjutkan dengan uji non parametrik. Jika data berdistribusi normal ($p > 0,05$), dilanjutkan dengan uji parametrik (ANOVA). Dilanjutkan tes Post Hoc dilakukan untuk mengetahui apakah ada perbedaan antara masing-masing kelompok perlakuan.



Gambar 5. Skema Prosedur Uji Antiartiris

Kelompok terdiri dari :

1. kelompok kontrol normal,
2. kelompok kontrol negatif,
3. kelompok kontrol positif kombinasi peroral (triamsinolon 0,072 mg / 200 g BB tikus), dan topikal (triamsinolon gel 0,1 g / 100 ml kg BB Manusia),
4. kelompok uji peroral ekstrak etanol daun sambiloto (20 mg / 200 g BB tikus),
5. kelompok uji peroral ekstrak etanol rimpang jahe merah (33 mg / 200 g BB tikus),
6. kelompok uji peroral ekstrak etanol batang brotowali (40 mg / 200 g BB tikus),
7. kelompok kombinasi uji peroral ekstrak etanol daun sambiloto dan rimpang jahe merah,
8. kelompok kombinasi uji peroral ekstrak etanol daun sambiloto dan batang brotowali,

9. kelompok kombinasi uji peroral ekstrak etanol daun sambiloto : rimpang jahe merah (0,5 : 0,5) dan topikal lidah buaya,
10. kelompok kombinasi uji peroral ekstrak etanol daun sambiloto : batang brotowali (0,5 : 0,5) dan topikal lidah buaya,
11. kelompok kombinasi uji peroral dan topikal ekstrak etanol daun sambiloto : rimpang jahe merah (0,5 : 0,5),
12. kelompok kombinasi uji peroral dan topikal ekstrak etanol daun sambiloto : batang brotowali (0,5 : 0,5),
13. kelompok kombinasi uji peroral dan topikal ekstrak etanol daun sambiloto : rimpang jahe merah : batang brotowali (0,33 : 0,33 : 0,33).