

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun duwet yang diperoleh dari kebun petani pada Januari 2019, Madiun, Jawa Timur. Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah daun duwet yang memiliki warna hijau ketuaan, dan tidak busuk yang diambil dari kebun petani pada Januari 2019.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama adalah fraksi n-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun duwet.

Variabel utama yang kedua adalah aktivitas antiinflamasi pada tikus yang diinduksi karagenan.

Variabel utama yang ketiga adalah tikus putih jantan galur Wistar (*Ratus norvegicus*).

Variabel utama yang keempat adalah peneliti, kondisi laboratorium, kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, usia, jenis kelamin, dan galur.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah fraksi n- heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun duwet.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah penurunan radang pada hewan uji setelah perlakuan dengan pemberian fraksi n-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun duwet

Variabel terkendali yaitu variabel yang dianggap berpengaruh, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian

ini adalah peneliti, kondisi laboratorium, kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, usia, jenis kelamin, galur.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun duwet adalah daun duwet yang diperoleh dari Madiun, Jawa Timur.

Kedua, serbuk daun duwet adalah serbuk yang berasal dari daun duwet yang telah dikeringkan, digiling dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun duwet adalah ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi serbuk daun duwet dengan pelarut etanol 70%, kemudian dipekatkan dengan vakum evaporator sampai didapat ekstrak pekat daun duwet.

Keempat, fraksi n-heksana, etil asetat, dan air adalah ekstrak kental dari ekstrak pekat dari etanol daun duwet yang difraksi hingga mendapatkan tiga pelarut dengan berbagai polaritas.

Kelima, natrium diklofenek adalah kontrol pembanding yang digunakan untuk membandingkan efek dari sediaan.

Keenam, tikus radang adalah tikus jantan yang berat badan rata-rata 200 gram yang mengalami peradangan akibat induksi karagenan 1% secara intraplantar.

Ketujuh, metode uji antiinflamasi induksi karagenin ialah metode uji dengan menyuntikkan karagenin 1% pada tikus galur wistar secara intraplantar setelah diberikan sediaan uji.

Kedelapan, aktivitas antiinflamasi adalah mengetahui aktivitas Inflamasi dari semua fraksi pada jam ke-1 hingga ke-6 data yang di ambil adalah nilai AUC.

C. Bahan, Alat dan Hewan Uji

1. Bahan

1.1. Bahan Sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk daun duwet yang diperoleh dari kebun petani pada Januari 2019 Madiun, Jawa Timur.

1.2. Bahan Kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah karagenin 1%, Natrium diklofenak, CMC 0,5 %, etanol 70%, n-heksana, etil asetat, aquadest, NaCl 0,9%.

2. Alat

Alat untuk membuat simplisia daun duwet adalah parutan untuk menghancurkan daun duwet , oven, mesin penggiling, ayakan nomor 40. Alat penyari untuk daun duwet yang digunakan antara lain terdiri dari botol coklat, batang pengaduk, corong glass, kain flanel, labu takar, *rotary evaporator*, beaker glass, gelas ukur (Pyrex), timbangan elektrik.

Alat yang digunakan untuk mengukur susut pengeringan adalah *mouister balance*. Alat yang digunakan untuk membuat dan menaruh natrium diklofenak dan karagenin adalah beaker glass, pipet volum, batang pengaduk, gelas ukur, botol putih 100 ml, alumunium foil, labu takar, timbangan elektrik, mortir dan stamfer. Alat yang digunakan untuk perlakuan hewan uji antara lain timbangan, spuit oral, jarum suntik, pipa kapiler dan kandang tikus.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih galur Wistar jantan dengan berat badan rata-rata 150-180 gram sebanyak 30 ekor digunakan untuk 6 kelompok percobaan.

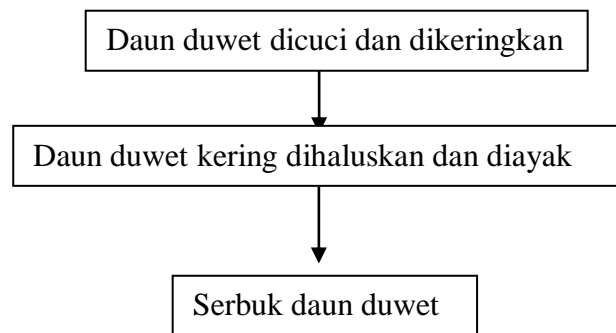
D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman daun duwet

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Program Studi Biologi Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

2. Pembuatan serbuk daun duwet

Sampel penelitian yang digunakan adalah daun duwet yang diperoleh dari Madiun, Jawa Tengah. Daun duwet diperoleh dalam keadaan segar kemudian dilakukan sortasi basah sebelum dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C. Setelah kering sampel dihaluskan menggunakan mesin penggiling kemudian diayak menggunakan ayakan nomor 40.



Gambar 5. Skema pengeringan bahan dan pembuatan serbuk

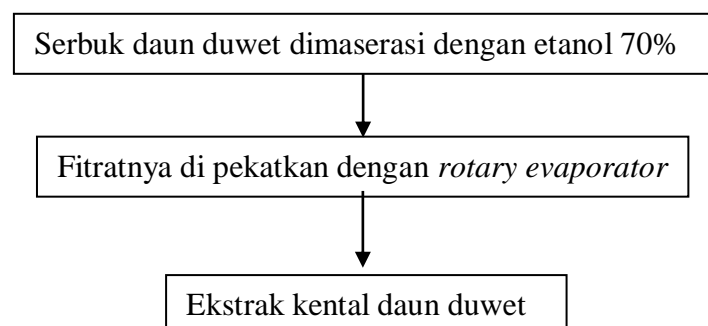
3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun duwet

Penetapan kadar air daun duwet dilakukan dengan cara menimbang serbuk daun duwet sebanyak 2 gram, bahan dimasukkan dalam alat moisture balance kemudian ditunggu sampai tanda alarm/ bunyi pada alat dan menunjukkan angka konstan dalam % (DepKes 2000).

4. Pembuatan ekstrak etanol

Ekstraksi dengan metode maserasi dengan perbandingan 1:10. Serbuk daun duwet ditimbang 500 gram kemudian direndam dengan etanol 70% dalam wadah botol coklat, dibiarkan selama 24 jam. Selama proses maserasi dilakukan proses pengadukan setiap 4 jam sekali selama 5 menit. Setelah 24 jam, larutan di disaring kemudian filtrat yang diperoleh diuapkan dengan *rotary evaporator* suhu 40°C kecepatan 100 rpm (BPOM 2004).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang di dapat}}{\text{bobot serbuk simplisia yang diekstraksi}} \times 100\%$$

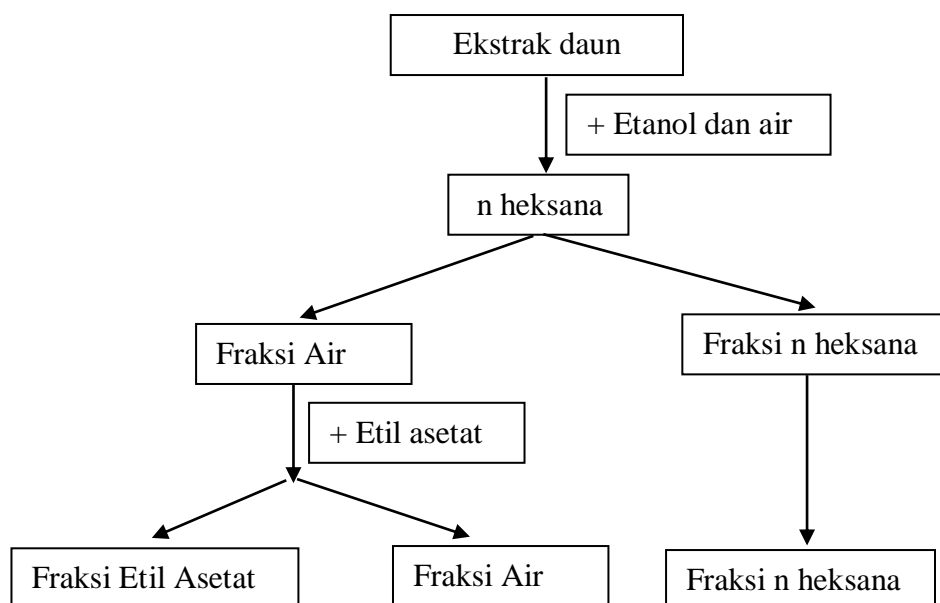


Gambar 6. Skema pembuatan ekstrak etanol daun duwet dengan metode maserasi

5. Pembuatan fraksi n-heksana, etil asetat dan air.

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan tiga pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya, yaitu n-heksana (non polar), etil asetat (semi polar) dan air (polar). Fraksinasi dilakukan dengan menimbang 10 gram ekstrak kental daun duwet, kemudian dilarutkan dengan etanol 5 ml dan pelarut air 70 ml hingga terdispersi sempurna. Kemudian difraksinasi dengan n-heksana 75 ml menggunakan corong pisah hingga diperoleh larutan jernih, diperoleh fraksi n-heksana dan fraksi air (dipisahkan). Fraksi air dipartisi dengan etil asetat 75 ml hingga diperoleh larutan jernih, dipisahkan fraksi air dengan fraksi etil asetat. Fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C, fraksi air dipekatkan dengan water bath (Firdausi *et al.* 2015)

$$\text{Rendemen fraksi (\%)} = \frac{\text{bobot fraksi}}{\text{bobot ekstrak}} \times 100\%$$



Gambar 7. Skema pembuatan fraksi- fraksi ekstrak etanol daun duwet

6. Identifikasi Kandungan Kimia

Identifikasi kandungan senyawa kimiawi yang terkandung di dalam sampel dilakukan dengan menggunakan pereaksi warna dengan metode analisis dengan KLT(Kromatografi lapis tipis).

$$\text{Hitung Rf} = \frac{\text{jarak tempuh senyawa}}{\text{jarak tempuh fase gerak}}$$

6.1. Uji steroid atau triterpenoid dengan KLT. Siapkan sampel dari ekstrak dan fraksi – fraksi daun duwet lalu di KLT dengan fase gerak kloroform : metanol (9:1) setelah terelusi amati bercak dengan lampu UV 254, UV 366, dan pereaksi *Lieberman Burchard* (dipanaskan 100°C selama 5-10 menit) biasa menggunakan pembanding stigmasterol. Bila peraksi berwarna ungu atau biru mengandung triterpenoid bebas atau steroid dan biasa berfloresensi pada UV 366 nm (Pratama et al 2012).

6.2. Uji alkaloid dengan KLT. Siapkan sampel dari ekstrak dan fraksi – fraksi daun duwet di KLT dengan fase gerak metanol : etil asetat : air (9:90:1) setelah terelusi amati bercak dengan lampu UV 254, UV 366, dan pereaksi *Dragendorff* biasa menggunakan pembanding atropine/efedrin. Noda alkaloid ada peredaman pada UV 254 nm, biasa berfloresensi pada UV 366 nm, dan pereaksi memberi warna coklat atau jingga pada sinar tampak (Marliana 2005).

6.3. Uji flavonoid dengan KLT. Siapkan sampel dari ekstrak dan fraksi – fraksi daun duwet di KLT dengan fase gerak n-butanol-asam asetat-air (4:1:5) setelah terelusi amati bercak dengan lampu UV 254, UV 366, dan uap ammonia, siroborat (dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit kemudian dilihat pada sinar tampak dan UV 366nm) biasa menggunakan pembanding Kuersertin. Pada UV 254 nm akan berpendar, UV 366 nm berfluoresensi biru, kuning, ungu gelap. Kemudian diuapi dengan ammonia akan berwarna kuning dan akan memudar kemudian disemprot dengan sitroborat dan dipanaskan akan membentuk warna kuning (Marliana 2005).

6.4. Uji saponin dengan KLT. Siapkan sampel dari ekstrak dan fraksi – fraksi daun duwet di KLT dengan fase gerak kloroform-metanol-air (13:7:2)

setelah terelusi amati bercak dengan lampu UV 254, UV 366, dan pereaksi anisaldehyd asam sulfat (dipanaskan 100°C selama 5-10 menit), *Lieberman Burchard* (dipanaskan 100°C selama 5-10 menit) biasa menggunakan pembanding glisirisin. Noda akan berwarna biru atau biru violet, kadang berwarna kuning dengan anisaldehyd sedangkan dengan *Lieberman Burchard* berwarna ungu, merah muda, merah atau violet untuk saponin triterpenoid dan hijau atau biru pada saponin steroid secara visual (Suharto 2012).

6.5. Uji tanin dengan KLT. Siapkan sampel dari ekstrak dan fraksi – fraksi daun duwet di KLT dengan fase gerak n-butanol-asam asetat-air (4:1:5) setelah terelusi amati bercak dengan lampu UV 254, UV 366, dan pereaksi FeCl₃ biasa menggunakan pembanding asam galat. Bila peraksi berwarna hijau atau biru dan biasa berfloresensi pada UV 366 nm (Hayati 2010).

7. Pembuatan larutan uji

7.1. Pembuatan suspensi CMC 0,5%. CMC ditimbang sebanyak 500 mg dan ditaburkan diatas air panas sebanyak 10 ml, kemudian ditunggu sampai mengembang. Air suling ditambahkan sedikit demi sedikit sambil digerus sampai 100ml diaduk sampai homogen.

7.2. Pembuatan natrium diklofenak. CMC ditimbang sebanyak 500 mg kemudian masukkan ke dalam cawan menguap yang berisi air panas sambil diaduk sampai mengembang. Natrium diklofnak 90 mg didispersikan ke dalam CMC yang sebelumnya dibuat kemudian digerus sambil ditambah dengan air suling sedikit demi sedkit sampai 100ml, hingga diperoleh konsentrasi 0,9 mg/ml

7.3. Pembuatan karagenin lamda. Larutan karagenin dengan konsentaras 1% dibuat dengan cara melarutkan 0,1 gram karagenin dalam NaCl 0,9% sedikit demi sedikit sampai 100 ml dalam beker glass. Kemudian sebelum diinduksikan larutan diinkubasi selama 1 hari dengan suhu 37°C Volume injeksi secara intraplantar pada telapak kaki setiap tikus sebanyak 0,1ml sudah dapat menimbulkan edema yang teramati secara jelas.

7.4 Pembuatan Sediaan Uji. CMC ditimbang sebanyak 500 mg kemudian masukkan kedalam cawan menguap yang berisi air panas sambil diaduk sampai mengembang. Sediaan uji dan fraksi ditimbang sesuai dosis dilarutkan kedalam

CMC sebelumnya dibuat kemudian digerus sambil ditambah dengan air suling sedikit demi sedikit sampai volume yang diinginkan dan diaduk sampai homogen. Tujuannya untuk memperkecil ukuran partikel.

8. Penentuan dosis

Volume maksimal larutan uji dapat diberikan pada tikus dengan berat badan 200 gram secara oral sebesar 2 ml.

8.1. Penentuan dosis natrium diklofenak. Dosis terapi natrium diklofenak untuk manusia 70 kg adalah 50 mg/70kg BB. Faktor konversi manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018 maka dosis Natrium diklofenak untuk tikus sebesar 0,9 mg/200 gram BB tikus (4,5 mg/kg BB tikus).

8.2. Penentuan dosis karagenan lamda. Dosis karagenan kadar 1% dalam NaCl 0,9% fisiologis, volume 0,1 ml yang diinduksikan secara intraplantar pada telapak kaki tikus jantan untuk memberikan udem pada telapak kaki (Ekowati).

8.3. Penentuan dosis ekstrak etanol daun duwet. Dosis ekstrak daun duwet 100 dan 200mg/kg bb didapat hasil adalah diambil yang terkecil 100mg/kg bb tikus yang efektif menurunkan inflamasi pada tikus jantan (Roy 2011).

8.4. Penentuan dosis fraksi n-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol duwet. Dosis yang diberikan pada tikus sesuai dengan hasil uji pendahuluan. Dari uji pendahuluan di dapatkan ekstrak etanol daun duwet sebagai antiinflamasi, sehingga dapat ditetapkan dosis fraksi dari persen rendemen fraksi dikalikan dengan dosis ekstrak daun duwet.

Kelompok I	: Kontrol inflamasi (Na. CMC)
Kelompok II	: Kontrol Pembanding (Na. diklofenak)
Kelompok III	: Ekstrak etanol 100mg/kg bb tikus
Kelompok IV	: Fraksi n-heksana 25,31 mg/kg bb tikus
Kelompok V	: Fraksi etil asetat 37.02 mg/kg tikus
Kelompok VI	: Fraksi air 37,67 mg/kg bb tikus

9. Prosedur uji antiinflamasi

Tikus sebelum diberikan sediaan uji terlebih dahulu diukur volume pada telapak kaki dengan cara memasukan telapak kaki kiri ke alat *pletismometer*

hingga tanda batas dan kaki kanan sebagai kontrol. Kemudian diinduksi dengan sediaan uji, setelah 30 menit diinduksi dengan karagenan 1 % untuk memberikan udem pada kaki sebelah kiri secara intraplantar setelah pemberian dibiarkan kurang lebih selama 30 menit untuk terbentuk udema, setelah 30 menit diukur kembali telapak kaki untuk volume udem pada jam 1 hingga jam 6 dengan alat pletismometer dan diukur % daya antiinflamasi

Pemberian fraksi n- heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanol daun duwet terhadap efek antiinflamasi dilakukan dengan menghitung volume edemanya.

$$Vu = Vt - Vn$$

Keterangan :

Vu: volume edema pada kaki tikus tiap waktu t

Vt: volume edema pada kaki tikus setelah disuntikan karagenin pada waktu (t)

Vn: volume edema pada kaki tikus sebelum di karagenin

Kemudian dari data volume udema di buat kurva perbandingan volume udema terhadap waktu. Kemudian dihitung AUC (area under the curve) yaitu luas daerah rata-rata dibawah kurva yang memiliki hubungan dengan udema setiap pengujian dalam satuan waktu dengan rumus :

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

Keterangan:

Vn : Volume udema rata –rata pada tn

Vn-1 : Volume udema rata –rata pada tn-1

tn : Waktu ke-n

tn-1 : Waktu 1/2 jam sebelumnya

n : Interval

Daya antiinflamasi dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

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

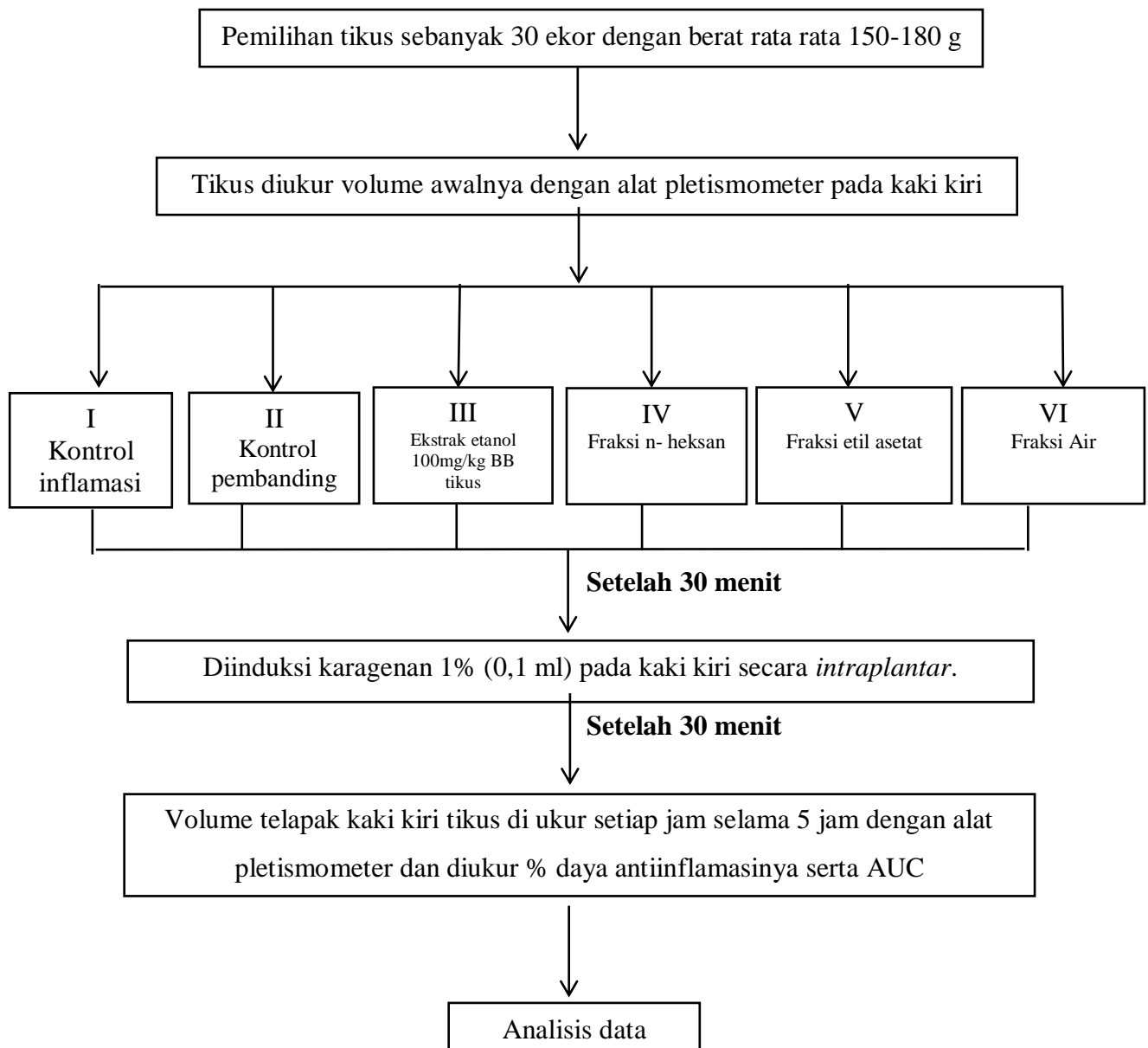
Keterangan :

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

AUCp: AUC kurva volume edema rata- rata terhadap waktu untuk kelompok perlakuan setiap individu

E. Analisis data

Dalam penelitian ini untuk melihat apakah data edema (AUC) terdistribusi normal atau tidak maka digunakan analisis statistik yaitu dengan menggunakan uji distribusi normal (One-Sample Kolmogorov-Smirnov). Apabila data yang ada terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan analisis homogenitas menggunakan *Homogeneity of Variance Test*. Apabila data yang ada dikatakan homogen ($p > 0,05$) maka analisis data dapat dilanjutkan dengan menggunakan uji parametrik *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan yang diperoleh bermakna atau tidak. Kemudian di uji tukey untuk melihat rata- rata dari kelompok perlakuan. Jika tidak terdistribusi normal atau tidak homogeny maka di uji dengan non parametrik yaitu *Kruskal wallis*.

F. Alur penelitian**Gambar 8. Alur penelitian**