

BAB III METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Aktivitas antiartritis ekstrak batang brotowali, tanaman anting-anting, dan akar alang-alang telah diteliti secara eksperimental. Setelah induksi CFA, profil uji histopatologi tikus membaik, berat badan meningkat, dan jumlah leukosit serta volume edema menurun.

B. Subjek dan Lokasi Penelitian

Tikus Wistar yang digunakan pada penelitian ini ialah tikus sehat berusia dua hingga tiga bulan dengan berat 100 hingga 200 gram. Tikus tersebut berasal dari peternakan Fam Farm Tikus Putih solo.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

C. Populasi dan Sampel

Semua yang menjadi sumber sampel merupakan populasi. Petani di Kecamatan Tawang Mangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah memberikan batang brotowali, daun anting-anting, dan akar alang-alang yang digunakan dalam penelitian ini. Dalam melakukan penelitian, perlu untuk mengumpulkan data dari sampel yang mewakili masyarakat luas. Dengan demikian, sampel tersebut mewakili sebagian dari populasi. Batang brotowali beserta daun anting-anting dan akar alang-alang yang dikumpulkan pada bulan September 2023, dalam keadaan bersih, kering, dan tidak busuk, digunakan sebagai sampel pada penelitian ini.

D. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol dari empat tanaman: brotowali, tanaman anting-anting, dan akar alang-alang. Batang dan tanaman anting-anting dimaserasi dengan pelarut etanol 96%, sedangkan akar dimaserasi dengan pelarut etanol 70%. Ekstrak ini diberikan secara oral dan topikal dalam sediaan tunggal atau kombinasi. Pertambahan berat badan tikus berfungsi sebagai variabel utama kedua dalam penyelidikan ini. Penurunan

jumlah sel darah putih pada tikus berfungsi sebagai variabel utama ketiga dalam penyelidikan ini. Persentase penurunan volume edema di kaki tikus berfungsi sebagai variabel utama keempat dalam penyelidikan ini. Sedangkan untuk variabel utama kelima, adalah peningkatan profil uji histopatologi sendi kaki tikus.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel Utama, Berdasarkan sifat interaksi sebab akibat, variabel dapat dibagi menjadi tiga jenis variabel: bebas, tergantung dan kendali.

Variabel Bebas, Untuk mempelajari bagaimana satu variabel mempengaruhi variabel lain, peneliti sering menggunakan variabel independen, yaitu variabel yang diubah secara sengaja. Efek antiarthritis dari ekstrak etanol dari tiga tanaman—batang Brotowali, tanaman Anting-anting, dan akar Alang-alang—berfungsi sebagai variabel independen dalam penelitian ini.

Variabel Tergantung, Fokus utama masalah dan kriteria penelitian adalah variabel tergantung. Di sini, profil histologis pembengkakan sendi yang diinduksi CFA di kaki tikus, persentase pengurangan volume edema, peningkatan berat badan tikus, dan penurunan jumlah leukosit adalah variabel tergantung

Variabel Kendali, Penting untuk menetralkan atau mengidentifikasi kualifikasi variabel kontrol, yang merupakan faktor yang dianggap memiliki dampak di luar variabel yang independen, sehingga hasil yang diperoleh tidak menyebar dan dapat direplikasi dengan baik oleh peneliti masa depan. Penting untuk menetralkan atau mengidentifikasi kualifikasi variabel kendali, yang merupakan faktor yang dianggap memiliki dampak selain variabel yang bebas, sehingga hasil yang diperoleh tidak menyebar dan dapat direplikasi dengan baik oleh peneliti masa depan. Variabel kontrol penelitian mencakup hal-hal seperti berikut: kondisi fisik laboratorium; kondisi fisik peneliti; induksi reagen CFA; bilik hitung *Neubauer*; alat ukur *plethismograph*; metode pengujian; dan spesies, usia, berat, kondisi hidup, pakan, dan strain hewan uji.

Faktor-faktor seperti jenis kelamin, usia, lingkungan, pakan, suhu inkubasi, dan lama perawatan subjek uji adalah contoh variabel terkendali, Variabel bebas mencakup hal-hal seperti keadaan pengukuran, laboratorium, dan kondisi fisik subjek.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Sebagai permulaan, pada bulan September 2023, batang brotowali dipanen dari tanaman brotowali di Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah.

Bagian kedua kalimat tersebut adalah bahwa herba anting-anting tersebut sebenarnya adalah herba tanaman tersebut, yang dipanen pada bulan September 2023 dari Kecamatan Tawangmangu di Kabupaten Karanganyar di Provinsi Jawa Tengah.

Ketiga, pada bulan September 2023, dilakukan pengumpulan akar tanaman alang-alang dari Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah.

Langkah keempat, yaitu mengambil batang brotowali, herba anting-anting, dan akar alang-alang yang kering, bersih, dan tidak busuk; mencucinya memakai air mengalir untuk membuang kotoran yang ada; mengeringkannya dalam lemari pengering pada suhu 40 °C; menggilingnya sampai menjadi serbuk; dan terakhir, menyaringnya dengan ayakan 40 mesh.

Kelima, dilakukan penguapan putar untuk mengentalkan hasil maserasi ekstrak etanol batang brotowali dengan tanaman anting-anting dan akar alang-alang yang telah dihasilkan melalui maserasi dengan pelarut etanol 96%.

Keenam, *plethismograph* digunakan untuk mengukur jumlah edema pada kaki setiap tikus setelah induksi reagen CFA, yang melibatkan penyuntikan CFA ke kaki setiap tikus.

Ketujuh, antiartritis adalah senyawa yang mengurangi peradangan pada artritis. Senyawa ini terbuat dari campuran ekstrak etanol batang brotowali, tanaman anti-anting, dan akar alang-alang. Dalam penelitian terhadap tikus, senyawa tersebut dievaluasi berdasarkan berat badan, jumlah leukosit, persentase pengurangan volume edema, dan histopatologi sendi mikroskopis.

Kedelapan, berbeda dengan kelompok kontrol positif, tikus yang diberi ekstrak etanol batang brotowali, tanaman anting-anting, dan akar alang-alang menunjukkan efek antirematik tunggal, yang didukung oleh penambahan berat badan, pengurangan jumlah sel darah putih, dan pengurangan volume edema pada sendi kaki mereka.

Pada posisi kesembilan, disandingkan dengan kelompok kontrol positif, kelompok berikut memperlihatkan efek antirematik yang lebih kuat: ekstrak etanol batang brotowali, herba anting-anting, dan akar alang-alang;

campuran ketiga ekstrak ini; dan derajat histopatologi tampak pada kaki tikus yang diperiksa menggunakan teknik *Hematoxylin Eosin* (HE).

Terakhir, tikus Wistar albino digunakan sebagai hewan percobaan. Hewan pengerat yang dimaksud adalah tikus komersial yang berusia 2 hingga 3 bulan, dengan berat badan rata-rata 180 hingga 200 g, yang dipelihara dalam kandang dengan pengaturan laboratorium konvensional (24 jam, suhu 25 ± 5 °C), dan kemudian dilepaskan. Sesuai kebutuhan, kami akan menyediakan makanan dan minuman.

E. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi Uji Makroskopis Tanaman Brotowali, Anting – Anting dan Alang - Alang

Tahap awal dalam penelitian ini adalah konfirmasi keaslian bahan dengan mengidentifikasi tanaman sebagai *Tinospora crisa* dan kemudian melakukan uji makroskopis terhadap morfologi dan karakteristik organoleptiknya. Tanaman lain yang termasuk dalam penelitian ini adalah Anting-anting dan Alang-alang. Untuk melakukan identifikasi dan pengujian makroskopis ini, kami membandingkan fitur seluruh sampel dengan fitur tanaman yang dijelaskan dalam artikel ilmiah (Lakoan *et al.*, 2020).

2. Pembuatan Serbuk Batang Brotowali, Tanaman Anting – Anting dan Akar Alang - Alang

Akar alang-alang, daun anting-anting, dan batang brotowali dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan debu yang menempel setelah diperoleh dalam keadaan kering, bersih, dan tidak rusak. Tahapan selanjutnya adalah pengeringan dalam oven pengering yang diatur pada suhu 40 derajat Celcius, penggilingan hingga halus, dan penyaringan melalui saringan nomor 40.

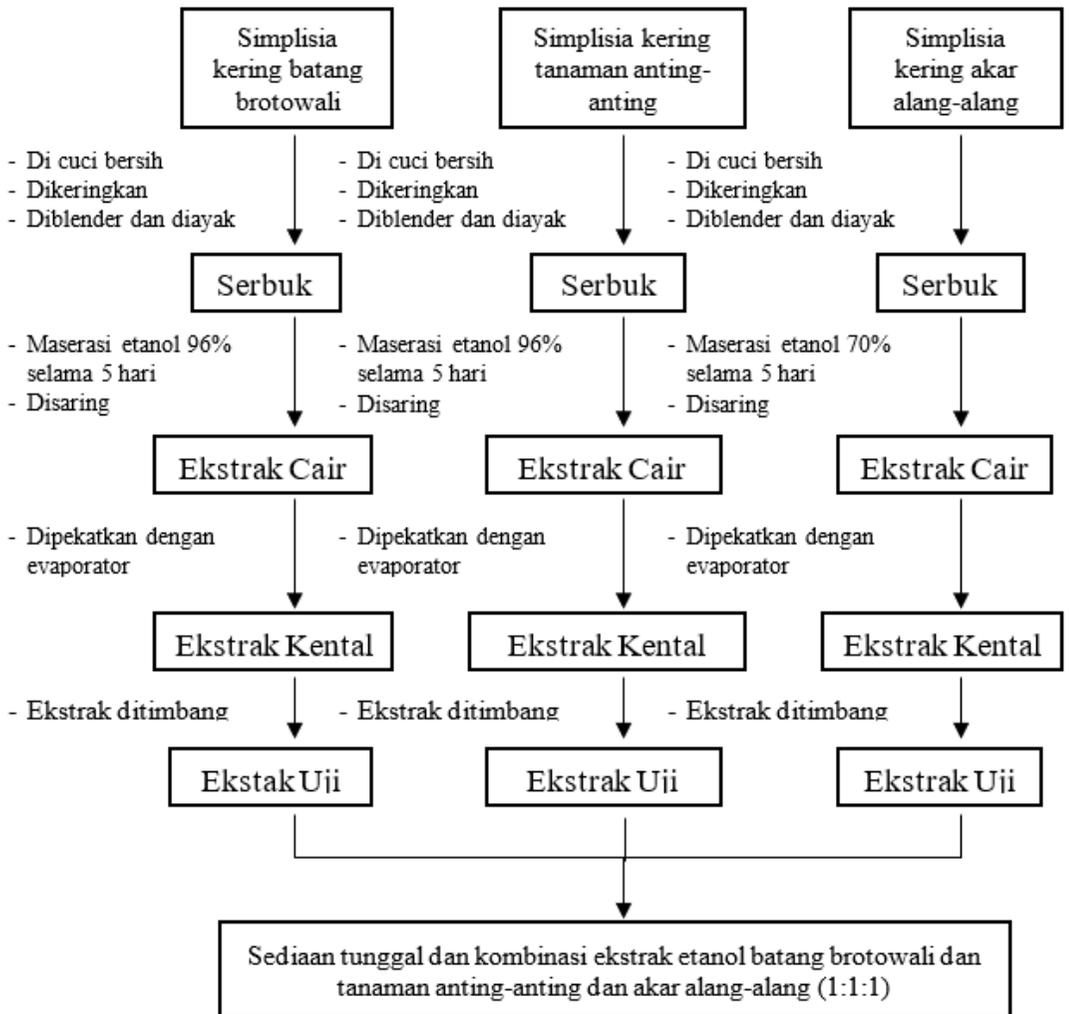
3. Penetapan Susut Pengeringan Serbuk Batang Brotowali, Tanaman Anting – Anting dan Akar Alang - Alang

Untuk menguji kelembapan, ukurlah 2 gram serbuk batang brotowali, herba Anting-anting, dan akar alang-alang untuk masing-masing tanaman.

Masukkan jumlah yang diukur ke dalam wadah alat penyeimbang kelembapan dan catat hasilnya dalam satuan persen.

4. Pembuatan Ekstrak Etanol Batang Brotowali, Tanaman Anting – Anting dan Akar Alang - Alang

Maserasi digunakan untuk menghasilkan ekstrak etanol dari brotowali, anting-anting, dan alang-alang. Campurkan 10 bagian serbuk brotowali dengan 10 bagian anting-anting dan 10 bagian alang-alang untuk mendapatkan ekstrak 10% b/v. Tambahkan 75 bagian etanol, ditutup, dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya, sambil sering diaduk. Setelah 5 hari, campuran tersebut diserakai sarinya, ampas diperas dan ditambah dengan etanol secukupnya, lalu diaduk dan diserakai lagi sampai diperoleh sari sebanyak 100 bagian ekstrak etanol brotowali dengan anting-anting dan alang-alang. Setelah ekstraksi, cairan disaring dan disimpan pada tempat yang bersuhu rendah dan gelap selama dua hari sebelum disaring. Untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan, ekstrak dipanaskan hingga suhu di bawah 50 oC atau diuapkan di bawah tekanan rendah (Anief 1997). Gambar 1 menunjukkan langkah-langkah untuk membuat ekstrak etanol dari alang-alang, *Tinospora crispa*, dan anting-anting.



Gambar 2. Prosedur Pembuatan Ekstrak Etanol Brotowali dengan Anting-Anting dan Alang-Alang

5. Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia Ekstrak Brotowali, Anting – Anting dan Alang - Alang

5.1. Identifikasi flavonoid. Dengan memakai fase gerak n-butanol:asam asetat:air (4:1:5) dan fase diam silika gel GF 254, kami dapat mengidentifikasi sampel secara positif. Berwarna gelap saat dideteksi oleh sinar UV 254 nm dan beragam corak biru, kuning, dan ungu saat dideteksi oleh sinar UV 366 nm. Uap amonia dan sitrat borat merupakan bahan kimia yang disemprotkan (Lakoan *et al.*, 2020).

5.2. Identifikasi glikosida. Benzene P-etanol 95% (7:3) dipakai untuk fase gerak dan silika gel GF sebagai fase diam dalam kromatografi lapis tipis untuk identifikasi pada 254 nm. Oleskan anisaldehida-asam sulfat LP ke kromatogram pertama. Awasi benda-benda yang mengandung sinar UV pada 254 nm dan 366 nm. Bila bintik-bintik biru muncul, berarti glikosida hadir. Asam perklorat harus disemprotkan pada kromatogram kedua. Awasi benda-benda yang mengandung sinar UV pada 254 nm dan 366 nm. Glikosida hadir bahkan saat tidak ada fluoresensi yang terlihat (Lakoan *et al.*, 2020).

5.3. Identifikasi steroid. Reagen yang dikenal sebagai Liebermann-Buchard digunakan dalam pengujian ini. “Dengan menggunakan kromatografi lapis tipis, kami mengidentifikasi senyawa steroid dengan menggabungkan fase stasioner silika gel GF 254 nm dengan fase gerak yang mengandung tiga sistem eluen berbeda: eluen kloroform: n-Heksana (9:1), n-Heksana: etil asetat (7:3), dan kloroform: etil asetat (5:5). Terlihat berwarna hijau saat terpapar sinar ultraviolet 254 nm dan 366 nm, masing-masing” (Lakoan *et al.*, 2020).

5.4. Identifikasi alkaloid. “Kromatografi lapis tebal digunakan untuk identifikasi alkaloid menggunakan fase stasioner silika gel GF 254 nm dan fase gerak kombinasi metanol-kloroform (0,5:9,5). Alkaloid dapat dideteksi dengan melihat bercak jingga-coklat saat dilihat di bawah sinar UV 254 dan UV 366 menggunakan reagen Dragendorff” (Lakoan *et al.*, 2020).

Tabel 1. Pengujian Senyawa Kimia dengan KLT pada Ekstrak Ekstrak Brotowali, Anting-anting dan Alang-alang.

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 batang brotowali. Menurut penelitian terdahulu, dosis anjuran ekstrak batang brotowali untuk mencit adalah 200 mg/kg berat badan (Lakoan et al., 2020). Menurut kalkulasi, dosis ini sama dengan 40 mg/200 g BB mencit. Jadi, untuk setiap 100 ml larutan induk, terdapat 2 g ekstrak batang brotowali. Hal ini berasal dari: dosis batang brotowali di tikus = 200 mg/kg BB = 200 mg/1000 g BB = 40 mg / 200 g BB tikus.

“Larutan stok = 40 mg / 2 ml x 100 ml = 2,0 g/100 ml”

6.2. Dosis ekstrak herba anting-anting. Penelitian terdahulu oleh (Supriatna dkk., 2022) menetapkan dosis 400 mg/kg BB ekstrak anting-anting daun untuk mencit. Setiap 100 ml sediaan larutan induk mengandung 2,8 g ekstrak akar alang-alang, yang secara matematis setara dengan 80 mg/200 g BB mencit. Dosis akar alang-alang yang dihitung untuk mencit adalah 80 mg/200 g BB, berdasarkan rumus berikut: 400 mg/kg BB = 80 mg/1000 g BB.

“Larutan stok = 80 mg / 2 ml x 100 ml = 4 g/100 ml”

6.3. Dosis ekstrak akar alang-alang. Penelitian terdahulu telah menunjukkan bahwa 280 mg/kg BB ekstrak akar alang-alang merupakan dosis yang efektif untuk tikus (Klau et al., 2014). Setiap 100 ml sediaan larutan induk

mengandung 2,8 g ekstrak akar alang-alang, yang setara dengan 56 mg/200 g BB tikus menurut perhitungan matematis. Berikut ini data yang kami butuhkan: 280 miligram per kilogram berat badan (280 mg/kg BB) akar alang-alang yang diberikan kepada tikus menghasilkan 56 miligram setiap 200 miligram BB tikus.

“Larutan stok = $56 \text{ mg} / 2 \text{ ml} \times 100 \text{ ml} = 2,8 \text{ g}/100 \text{ ml}$ ”

6.4. Dosis triamsinolon asetonid. Dosis *triamcinolone acetone* dihitung berdasarkan parameter untuk manusia seberat 70 kg dan tikus seberat 200 g. Faktor konversinya sebesar 0,018 (Lakoan *et al.*, 2020). Triamcinolone acetone sering diberikan kepada tikus dengan dosis 0,072 mg per 200 g berat badan, yang lebih rendah dari dosis manusia normal sebesar 4 mg.

Tabel 2. Penetapan Dosis ke Tikus

Nama Bahan / Senyawa	Dosis	Pustaka
Ekstrak Brotowali	40 mg/200 g BB tikus	(Lakoan <i>et al.</i> , 2020)
Ekstrak Anting-Anting	80 mg/200 g BB tikus	(Supriatna <i>et al.</i> , 2022)
Ekstrak Alang-Alang	56 mg/200 g BB tikus	(Klau <i>et al.</i> , 2014)
Triamsinolon Asetonid	0,072 mg/200 g BB tikus	(Lakoan <i>et al.</i> , 2020)

7. Perlakuan Hewan Uji

Dalam penelitian ini digunakan tikus Wistar putih jantan (120-200 g, umur 2-3 bulan). Tikus mampu menyesuaikan diri dengan lingkungan barunya dan merasa tidak terlalu cemas setelah diisolasi selama tiga hari. Tikus dibiarkan mengakses makanan dan air tanpa batas selama periode pengondisian. Tiga belas kelompok utama dibentuk dari tikus-tikus tersebut: yang diberi ekstrak etanol batang brotowali, yang diberi ekstrak etanol herba anting-anting, yang diberi ekstrak etanol akar alang-alang, dan kelompok pertama yang menerima campuran keduanya, kombinasi kedua ekstrak etanol batang brotowali dan akar alang-alang, kombinasi ketiga ekstrak etanol batang brotowali dan herba anting – anting (0,5 : 0,5) dengan topikal aloe vera, kombinasi keempat ekstrak etanol batang brotowali dan akar alang-alang (0,5 : 0,5) dengan topikal aloe vera, kombinasi kelima ekstrak etanol batang brotowali dan herba anting - anting dengan topikal aloe vera, batang brotowali dan herba anting – anting, kombinasi keenam ekstrak etanol batang

brotowali dan akar alang - alang dengan topikal aloe vera, batang brotowali dengan akar alang – alang, kombinasi ketujuh ekstrak etanol batang brotowali, tanaman anting - anting dan akar alang - alang dengan topikal aloe vera, batang brotowali, tanaman anting - anting dengan akar alang – alang, kontrol negatif, kontrol positif dan kontrol normal.

Lima ekor tikus dimasukkan ke dalam masing-masing kelompok. Selanjutnya perawatan selama delapan hari. Tikus dalam kelompok studi diberikan larutan CMC 1% atau triamcinolone oral dan topikal selama 1-20 hari, berbeda dengan kelompok kontrol yang diberi makanan dan air biasa. Dari hari pertama hingga hari kedua puluh. Kelompok subyek diberikan ekstrak yang berbeda dalam jumlah yang berbeda selama 1-20 hari. Ekstrak tunggal batang brotowali, ekstrak herba anting-anting tunggal, ekstrak tunggal akar alang-alang, kombinasi pertama ekstrak batang brotowali dan herba anting-anting, serta kombinasi kedua ekstrak batang brotowali dan akar alang-alang diberikan dalam kelompok selama 1 hingga 20 hari.

Tabel 3. Kelompok Perlakuan

Kelompok	Jumlah tikus	Perlakuan
I (kontrol normal)	5	-
II (kontrol negatif)	5	tikus diinduksi CFA 0,01 ml (intraplantar) dan diberikan Na-CMC 1% (p.o)
III (kontrol positif p.o dan topikal)	5	tikus diinduksi CFA 0,01 ml (intraplantar), triamsinolon 0,072 mg/200 g BB (p.o) dan diberikan triamsinolon (topikal)
IV (sediaan uji 1)	5	tikus diinduksi CFA 0,01 ml (intraplantar), brotowali 40 mg / 200 g BB (p.o) dan diberikan Na-CMC 1% (p.o)
V (sediaan uji 2)	5	tikus diinduksi CFA 0,01 ml (intraplantar), anting-anting 80 mg / 200 g BB (p.o) dan diberikan Na-CMC 1% (p.o)
VI (sediaan uji 3)	5	tikus diinduksi CFA 0,01 ml (intraplantar), alang-alang 56 mg / 200 g BB (p.o) dan diberikan Na-CMC 1% (p.o)
VII (sediaan uji 4)	5	tikus diinduksi CFA 0,01 ml (intraplantar), dikombinasikan brotowali 40 mg / 200 g BB (p.o) dan anting-anting 80 mg / 200 g BB (p.o) serta diberikan Na-CMC 1% (p.o)
VIII (sediaan uji 5)	5	tikus diinduksi CFA 0,01 ml (intraplantar), dikombinasikan brotowali 40 mg / 200 g BB (p.o) dan alang-alang 56 mg / 200 g BB (p.o) serta diberikan Na-CMC 1% (p.o)
IX (sediaan uji 6)	5	tikus diinduksi CFA 0,01 ml (intraplantar), kombinasi brotowali 40 mg / 200 g BB (p.o),

Kelompok	Jumlah tikus	Perlakuan
		anting-anting 80 mg / 200 g BB (p.o), serta diberikan Na-CMC 1% (p.o) dan aloe vera (topikal)
X (sediaan uji 7)	5	tikus diinduksi CFA 0,01 ml (intraplantar), kombinasi brotowali 40 mg / 200 g BB (p.o), dan alang-alang 56 mg / 200 g BB (p.o) serta diberikan Na-CMC 1% (p.o) dan aloe vera (topikal)
XI (sediaan uji 8)	5	tikus diinduksi CFA 0,01 ml (intraplantar), kombinasi brotowali 40 mg / 200 g BB (p.o dan topikal), dan anting-anting 80 mg / 200 g BB (p.o dan topikal) serta diberikan Na-CMC 1% (p.o)
XII (sediaan uji 9)	5	tikus diinduksi CFA 0,01 ml (intraplantar), kombinasi brotowali 40 mg / 200 g BB (p.o dan topikal), dan alang-alang 56 mg / 200 g BB (p.o dan topikal) serta diberikan Na-CMC 1% (p.o)
XIII (sediaan uji 10)	5	tikus diinduksi CFA 0,01 ml (intraplantar), kombinasi brotowali 40 mg / 200 g BB (p.o dan topikal), anting-anting 80 mg / 200 g BB (p.o dan topikal) dan alang-alang 56 mg / 200 g BB (p.o dan topikal) serta diberikan Na-CMC 1% (p.o)

8. Pengujian Aktivitas Antiartritis untuk Skrining Ekstrak

Penelitian antiartritis dilakukan menggunakan tikus albino galur Wistar, yang beratnya biasanya antara 180 dan 200 gram. Kondisi laboratorium yang umum (25 derajat Celcius selama 24 jam) diterapkan pada kandang hewan yang digunakan untuk percobaan. Kami pergi ke supermarket terdekat dan membeli air dan makanan tikus, yang kemudian kami bagikan kepada tikus sesuai keinginan mereka. Hewan percobaan terdiri dari lima ekor tiap kelompok yang berbeda.

8.1. Uji aktivitas antiarthritis diinduksi pereaksi CFA. Sebelum mengukur tingkat pembengkakan, 0,2 ml reagen CFA disuntikkan ke area plantar telapak kaki belakang tikus. Hari ke-0 digunakan untuk merujuk pada hari ketika edema telapak kaki tikus tidak diobati, sedangkan hari ke-1 hingga ke-14 digunakan untuk merujuk pada hari-hari ketika ekstraksi uji dilakukan. Kami mengevaluasi jumlah edema pada setiap telapak kaki tikus menggunakan pletismograf dan mengukur berat badan mereka dari hari ke-0 hingga hari ke-14.

Terdapat tiga belas kelompok hewan yang berbeda yang digunakan dalam percobaan: kelompok yang diberi ekstrak daun anting-anting, kelompok yang diberi ekstrak batang brotowali tunggal, kelompok yang diberi ekstrak akar alang-alang, kelompok yang diberi campuran kedua yang mengandung ekstrak batang brotowali dan daun anting-anting, kelompok yang diberi kontrol normal, dan terakhir kelompok yang diberi kontrol negatif. Mulai dari hari ke-1 hingga hari ke-14, ekstraksi eksperimental dilaksanakan pada kelompok ekstraksi tunggal dan kombinasi. Mulai dari hari ke-1 hingga hari ke-14, pletismograf digunakan untuk mengukur ukuran kaki. Hari ke-20 dilakukan studi histologis sendi kaki yang membesar yang ditemukan dari hewan setelah dibunuh.

8.2. Penggunaan alat plethysmograph. Ide dasar alat ini didasarkan pada hukum Archimedes (Lumbanraja 2009). Untuk mengukur pembacaan pletismograf, tikus direndam dalam tabung berisi larutan ukur hingga mencapai garis merah, kemudian pedal ditekan hingga volume tetap konstan. Perubahan larutan dicatat dalam log sebagai volume seiring waktu, misalnya kaki V_t (Ratna 2009).

9. Estimasi Parameter Leukosit

Pada hari ke-17, kami menggunakan EDTA (etilendiamintetraasetat) dan reagen Turk untuk mereaksikan darah dari belakang vena leher tikus, yang berfungsi sebagai kontrol untuk percobaan. Langkah selanjutnya adalah menggunakan bilik Neubauer dan teknik Chesbrough dan McArthur untuk memperoleh jumlah total leukosit. Langkah-langkah yang terlibat dalam proses ini tercantum di bawah ini:

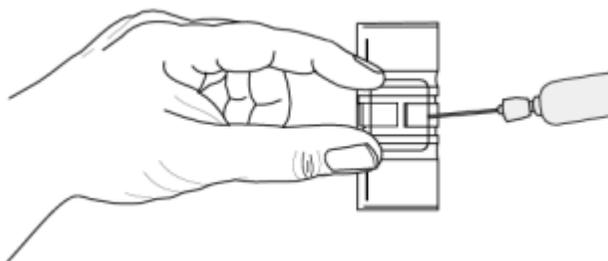
9.1. Pengisian Pipet Leukosit. Untuk cara pembuatannya adalah,

- a. Di atas meja laboratorium, semua peralatan dan perlengkapan yang diperlukan diletakkan.

- b. Dengan menggunakan pipet leukosit Thomas, ambil darah hingga skala menunjukkan angka 0,5.
- c. Ujung pipet digunakan untuk membuang darah yang berlebih.
- d. Dengan tetap menjaga darah pada garis tanda sebelumnya, masukkan ujung pipet ke dalam larutan Turk. Pegang pipet pada sudut 45 derajat, cairan Turk secara bertahap dihisap hingga ke garis tanda. 11. Hindari terbentuknya gelembung udara dengan berhati-hati.
- e. Angkat pipet untuk mengeluarkan cairan. Setelah melepaskan karet hisap, gunakan ujung jari Anda untuk menutup ujung pipet.
- f. Selama 15 hingga 30 detik, pipet dikocok. Objek dibaringkan datar jika penghitungannya akan memakan waktu.

9.2. Pengisian Kamar Hitung. Untuk cara pembuatannya yaitu,

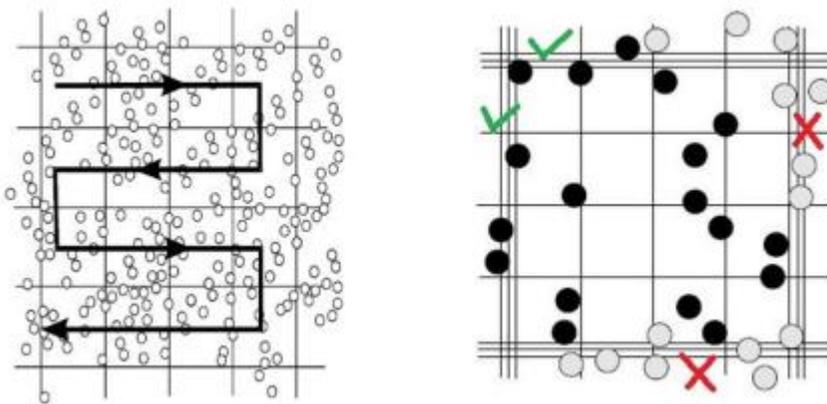
- a. Letakkan bilik hitung yang bersih di atas meja, pastikan kaca penutup diposisikan secara horizontal.
- b. Saat mengocok, pastikan pipet tidak mengeluarkan cairan apa pun; kocok terus-menerus selama 3 menit.
- c. Tuangkan tiga atau empat tetes cairan dari batang kapiler pipet, lalu sentuhkan ujung lancip pipet ke tepi bilik yang digunakan untuk menghitung untuk membuat sudut 30 derajat dengan bagian luar bilik. Bilik hitung dapat menggunakan daya kapilernya untuk mengisi cairan secara perlahan.
- d. Berhentilah sejenak dari bilik hitung untuk memungkinkan leukosit dihitung. Untuk mempercepat proses penghitungan, segumpal kapas basah dapat dimasukkan ke dalam cawan petri tertutup bersama bilik hitung.



Gambar 3. Teknik Mengisi Kamar Hitung

9.3. Menghitung Jumlah Sel. Teknik perhitungannya, sebagaimana seharusnya, adalah

- a. Lensa objektif kecil, yaitu lensa dengan perbesaran 10x, digunakan. Tarik diafragma ke bawah atau turunkan lensa kondensor. Sangat penting agar meja mikroskop tetap datar.
- b. Kamar hitung disiapkan dan mikroskop difokuskan pada garis pemisah setelah meletakkan bidang bergaris di bawah lensa objektif. Leukosit mudah dibedakan.
- c. Titrasi semua sel darah putih di empat area ekspansif yang mengelilingi semua permukaan yang terbelah.
 - Dimulai dari menghitung sudut kiri atas, pindah ke kanan, turunkan, lalu mulai menghitung lagi dari sudut kiri atas, kali ini dari kiri ke kanan. Keempat bidang besar menggunakan teknik ini.
 - Bukan hal yang aneh jika sel terletak tepat di batas bidang. Setiap sel harus dihitung jika menyentuh garis batas kiri atau atas. Anda tidak boleh menyertakan sel yang menyentuh batas atas atau bawah.



“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

Pada hari ke-25 dilakukan langkah-langkah berikut untuk melakukan pengujian histopatologi pada sendi:

10.1. Fiksasi jaringan dengan formalin dalam PBS pH 7,4.

Prosedur untuk memperbaiki jaringan melibatkan mengikuti pendekatan ini dan menggunakan larutan formalin dalam PBS dengan pH 7,4: Silinder ukur 100 mL diisi dengan 10 mL PBS pada pH 7,4 untuk membuat larutan fiksatif. Setelah itu, 10 mL formalin 37% dan 100 mL air yang disaring ditambahkan ke dalamnya sampai volume yang diinginkan diperoleh. Langkah selanjutnya adalah memindahkan campuran ke gelas kimia 100 ml dan mencampur dengan baik dengan mengocok. Setelah itu, lilin parafin digunakan untuk mengiris jaringan biopsi atau nekropsi (ketebalan maksimum 0,5 cm, lebar 1 cm, panjang 1 cm). Botol kaca plastik digunakan untuk memindahkan irisan jaringan ke dalamnya, dan larutan fiksatif dituangkan dengan perbandingan 1:20 menggunakan sendok berlubang. Sebelum ditempatkan ke dalam botol, itu diberi label dengan pensil 2B pada selembar kertas kecil. Setelah membiarkan botol berada pada suhu ruangan selama minimal dua jam, jaringan dapat diproses pada hari berikutnya. Jaringan yang direndam dalam fiksatif harus disimpan pada suhu 4 derajat Celcius untuk tujuan penyimpanan.

10.2. Tahap dekalsifikasi dengan metode *von ebner's*. Berikut ini adalah prosedur untuk dekalsifikasi: Setelah larutan reagen tutup kaca transparan sebanyak 200 ml dibuat, jaringan yang telah difiksasi secara kimia ditambahkan ke dalam botol dan dibiarkan pada suhu ruangan selama satu hari. Dengan mencampur 5 ml larutan perendam jaringan (larutan Von Ebner) dengan 1 ml larutan amonium oksalat 5% dan mengamati munculnya endapan putih pada hari berikutnya, kita dapat menentukan apakah dekalsifikasi telah selesai. Proses dekalsifikasi harus dipertahankan jika endapan putih terdeteksi.

Untuk melanjutkan prosedur dekalsifikasi, buang larutan yang digunakan untuk merendam jaringan, lalu tambahkan 200 ml stok dekalsifikasi segar dan 1 ml HCl pekat. Keesokan harinya, ulangi proses tersebut untuk mendeteksi keberadaan endapan. Prosedur dekalsifikasi dipertahankan hingga pemeriksaan tidak lagi menunjukkan endapan putih yang terlihat, jika endapan masih muncul. Konsentrasi HCl yang meningkat (1 ml) diperlukan untuk setiap perubahan larutan stok. Jika tidak ada endapan putih yang terdeteksi saat

pemeriksaan, ini menunjukkan bahwa proses dekalsifikasi telah berhasil diselesaikan.

Setelah benar-benar kering, jaringan direndam pada larutan Von Ebner yang baru dan diinkubasi selama 24 jam dengan HCl hingga volume akhir. Bungkus kembali jaringan dengan kain kasa setelah 24 jam, lalu, setelah setidaknya dua jam dibilas dengan air mengalir, buang sisa larutan pembersih. Sebelum difiksasi dalam formalin PBS (pH 7,4) selama 2 jam, jaringan dibilas dengan air suling. Jika jaringan tidak segera diobati, jaringan disimpan pada suhu 4 derajat Celcius hingga tahap pengeringan, yang pada saat itu jaringan siap untuk diproses.

10.3. Tahap pembuatan blok parafin. Tahapan berikut terlibat dalam pembuatan blok parafin: pertama, jaringan dikeringkan dan ditempatkan dalam wadah berisi larutan fiksatif formalin PBS. Kemudian disiapkan hingga dimensi maksimum 0,5 x 1 x 1 cm.

Setelah larutan fiksatif dituang ke dalam botol wadah, langkah selanjutnya dalam dehidrasi adalah menahan jaringan dan label di dalam wadah. Setelah itu, tambahkan 30 ml alkohol 30% (bisa yang baru atau dari botol wadah alkohol 30% II), tutup wadah, dan diamkan selama 20 menit, sambil dikocok secara teratur. Setelah putaran pertama, yang diakhiri dengan menyiram dengan toilet, putaran kedua dan ketiga dipindahkan ke wadah terpisah dengan label, satu untuk alkohol 30% II dan yang lainnya untuk alkohol 30% III. Peningkatan konsentrasi alkohol (dari 50% menjadi 100%) dicapai dengan mengulangi proses ini. Alkohol absolut III, langkah terakhir dalam proses dehidrasi, menggunakan alkohol absolut yang baru. Langkah selanjutnya adalah melanjutkan dengan prosedur pembersihan.

Untuk membersihkannya, keluarkan tisu dan label, lalu tempatkan pada botol kaca bening berisi 100 ml campuran toluol dan alkohol dengan perbandingan 1:1. Diamkan wadah tersebut selama 20 menit. Setelah itu, tisu dan label dipindahkan ke dalam botol kaca bersih berisi 100 ml toluol alami menggunakan sendok berlubang. Kemudian, tisu dan label dikeringkan menggunakan kertas saring dan ditempatkan dalam botol hingga menjadi bening, yang biasanya memakan waktu sekitar 60 menit. Setelah itu, prosedur penempelan dilakukan.

Untuk menempelkan tisu dan label, kami menggunakan sendok berlubang untuk memindahkannya ke dalam botol transparan. Di dalamnya, kami mencampur 50 ml parafin toluol jenuh. Kami membiarkan campuran

tersebut pada suhu kamar semalaman. Prosedur infiltrasi dilakukan dalam inkubator yang diatur pada suhu 60 oC. Dengan menggunakan sendok berlubang, tisu dan label dipindahkan ke dalam wadah bening berisi parafin cair I. Kemudian, dibiarkan selama 15 menit. Parafin cair kedua, keempat, dan kelima melalui proses yang sama. Di sini, parafin dicairkan dalam inkubator yang diatur pada suhu 60 oC menggunakan ketel.

Mengisi cetakan atau kaset dengan parafin cair dan kemudian menempatkan jaringan di dalamnya merupakan langkah terakhir dalam proses penanaman. Perhatian yang cermat terhadap arah jaringan dalam kaitannya dengan sayatan yang dimaksud diperlukan selama prosedur ini. Kami kemudian menggunakan kertas HVS atau spidol permanen untuk menulis label unik pada kaset, yang kemudian kami tempelkan pada cetakan. Kemudian, kami memasukkan data sampel unik ke dalam dokumen sampel. Kemudian, ketika cetakan atau kaset telah mendingin hingga suhu ruangan, cetakan atau kaset dibekukan menjadi balok dan disimpan pada suhu 4 derajat Celcius.

10.4. Tahap deparafinasi dan rehidrasi. Sementara proses deparafinasi dan rehidrasi sedang berlangsung, pastikan untuk memperhatikan detail berikut: Sebelum pewarnaan, urutan tertentu harus dipatuhi untuk lima belas slide yang akan digunakan untuk pemeriksaan jaringan. Buat larutan alkohol dengan konsentrasi antara 70% dan 95%. Setelah itu, slide direndam dalam urutan larutan alkohol tertentu: xylol I dan xylol II masing-masing selama sepuluh menit, kemudian alkohol 100% 1 dan alkohol 2 100% masing-masing selama lima menit, kemudian alkohol 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing selama satu menit, dan terakhir, air suling untuk pencucian. Setelah proses perendaman selesai, slide yang mengelilingi jaringan disiapkan untuk dibaca dengan membuang sisa parafin menggunakan kertas tisu.

10.5. Tahap pewarnaan *hematoksilin-eosin*. Berikut ini adalah prosedur pewarnaan. Bila slide (tidak lebih dari lima belas) telah dideparafinisasi dan siap diwarnai dengan jaringan, tambahkan tujuh puluh lima mililiter larutan hematoksilin dan biarkan hingga terwarnai. Lamanya inkubasi: tiga hingga lima menit (lamanya yang tepat di sini bergantung pada dosis dan penghilangan jaringan). Kemudian dibilas tiga kali dengan air suling selama satu menit, buang airnya setelah setiap pencucian, sebelum larutan hematoksilin dipindahkan ke botol penyimpanan. Setelah Anda mencuci kain yang berubah warna, gunakan alkohol gosok dan biarkan selama 30 detik. Botol penyimpanan digunakan untuk menampung alkohol asam, yang

kemudian dicuci dengan air yang mengalir selama antara tiga dan lima menit sambil difiksasi dalam hematoksilin. Pembilasan kedua dengan air suling kemudian dilakukan.

Bergantung pada jenis jaringan, larutan eosin 1% dioleskan ke jaringan berwarna dan didiamkan selama 1 hingga 2 menit. Kemudian, film dicuci tiga kali dengan air suling, lalu larutan eosin dipindahkan ke botol penyimpanan. Setelah setiap pencucian, air yang kotor dibuang.

Setelah langkah pewarnaan selesai, langkah berikutnya adalah mengeringkan, memasang, dan akhirnya memeriksa hasilnya di bawah mikroskop.

10.6. Tahap dehidrasi (sesudah pewarnaan). Tahapan berikut dilakukan selama fase dehidrasi: distilasi xylol 1 dan xylol 2 ke dalam larutan alkohol dengan konsentrasi berkisar antara 70% hingga 95%. Kaca objek dapat diwarnai menggunakan pewarnaan jaringan (maksimal 15 kaca objek). Tahap selanjutnya adalah merendam kaca objek dalam larutan alkohol mulai dari alkohol 70% selama sekitar satu menit. Dengan teknik yang sama, perendaman dilakukan dengan konsentrasi alkohol yang meningkat (80%, 90%, 95%, 100%) dimulai dengan xylol 1 dan berlanjut ke xylol 2. Setelah dehidrasi, kertas tisu digunakan untuk menyeka kaca objek hingga kering, kemudian dilakukan pemasangan.

10.7. Proses *mounting*. Setelah pencucian dengan air suling tiga tahap, sediaan histologis mengalami serangkaian perlakuan yang dirancang untuk mendehidrasi sediaan tersebut. Perlakuan ini meliputi xylol I, II, dan III selama tiga menit, diikuti oleh alkohol dengan kadar 50% hingga 100% selama satu menit. Semua yang Anda lihat di sini merupakan komponen pemasangan. Selanjutnya, tergantung pada jumlah sediaan, sediaan ditutup dengan balsem Kanada dan kemudian segera ditutup lagi dengan kaca penutup.

10.8. Tahap pembacaan sampel. Ini adalah langkah terakhir dalam pemeriksaan histologis sendi. Untuk mempersiapkan diri menjalani pengujian, Anda perlu menemukan area kerusakan tertentu dan mencatat semua perubahan histologis pada jaringan ikat, seperti sel inflamasi, hiperplasia sinovial, dan sel monomorfonuklear dan polimorfonuklear berlebih di ruang antara sendi.

F. Alat, Bahan dan Hewan Uji

1. Bahan

Maserasi dipakai untuk mengekstrak alang-alang dan brotowali beserta anting-anting sebagai bahan uji pada penelitian ini.

Zat-zat berikut digunakan dalam penelitian ini: air, etanol, air suling, pereaksi Hayem, pereaksi CFA, EDTA, larutan Von Ebner, larutan garam formal 10%, amonium oksalat 5%, alkohol 70%, 90%, 95%, dan 100%, xilol, hematoksilin, parafin, dan eosin.

2. Alat

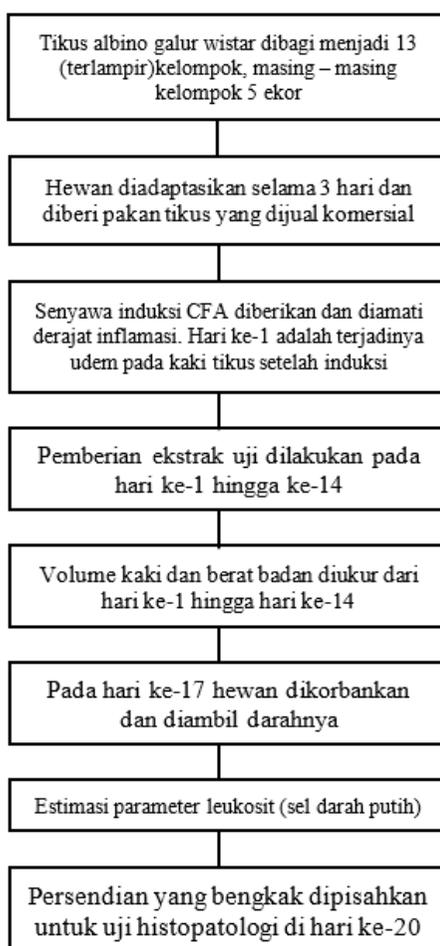
Peralatan produksi ekstrak etanol brotowali dengan anting-anting dan alang- alang adalah tutup wadah, wadah maserasi yang berisi bahan yang akan dimaserasi, wadah berisi hasil maserasi dan alat pengaduk, pengaduk mekanis. Pletismometer adalah instrumen yang dipakai untuk menilai tingkat keparahan edema pada kaki tikus. Kamar Neubauer ialah instrumen yang berguna untuk menentukan jumlah total sel darah putih. Instrumen yang digunakan dalam analisis histopatologi terdiri dari peralatan gelas, mikroskop, mikrotom, dan pengaduk magnetik. Barang-barang berikut juga dipakai pada penelitian ini: evaporator, lemari pengering, saringan no. 40, beberapa gelas, timbangan hewan, timbangan penyaring, dan kandang hewan.

3. Hewan Uji

Tikus albino Wistar yang dibeli dari “FamFarm” di Solo, Jawa Tengah, dan dipelihara selama 2-3 bulan dengan berat tubuh 120-200 g, dijadikan hewan percobaan pada penelitian ini.

G. Analisa Data

Metodologi analisis data penelitian ini dipilih berdasarkan data yang diperoleh. Dengan menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov, kami memeriksa apakah data terdistribusi normal. Kami melakukan uji nonparametrik jika data tidak menunjukkan distribusi normal ($p < 0,05$). Melakukan uji parametrik (ANOVA) adalah langkah berikutnya jika data mengikuti distribusi normal ($p > 0,05$). Untuk menilai apakah ada perbedaan antara setiap kelompok perlakuan, pengujian Post Hoc dilanjutkan.



Kelompok terdiri dari :

1. Kelompok kontrol sehat,
2. Kelompok yang berfungsi sebagai kontrol,
3. Kelompok kontrol positif yang diberikan adalah kombinasi triamcinolone oral dan topikal (0,072 mg/200 g berat badan tikus).

4. Kelompok keempat diberikan ekstrak etanol batang brotowali dosis oral 40 mg/200 g berat badan.
5. Kelompok tikus diberikan ekstrak etanol herba anting-anting dosis oral 80 mg per 200 g berat badan.
6. Kelompok tikus (56 mg/200 g berat badan) diberikan uji oral menggunakan ekstrak etanol akar alang-alang.
7. Kelompok uji oral dengan campuran ekstrak etanol batang brotowali dan herba anting-anting
8. Kelompok uji oral dengan campuran ekstrak etanol akar alang-alang dan batang brotowali,
9. Kelompok uji efek ekstrak etanol batang dan daun brotowali secara topikal dan oral (0,5 : 0,5)
10. kelompok kombinasi uji peroral dan topikal ekstrak etanol batang brotowali dan akar alang-alang (0,5 : 0,5)
11. kelompok kombinasi uji peroral ekstrak etanol batang brotowali dengan tanaman anting-anting dan topikal batang brotowali dengan tanaman anting-anting
12. kelompok kombinasi uji peroral ekstrak etanol batang brotowali dengan akar alang - alang dan topikal batang brotowali dengan tanaman alang - alang.
13. kelompok kombinasi uji peroral ekstrak etanol batang brotowali, tanaman anting - anting dengan akar alang - alang dan topikal batang brotowali, tanaman anting - anting dengan akar alang - alang.”

Gambar 5. Skema Prosedur Uji Antiartritis