

BAB III METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimental untuk mengetahui aktivitas antiarthritis dan perbaikan profil uji histopatologi ekstrak etanol tanaman ciplukan dengan akar alang - alang dan daun sambiloto. Tikus wistar albino diinduksi menggunakan CFA model hewan uji. Penelitian dilakukan dalam 13 kelompok hewan uji dimana setiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus, kelompok kontral 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 tanaman ciplukan (50 mg / 200 g BB tikus), kelompok uji peroral ekstrak etanol akar alang-alang (56 mg / 200 g BB tikus), kelompok uji peroral ekstrak etanol daun sambiloto (20 mg / 200 g BB tikus), kelompok uji topikal ekstrak etanol tanaman ciplukan, kelompok uji topikal ekstrak etanol akar alang - alang, kelompok uji topikal ekstrak etanol daun sambiloto, kelompok kombinasi uji peroral ekstrak etanol tanaman ciplukan dan akar alang - alang, kelompok kombinasi uji peroral ekstrak etanol tanaman ciplukan dan daun sambiloto, kelompok kombinasi uji topikal ekstrak etanol tanaman ciplukan dan akar alang - alang, kelompok kombinasi uji topikal ekstrak etanol tanaman ciplukan dan daun sambiloto, kelompok kombinasi uji peroral dan topikal ekstrak etanol tanaman ciplukan, kelompok kombinasi uji peroral dan topikal ekstrak etanol akar alang - alang, kelompok kombinasi uji peroral dan topikal ekstrak etanol daun sambiloto, kelompok kombinasi uji peroral dan topikal ekstrak etanol tanaman ciplukan dan akar alang - alang, kelompok kombinasi uji peroral dan topikal ekstrak etanol tanaman ciplukan dan daun sambiloto.

B. Subjek dan Lokasi Penelitian

Subjek penelitian ini adalah tikus putih 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 tanaman ciplukan, akar alang-alang, dan daun sambiloto yang diambil dari petani pada bulan September di Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah.

Sampel mewakili populasi yang dijadikan sumber segala informasi yang diperlukan untuk menyelesaikan masalah penelitian. Sampel adalah bagian dari populasi. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman ciplukan, akar alang-alang, dan daun sambiloto yang diperoleh bersih, kering dan tidak busuk.

D. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol tanaman ciplukan dan akar alang - alang yang diperoleh dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70 % dan daun sambiloto yang diperoleh dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96 % yang diberikan secara oral dan topical pada sediaan tunggal maupun 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 konsentrasi ekstrak tanaman ciplukan, akar alang-alang dan daun sambiloto dalam etanol yang diuji antiarthritis. 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.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, tanaman ciplukan adalah tanaman dari tanaman ciplukan yang diambil dari petani di Desa Kalisoro, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan September 2023.

Kedua, akar alang - alang adalah akar dari tanaman alang – alang yang diambil dari Desa Kalisoro, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah, pada bulan September 2023.

Ketiga, daun sambiloto adalah daun dari tanaman sambiloto yang diambil dari Desa Kalisoro, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah, pada bulan September 2023.

Keempat, serbuk tanaman adalah tanaman ciplukan, akar alang - alang dan daun sambiloto yang diambil dalam keadaan bersih, kering, dan tidak busuk, kemudian dicuci dengan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel, ditiriskan, dipotong-potong kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari ditutup kain berwarna hitam selama 8 hari, kemudian dihaluskan, dibuat serbuk dan diayak.

Kelima, ekstrak etanol tanaman ciplukan, akar alang-alang dan daun sambiloto adalah hasil penyarian serbuk tanaman ciplukan, akar alang-alang dengan pelarut etanol 70 % dan daun sambiloto dengan pelarut etanol 96 % menggunakan metode maserasi dan hasil maserasi 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 tanaman ciplukan dengan akar alang-alang dan daun sambiloto dengan parameter berat badan, jumlah leukosit, persentase penurunan volume udem, dan profil histopatologi persendian pada tikus.

Kedelapan, efek antiarthritis tunggal adalah efek antiarthritis tunggal ekstrak etanol tanaman ciplukan, akar alang - alang, daun sambiloto, kombinasi ekstrak etanol tanaman ciplukan dengan akar alang - alang dan daun sambiloto dibuktikan dengan adanya peningkatan berat badan, penurunan jumlah sel darah putih, dan penurunan volume edema sendi kaki tikus dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Kesembilan, efek antiarthritis kombinasi adalah efek antiarthritis kombinasi ekstrak etanol tanaman ciplukan, akar alang - alang, daun sambiloto baik oral maupun topikal dengan terlihat derajat histopatologi kaki tikus dengan teknik *Hematoxylin Eosin* (HE) melalui pengamatan mikroskop dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Kesepuluh, hewan uji adalah hewan yang digunakan untuk pengujian berupa tikus wistar albino sehat. Tikus yang akan digunakan berumur 2 sampai 3 bulan, biasanya berbobot 120 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 yaitu simplisia serbuk tanaman ciplukan, akar alang-alang dan daun sambiloto 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 96%, alkohol 95%, alkohol 100%, xylol, parafin, canada balsem, *hematoksilin dan eosin* (H & E).

2. Alat

Alat untuk pembuatan ekstrak tanaman ciplukan dan akar alang-alang dan daun sambiloto yaitu bejana maserasi berisi bahan yang sedang dimaserasi, tutup bejana, alat pengaduk yang digerakkan secara mekanik, bejana tempat hasil maserasi, dan penyerkai. Alat yang digunakan untuk mengukur derajat edema tungkai pada tikus adalah *plethysmograph*. 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 alat gelas.

3. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan albino galur Wistar berumur 2-3 bulan dan memiliki berat badan 120-200 g yang diperoleh dari Fam Farm Tikus Putih Solo, Jawa Tengah dan telah mendapatkan surat kelaikan etik dari RSUD Dr. Moewardi Nomor : 2.013/XI/HREC/2023.

F. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi Uji Makroskopis Tanaman Ciplukan, Akar Alang – Alang dan Daun Sambiloto

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah mendeskripsikan tanaman ciplukan, alang-alang dan sambiloto dan melakukan uji makroskopis mengenai morfologi tanaman dan organoleptis serbuk tanaman bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel tersebut. Deskripsi dan uji makroskopis ini dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri sampel secara utuh dengan ciri-ciri tanaman ciplukan pada jurnal penelitian milik (Jannah & Safnowandi, 2018), tanaman alang-alang (Wildaningsih, 2020), tanaman sambiloto (Ischak & Botutihe, 2018).

2. Pembuatan Serbuk Tanaman Ciplukan, Akar Alang – Alang dan Daun Sambiloto

Tanaman ciplukan, akar alang-alang dan daun sambiloto diambil dalam keadaan bersih, tidak busuk, kemudian dicuci dengan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel, dirajang

untuk memperkecil ukuran, setelah itu dikeringkan di bawah sinar matahari dengan ditutup kain berwarna hitam selama 8-9 hari, kemudian dihaluskan dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40.

3. Penetapan Susut Pengerinan Tanaman Ciplukan, Akar Alang – Alang dan Daun Sambiloto

Ditimbang serbuk tanaman ciplukan, akar alang-alang dan daun sambiloto 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 Tanaman Ciplukan, Akar Alang – Alang dan Daun Sambiloto

Ekstrak etanol tanaman ciplukan, akar alang-alang dan daun sambiloto dibuat dengan cara maserasi yaitu menimbang 1 bagian serbuk kering tanaman ciplukan, akar alang-alang dan daun sambiloto lalu dituangi dengan 10 bagian etanol, ditutup terlindung dari cahaya matahari dan dibiarkan selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam, selanjutnya campuran tersebut diserkai sarinya, ampas diperas. Maserat dipisahkan dengan cara sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Maserat diuapkan dengan penguap vacuum hingga diperoleh ekstrak kental (Anonim, 2017).

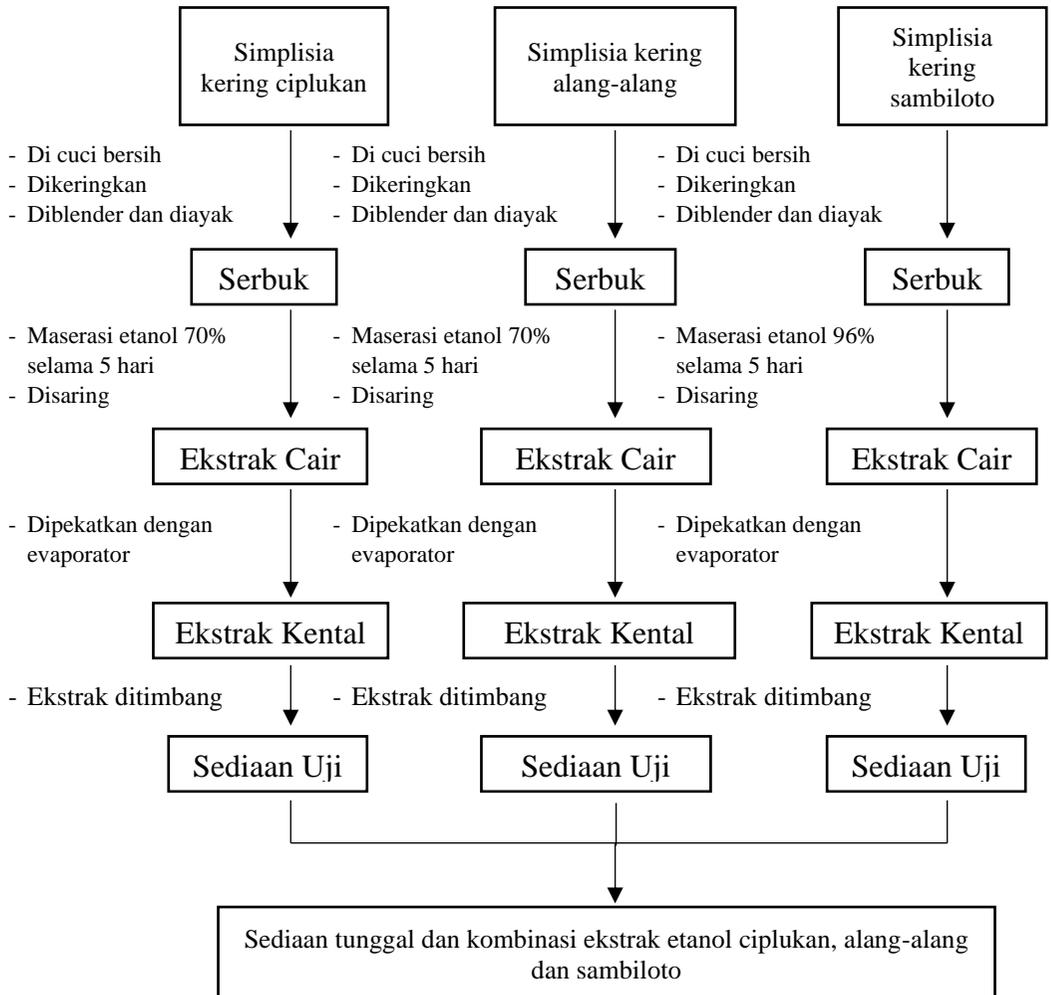
4.1. Perhitungan Rendemen Ekstrak. Rendemen ekstrak diperoleh dengan menghitung persentase (b/V) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan untuk penimbangan. Rendemen harus mencapai angka sekurang-kurangnya sebagaimana ditetapkan pada masing - masing monografi ekstrak.

4.2. Penetapan Susut Pengerinan. Kecuali dinyatakan lain dalam masing-masing monografi, simplisia harus dalam bentuk serbuk dengan derajat halus nomor 8, suhu pengeringan 105 °C. Ekstrak etanol tanaman ciplukan, daun sambiloto tidak lebih dari 10%.

4.3. Perhitungan Kadar Abu Total. Ekstrak etanol tanaman ciplukan tidak lebih dari 14%, daun sambiloto tidak lebih dari 2,0%,

4.4. Perhitungan Abu Tidak Larut Asam. Ekstrak etanol tanaman ciplukan tidak kurang dari 2,4%, daun sambiloto tidak lebih dari 0,5%.

Prosedur pembuatan ekstrak etanol tanaman ciplukan, akar alang-alang dan daun sambiloto pada gambar 2



Gambar 2. Prosedur Pembuatan Ekstrak Etanol Ciplukan dengan Akar Alang-Alang dan Daun Sambiloto

5. Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia Ekstrak Tanaman Ciplukan, Akar Alang – Alang dan Daun Sambiloto

5.1. Identifikasi steroid. Uji ini menggunakan pereaksi Liebermann-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 tigestem 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). Hasil dibandingkan dengan baku pembanding.

Tabel 1. Pengujian Senyawa Kimia dengan KLT pada Ekstrak Etanol Tanaman Ciplukan, Akar Alang-Alang dan Daun Sambiloto

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 tanaman ciplukan. Pembuatan larutan stok, digunakan volume larutan 2 ml dan diperoleh 2,5 gram ekstrak tanaman ciplukan tiap 100 ml larutan stok yang setara dengan dosis 50 mg/200 g BB tikus. Hal ini didapat dari $50 \text{ mg} / 2 \text{ ml} \times 100 \text{ ml} = 2.500 \text{ mg} / 100 \text{ ml} = 2,5 \text{ g} / 100 \text{ ml}$ (Lakoan *et al.*, 2020).

6.2. Dosis ekstrak akar alang-alang. Dosis ekstrak akar alang-alang yang ditetapkan pada tikus adalah 280 mg/kg BB, berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh (Klau *et al.*, 2014). Berdasarkan perhitungan matematis, dosis tersebut setara dengan 56 mg/200 g BB tikus sehingga setiap pembuatan larutan stok mengandung 2,8 g ekstrak akar alang-alang tiap 100 ml larutan. Hal ini didapat dari: dosis akar alang-alang pada tikus = 280 mg/kg BB = 280 mg/1000 g BB = 56 mg / 200 g BB tikus.

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

6.3. Dosis ekstrak daun sambiloto. Dosis ekstrak herba sambiloto yang ditetapkan pada tikus adalah 100 mg/kg 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.

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

6.4. 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	Literatur
Ekstrak Ciplukan	50 mg/200 g BB tikus	(Lakoan <i>et al.</i> , 2020)
Ekstrak Alang-Alang	56 mg/200 g BB tikus	(Klau <i>et al.</i> , 2014)
Ekstrak Sambiloto	20 mg/200 g BB tikus	(Gupta <i>et al.</i> 2018)
Triamsinolon Asetonid	0,072 mg/200 g BB tikus	(Lakoan <i>et al.</i> , 2020)

7. Perlakuan Hewan Uji

Tikus yang digunakan adalah tikus albino galur wistar berkelamin jantan berusia 2-3 bulan dengan berat badan 120-200 gram. Tikus diadaptasikan selama tiga hari untuk menyeragamkan pola hidup dan mencegah terjadinya stres. Selama masa adaptasi tikus diberi pakan standar dan minum secara *ad libitum*. Tikus dikelompokkan menjadi 13 kelompok besar yaitu kelompok kontrol normal, kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok ekstrak tunggal tanaman ciplukan, ekstrak tunggal akar alang-alang, ekstrak tunggal daun sambiloto, kombinasi pertama ekstrak tanaman ciplukan dan akar alang-alang dengan dosis 0,5:0,5, kombinasi kedua ekstrak tanaman ciplukan dan daun sambiloto dengan dosis 0,5:0,5, kombinasi ketiga ekstrak tanaman ciplukan dan ekstrak akar alang-alang dengan perbandingan dosis efektif 0,5:0,5 ditambah pemberian topikal aloe vera, kombinasi keempat dengan perbandingan dosis efektif 0,5:0,5 ekstrak tanaman ciplukan dan daun sambiloto ditambah pemberian topikal aloe vera, kombinasi kelima dengan perbandingan dosis efektif 0,5:0,5 ekstrak

tanaman ciplukan dengan ekstrak akar alang-alang ditambah dengan pemberian kombinasi topikal aloe vera, ekstrak tanaman ciplukan, ekstrak akar alang-alang, kombinasi keenam dengan perbandingan dosis efektif 0,5:0,5 ekstrak tanaman ciplukan dan ekstrak daun sambiloto ditambah pemberian kombinasi topikal aloe vera, ekstrak tanaman ciplukan dan ekstrak daun sambiloto, kombinasi ketujuh dengan perbandingan dosis efektif 0,33:0,33:0,33 ekstrak tanaman ciplukan, ekstrak akar alang-alang ekstrak daun sambiloto ditambah dengan pemberian kombinasi topikal aloe vera, ekstrak tanaman ciplukan, ekstrak akar alang-alang, ekstrak daun sambiloto.

Masing-masing kelompok berjumlah 5 ekor tikus. Perlakuan dilakukan selama 14 hari. Tikus kelompok kontrol normal diberikan makan dan minum secara normal, Tikus diinduksi CFA 0,1% secara intraplantar dan kelompok kontrol negatif diberi larutan CMC 1 % sedangkan pada kontrol positif pertama diberi triamsinolon oral dan topical dari hari ke-1 hingga hari ke-14, dan kelompok kontrol kedua positif diberi triamsinolon oral selama 1 hingga 14 hari. Kelompok uji diberi ekstrak tunggal tanaman ciplukan, ekstrak akar alang-alang, ekstrak daun sambiloto, kombinasi pertama ekstrak tanaman ciplukan dan ekstrak akar alang-alang, serta kombinasi kedua ekstrak tanaman ciplukan dan ekstrak daun sambiloto hingga kombinasi ke tiga belas 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 gel 0,1 g / 100 ml kg BB manusia (topikal)
IV (sediaan uji 1)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), ekstrak ciplukan 50 mg / 200 g BB (p.o) dan diberikan Na-CMC 1% (p.o)
V (sediaan uji 2)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), ekstrak alang-alang 56 mg / 200 g BB (p.o) dan diberikan Na-CMC 1% (p.o)

Kelompok	Jumlah tikus	Perlakuan
VI (sediaan uji 3)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), ekstrak sambiloto 20 mg / 200 g BB (p.o) dan diberikan Na-CMC 1% (p.o)
VII (sediaan uji 4)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), dikombinasikan ekstrak ciplukan 50 mg / 200 g BB (p.o) dan ekstrak alang-alang 56 mg / 200 g BB (p.o) serta diberikan Na-CMC 1% (p.o)
VIII (sediaan uji 5)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), dikombinasikan ekstrak ciplukan 50 mg / 200 g BB (p.o) dan ekstrak sambiloto 20 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), dikombinasikan ekstrak etanol tanaman ciplukan dan ekstrak etanol akar alang-alang (0,5 : 0,5) masing-masing ditambahkan Na-CMC 1% (p.o) + topikal aloe vera
X (sediaan uji 7)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), dikombinasikan ekstrak etanol tanaman ciplukan dan ekstrak etanol daun sambiloto (0,5 : 0,5) serta diberikan Na-CMC 1% (p.o) dan topikal aloe vera
XI (sediaan uji 8)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), dikombinasikan ekstrak etanol tanaman ciplukan dan akar alang-alang (0,5 : 0,5) masing-masing ditambahkan Na-CMC 1% (p.o) + topikal aloe vera + ekstrak etanol tanaman ciplukan dan akar alang-alang
XII (sediaan uji 9)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), dikombinasikan ekstrak etanol tanaman ciplukan dan daun sambiloto (0,5 : 0,5) serta diberikan Na-CMC 1% (p.o) + topikal aloe vera + ekstrak etanol tanaman ciplukan dan daun sambiloto
XIII (sediaan uji 10)	5	tikus diinduksi CFA 0,1 ml (intraplantar), dikombinasikan ekstrak etanol tanaman ciplukan, akar alang-alang dan daun sambiloto (0,33 : 0,33 : 0,33) serta diberikan Na-CMC 1% (p.o) + topikal aloe vera + ekstrak etanol tanaman ciplukan, akar alang-alang dan daun sambiloto

8. Pengujian Aktivitas Antiartritis

Tikus jantan albino galur wistar dengan berat sekitar 120-200 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 0,1 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-14 (Treated). Dari hari ke-1 hingga hari ke-14, berat badan tiap tikus ditimbang dan derajat pembengkakan kaki tiap tikus diukur dengan alat *plethysmograph*.

Hewan coba dibagi menjadi 13 kelompok yaitu kelompok ekstrak tunggal tanaman ciplukan, ekstrak tunggal akar alang-alang, ekstrak tunggal daun sambiloto, kombinasi ekstrak tanaman ciplukan dengan akar alang-alang dan daun sambiloto, kontrol negatif dan kontrol positif. Pemberian ekstrak uji dilakukan pada kelompok ekstrak tunggal dan kombinasi yang dimulai dari hari ke-1 hingga ke-14. Volume kaki diukur pada hari ke-1 hingga hari ke-14 dengan alat *plethysmograph*. Pada hari ke-20 hewan dikorbankan dan diambil bagian persendian kaki yang bengkak untuk uji histopatologi (lihat Gambar 5).

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

Uji parameter leukosit dilakukan pada hari ke-16 dengan cara sebagai berikut:

9.1. Persiapan sampel. Darah dikumpulkan dari vena retro-orbital pada tikus yang akan dibedah kemudian ditampung dalam tabung berisi EDTA (etilena diamina tetraasetat), lalu direaksikan dengan reagen Turk. Setelah itu,

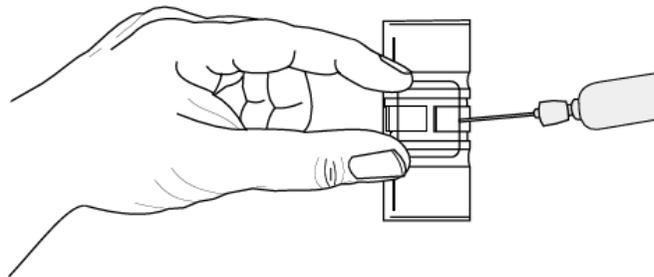
jumlah total leukosit ditentukan dengan metode *Chesbrough and McArthur* dengan *Neubauer chamber*.

9.2. Pengisian Pipet Leukosit. Prosedurnya adalah sebagai berikut :

- a. Alat dan bahan yang akan digunakan disiapkan di atas meja praktikum.
- b. Darah diisap dengan Pipet thoma leukosit hingga skala 0,5 tepat.
- c. Dihapus kelebihan darah yang melekat pada ujung pipet.
- d. 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.
- e. Diangkat Pipet (lati cairan. tutup ujung pipet dengan ujung jari lalu lepaskan karet pengisap).
- f. Pipet tersebut dikocok selama 15-30 detik. Jika tidak segera Okan dihitung, diletakkan dalam sikap horizontal.

9.3. Pengisian Kamar Hitung. Prosedurnya adalah sebagai berikut :

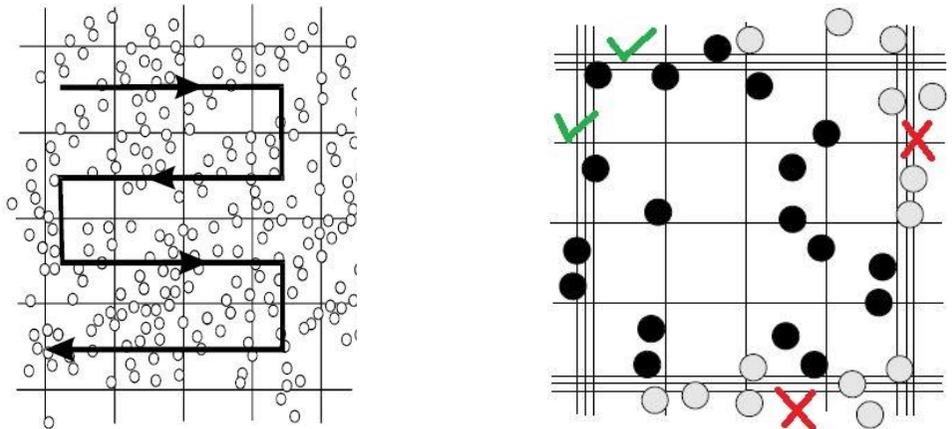
- a. Diletakkan kamar hitung yang bersih dengan kaca penutupnya terpasang mendatar di atas meja.
- b. Dikocok Pipet yang diisi tadi selama 3 menit terus menerus, dijaga jangan sampai ada cairan terbuang dari dalam Pipet itu selama waktu mengocok.
- c. Dibuang semua cairan yang ada di dalam batang kapiler 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.
- d. 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

9.4. Menghitung Jumlah Sel.

- a. Dipakai lensa objektif kecil, yaitu dengan pembesaran 10x. Turunkan lensa kondensor atau kecilkan diafragma. Meja mikroskop harus dalam posisi datar.
- b. Kamar hitung dengan bidang bergarisnya diletakkan di bawah obyektif dan fokus mikroskop diarahkan kepada garis bagi itu. Dengan sendirinya leukosit jelas terlihat.
- c. Hitunglah semua leukosit yang terdapat dalam keempat bidang besar pada sudut-sudut seluruh permukaan yang dibagi.
 - i. 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.
 - ii. 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. Sebaliknya sel-sel yang menyinggung garis batas sebelah kanan atau bawah tidak boleh dihitung.



Gambar 4. Teknik menghitung WBC

9.5. Perhitungan jumlah leukosit. Perhitungan jumlah leukosit dihitung dengan rumus sebagai berikut :

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

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

10. Uji Histopatologi Persendian

Uji histopatologi terhadap persendian dilakukan pada hari ke-16 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 nekropsi 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 dekalsifikasi sempurna, jaringan dimasukkan ke larutan *Von Ebner's* baru dengan jumlah penambahan HCl sama seperti volume penambahan HCl terakhir dan dibiarkan selama 24 jam. Setelah 24 jam berakhir, jaringan diambil dan dibungkus dengan kain kasa, lalu dibersihkan dari sisa larutan dekalsifikasi dengan air mengalir selama minimal 2 jam. Kemudian jaringan dibilas dengan akuades dan difiksasi kembali dengan PBS formalin pH 7,4 selama minimal 2 jam. Bila tidak akan langsung diproses, jaringan disimpan dalam fiksatif pada suhu 40°C sedangkan yang siap diproses, dapat melanjutkan ke tahap dehidrasi.

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 terbuang. 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. Prosedur pada tahap pewarnaan ini adalah sebagai berikut: slide yang siap diwarnai (maksimal 15 slide) dan telah melalui proses deparafinasi diatur dalam staining jaringan, kemudian dimasukkan larutan hematoksin 75 ml ke dalam staining tersebut dan ditunggu selama 3-5 menit (dalam hal ini, waktu inkubasi tergantung daya serap jaringan dan pemakaian). Setelah itu, larutan hematoksin dituang ke dalam botol penyimpanan dan dicuci dengan akuades 3 kali selama 1 menit (setiap kali pencucian, akuades dibuang). Setelah pencucian, acid alkohol dimasukkan ke dalam staining jaringan dan didiamkan selama 30 detik. Kemudian acid alkohol tersebut dituang ke dalam botol penyimpanan dan dicuci dengan air mengalir selama 3-5 menit, sebanding dengan inkubasi di dalam hematoksin, lalu dibilas kembali dengan akuades 1 kali.

Selanjutnya dimasukkan larutan eosin 1% ke dalam staining jaringan, lalu didiamkan selama 1-2 menit tergantung jenis jaringan. Setelah itu, larutan eosin dituang ke dalam botol penyimpanan dan slide dibilas dengan akuades 3 kali. Setiap kali pencucian akuades dibuang.

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*.

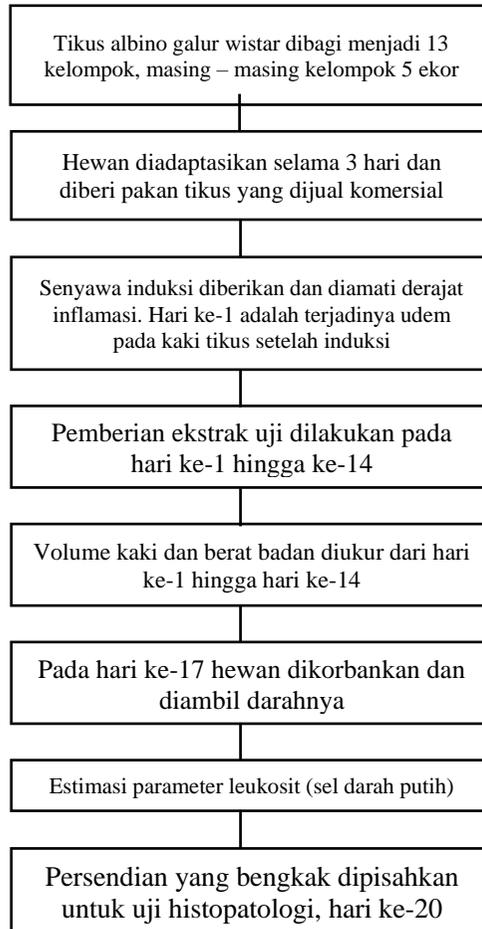
10.7. Proses *mounting*. Proses *mounting* dilakukan dengan tahap sebagai berikut: sediaan histologi dicuci dengan akuades 3 kali kemudian diberi perlakuan berturut-turut yaitu, didehidrasi dengan alkohol 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, dan 100% masing-masing selama 1 menit dan dilanjutkan dengan xylol I, II, 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. Tahap ini merupakan tahap terakhir dari uji histopatologi persendian. Tujuannya adalah untuk mengamati letak kerusakan jaringan sendi yang dikehendaki dan menginterpretasikan parameter perubahan histologi jaringan sendi pada preparat uji yang meliputi masuknya sel-sel inflamasi, hiperplasia cairan sinovial, akumulasi sel monomorphonuclear dan polymorphonuclear di daerah antar persendian.

G. Analisa Data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini akan dipilih berdasarkan data yang diperoleh. Uji distribusi normal (Kolmogorov-Smirnov) digunakan untuk menguji apakah data terdistribusi normal atau tidak. Jika data tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji non parametik. Jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$), maka dilanjutkan

dengan uji parametrik (ANOVA). Uji dilanjutkan dengan tes Post Hoc untuk melihat apakah terdapat perbedaan diantara masing-masing kelompok perlakuan.



Gambar 5. Skema Prosedur Uji Antiartritis

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 tanaman ciplukan (50 mg / 200 g BB tikus),
5. kelompok uji peroral ekstrak etanol akar alang-alang (56 mg / 200 g BB tikus),
6. kelompok uji peroral ekstrak etanol daun sambiloto (20 mg / 200 g BB tikus),
7. kelompok kombinasi uji peroral ekstrak etanol tanaman ciplukan dan akar alang-alang,
8. kelompok kombinasi uji peroral ekstrak etanol tanaman ciplukan dan daun sambiloto,

9. kelompok kombinasi uji peroral ekstrak etanol tanaman ciplukan dan akar alang-alang (0,5 : 0,5) + topikal aloe vera,
10. kelompok kombinasi uji peroral ekstrak etanol tanaman ciplukan dan daun sambiloto (0,5 : 0,5) + topikal aloe vera,
11. kelompok kombinasi uji peroral dan topikal ekstrak etanol tanaman ciplukan dan akar alang-alang (0,5 : 0,5), dan topikal aloe vera + ekstrak etanol tanaman ciplukan dan akar alang-alang,
12. kelompok kombinasi uji peroral dan topikal ekstrak etanol tanaman ciplukan dan daun sambiloto (0,5 : 0,5) dan topikal aloe vera + ekstrak etanol tanaman ciplukan dan daun sambiloto,
13. kelompok kombinasi uji peroral dan topikal ekstrak etanol tanaman ciplukan, akar alang-alang dan daun sambiloto : (0,33 : 0,33 : 0,33) dan topikal aloe vera + ekstrak etanol tanaman ciplukan, akar alang-alang dan daun sambiloto.