

BAB III

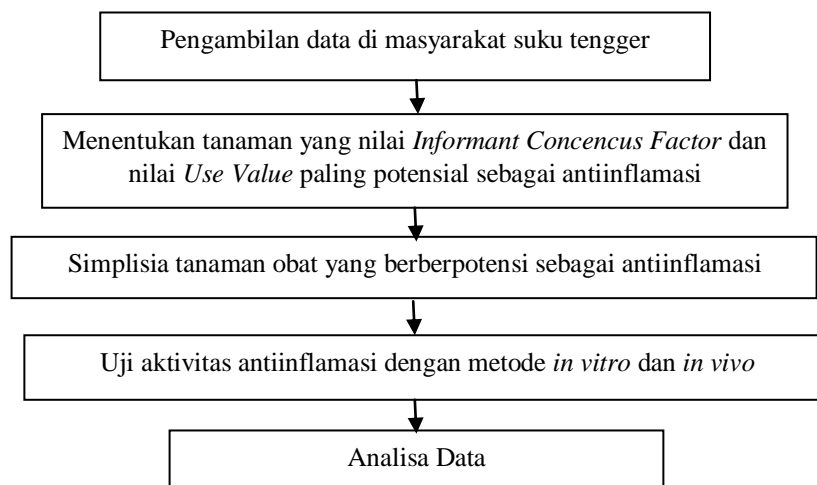
METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif etnomedisine di suku Tengger dan eksperimental uji aktivitas di laboratorium dengan metode kualitatif dan kuantitatif. Metode kualitatif digunakan untuk mengetahui penggunaan tumbuhan, hewan, dan bahan mineral yang diketahui dan digunakan Suku Tengger sebagai obat, sedangkan metode kuantitatif digunakan untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi dari tumbuhan yang diketahui dan digunakan Suku Tengger sebagai obat (Sudjatno, 1994).

Pengumpulan data etnomedisine di suku Tengger dengan melakukan wawancara *semi-structured* dan *structured* dengan informan yang mengetahui dan menggunakan tumbuhan sebagai obat (Pieroni *et al.*, 2002)

Penelitian dilakukan untuk melihat antiinflamasi membran sel darah merah secara *in vitro* dan antiinflamasi secara *in vivo*. Pengamatan antiinflamasi secara *in vitro* dilakukan dengan membaca absorbansi dengan menggunakan spektrofotometri *UV-Vis* dan pengamatan antiinflamasi secara *in vivo* dilakukan dengan menggunakan alat plestimometer.



Gambar 2. Rancangan Penelitian

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari 2019- Nopember 2019

2. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Desa Ngadas, Jetak, Wonotono, Ngadirejo, dan Ngadisari Kecamatan Sukapura, Kabupaten Probolinggo, Jawa Timur untuk memperoleh data penggunaan serta sampel tumbuhan obat tradisional, serta laboratorium Farmasi Universitas Setia Budi dan laboratorium Akafarma Sunan Giri Ponorogo untuk uji aktivitas antiinflamasi.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

1.1. Populasi etnomedisin. Masyarakat Suku Tengger di Desa Ngadas, Jetak, Wonotono, Ngadirejo, dan Ngadisari Kecamatan Sukapura, Kabupaten Probolinggo, Jawa Timur.

1.2. Populasi penelitian untuk uji aktivitas. Tumbuhan yang diketahui dan digunakan masyarakat Suku Tengger di Desa Ngadas, Jetak, Wonotono, Ngadirejo, dan Ngadisari Kecamatan Sukapura, Kabupaten Probolinggo, Jawa Timur sebagai obat.

2. Sampel

2.1. Subyek penelitian untuk etnomedisin. Masyarakat Suku Tengger yang mengetahui atau menggunakan tumbuhan, hewan, dan bahan mineral dalam pengobatan tradisional.

2.2. Sampel penelitian untuk uji aktivitas. Tumbuhan yang diketahui dan digunakan masyarakat Suku Tengger Desa Ngadas, Jetak, Wonotono, Ngadirejo, dan Ngadisari Kecamatan Sukapura, Kabupaten Probolinggo, Jawa Timur sebagai obat antiinflamasi.

3. Metode pengumpulan data

Prosedur yang digunakan dalam penelitian ini adalah populasi penduduk Suku Tengger di Desa Ngadas, Jetak, Wonotono, Ngadirejo, dan Ngadisari Kecamatan Sukapura, Kabupaten Probolinggo, Jawa Timur dan tanaman obat yang di gunakan oleh Suku Tengger, yaitu dengan cara mengambil semua data

penduduk yang menggunakan tanaman obat yang mempunyai sifat sebagai antiinflamasi pada tahun 2018 di Desa Ngadas, Jetak, Wonotoro, Ngadirejo, dan Ngadisari Kecamatan Sukapura, Kabupaten Probolinggo, Jawa Timur yang memenuhi kriteria inklusi. Data yang diperlukan pada penelitian ini adalah data primer, yaitu data kuisisioner dan hasil dari wawancara yang berisi jenis kelamin, umur, jenis tumbuhan yang digunakan, cara penggunaan, bagian yang digunakan.

Peneliti menggunakan sampel yang diambil dari ekstrak tanaman yang mempunyai nilai *Informant Concensus Factor* dan nilai *Use Value* paling baik. Ekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Teknik sampling yang di gunakan untuk uji aktivitas antiinflamasi diambil secara purposive yaitu penentuan sampel dengan pertimbangan tertentu atau sengaja (Sugiyono, 2007). Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Snowball Sampling*. Menurut Suharyanto *et al* (2009), sampel awal dapat ditentukan kemudian menentukan sampel berikutnya berdasarkan informasi awal yang diperoleh. Dalam metode sampling dimulai dengan kelompok kecil yang diminta untuk menunjukkan kawan masing-masing. Kemudian kawan-kawan itu diminta pula menunjukkan kawannya masing-masing lainnya, dan begitu seterusnya sehingga kelompok itu bertambah besar bagaikan bola salju (*Snowball*) yang kian bertambah besar bila meluncur dari puncak ke bawah (Soeratno, 1993). Pengumpulan data didapatkan melalui wawancara *semi-structured* dan *structured* dengan informan yang mengetahui atau menggunakan tumbuhan sebagai obat (Pieroni *et al.*, 2002), dengan menggunakan tipe pertanyaan *open-ended* (Notoatmodjo, 2002). Teknik tersebut lazim digunakan dalam penelitian etnobotani (Cotton, 1996). Apabila dimungkinkan juga menerapkan teknik observasi langsung (*participant observation*) dengan mengikuti sebagian aktivitas sehari-hari penduduk.

D. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama penelitian ini adalah tanaman obat yang di gunakan sebagai antiinflamasi oleh suku tengger diekstraksi secara maserasi dengan pelarut etanol 96 %.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah uji aktivitas antiinflamasi dan stabilitas membran sel dari ekstrak etanol dari tumbuhan obat yang di gunakan sebagai antiinflamasi oleh Suku Tengger dengan metode *in vivo* dan *in vitro* stabilisasi membran sel.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat, dalam tahap penelitian etnomedisine adalah jenis tanaman, khasiat tanaman, cara penggunaannya, sedangkan variabel terikat harga *ICF* dan *Uv* dari tumbuhan yang berpotensi antiinflamasi di suku tengger. Selanjutnya variabel bebas tahap penelitian eksperimen adalah konsentrasi ekstrak, fraksi air, etil asetat dan *n*-heksana dari ekstrak tumbuhan yang di gunakan sebagai obat oleh suku tengger. Sedangkan variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi variabel bebas, dalam hal ini adalah konsentrasi yang mempunyai aktivitas antiinflamasi dari ekstrak tanaman obat tradisional yang di gunakan oleh suku tengger.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, Tumbuhan yang mempunyai potensi antiinflamasi, diketahui dan digunakan oleh suku Tengger. Batasan antiinflamasi dalam penelitian ini adalah sediaan obat tradisional yang diketahui dan di gunakan oleh suku Tengger untuk mengobati penyakit dengan gejala inflamasi.

Kedua, *Informant Concensus Factor (ICF)* adalah nilai digunakan untuk menunjukkan keseragaman informasi yang diperoleh dari informan mengenai tumbuhan obat yang lebih efektif dalam mengobati penyakit inflamasi.

Ketiga, *Use Value* adalah nilai yang menunjukkan berapa banyak tumbuhan tersebut digunakan atau dianggap mempunyai potensi paling penting di suku Tengger.

Keempat, ekstrak maserasi tumbuhan yang mempunyai potensi dan nilai *Informant Concensus Factor* dan nilai *Use Value* sebagai antiinflamasi.

Kelima, aktivitas antiinflamasi menggunakan metode *in vivo* dan *in vitro* stabilisasi membran sel (*HRBC*) dari ekstrak dari tumbuhan yang di ketahui dan di gunakan oleh Suku Tengger dengan konsentrasi ekstrak masing- masing tanaman adalah: 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

1.1. Alat pengumpulan data. Alat atau instrumen yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan alat-alat pedoman wawancara (kuisisioner) serta sarana dokumentasi (kamera dan alat perekam).

1.2. Alat-alat laboratorium. Alat – alat laboratorium yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik (AND GF-02), labu Erlenmeyer (pyrex), labu ukur (pyrex), corong pisah, alat destilasi (pyrex), pipet volume (pyrex), mikropipet (socorex), autoclave, oven (memmert), sentrifuge (hettich EBA 200), *rotary evaporator*, *ultrasonic cleaner*, *water bath*, plestimometer spektrofotometer UV- Vis (shimadzu).

2. Bahan

2.1. Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tumbuhan yang di ketahui dan di gunakan oleh Masyarakat Suku Tengger yang berpotensi sebagai antiinflamasi. Bahan kemudian dikeringkan dan dibuat serbuk.

2.2. Bahan kimia. Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah dekstrosa, Natrium sitrat, asam sitrat, NaCl, dapar fosfat pH 7,4 (0,15M), Natrium diklofenak(merk) , Methyl prednisolon (merk), DMSO/Dimetil sulfosida (merk), serbuk magnesium, HCl pekat, amil alkohol, etanol 70%, n- heksana, etil asetat, Aquadest.

F. Jalannya Penelitian

1. Sampling data etnomedisine

Tahap pertama dari studi lapangan yang dilakukan dengan mencari informan di suku tengger. Kriteria informan pertama adalah ketua adat suku tengger, selanjutnya ketua adat menunjukkan atau merekomendasikan informan yang lain dengan syarat mengetahui dan pernah menggunakan tumbuhan tersebut untuk pengobatan. Para informan lain ditanya apakah menggunakan tumbuhan obat dan pengobatan *natural*, kemudian informasi spesifik selanjutnya didapatkan dengan menggunakan wawancara yang terstruktur dengan pertanyaan-pertanyaan

yang lebih kompleks, informan ditanya secara spesifik untuk menjelaskan metode dan cara preparasi dari pengobatan yang digunakan. Hal ini dilakukan dengan menggunakan media kuisisioner. Interview yang digunakan dalam penelitian bersifat *semi-structured* dan *structured* (Pieroni *et al*, 2002).

Dalam menentukan informan yang mempunyai pengetahuan penggunaan tumbuhan pada penelitian ini menggunakan metode *Snowball Sampling*. Dengan menentukan sampel awal kemudian menentukan sampel berikutnya berdasarkan informasi yang diperoleh (Suharyanto *et al.*, 2009). Metode sampling dimulai dengan kelompok kecil yang diminta untuk menunjukkan kawan masing-masing. Kemudian kawan-kawan itu diminta pula menunjukkan kawannya masing-masing lainnya, dan begitu seterusnya sehingga kelompok itu bertambah besar bagaikan bola salju (*Snowball*) yang kian bertambah besar bila meluncur dari puncak ke bawah (Soeratno, 1993).

Kuisisioner akan menjadi acuan dari pertanyaan yang akan diberikan kepada informan dan disertai dengan dokumentasi yang mendukung keabsahan kuisisioner. Kuisisioner yang diberikan berisikan nama tumbuhan, nama hewan, bahan mineral, penyakit yang diobati, cara penggunaan (dimakan/diminum, penggunaan luar/oles), bagian tumbuhan yang digunakan (akar, daun, kulit batang, kayu, bunga, biji, buah, kulit buah dan bagian lainnya), cara meramu obat (komposisi, digosok, direbus, ditumbuk, dihancurkan, dosis). Hal ini dilakukan dengan menggunakan media kuisisioner.

2. Teknik sampling data antiinflamasi

Yang di gunakan untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi dari tumbuhan, diambil secara purposive sampling yaitu penentuan sampel dengan pertimbangan tertentu atau sengaja (Sugiyono, 2007). Peneliti menggunakan sampel yang diambil dari ekstrak tanaman yang mempunyai nilai *Informant Concensus Factor* dan nilai *Use Value* paling baik dengan nilai mendekati 1 (satu) untuk uji aktivitas antiinflamasi. Setiap jenis tumbuhan diketahui dan digunakan sebagai bahan obat dicatat nama lokal, bagian yang digunakan, cara penggunaan, dan kegunaannya. Tumbuhan yang digunakan olah Suku Tengger sebagai obat berdasarkan hasil

studi etnomedisin dilakukan determinasi di MMB Batu Malang serta studi perbandingan dengan penelitian tumbuhan obat yang telah dilakukan Batoro *et al*, (2013), Ningsih (2016) dan Umiyah (2011).

Kedua, dilakukan ekstraksi sampel setiap tanaman yang mempunyai nilai ICF dan UV paling baik. Sampel kering sebanyak 300 gram yang dimasukkan ke dalam bejana maserasi dan direndam dalam cairan penyari etanol 96% sebanyak 3000 mL (1:10), disimpan pada suhu ruang selama 3 hari sambil sesekali diaduk dan kemudian disaring. Ampas yang diperoleh kemudian diekstraksi kembali. Ekstrak etanol yang diperoleh kemudian digabung dan disaring menggunakan kertas Whatmann No.1 dan filtrat yang didapatkan kemudian dipekatkan menggunakan evaporator dengan suhu di bawah 45°C hingga didapatkan ekstrak kental (Kaur & Rana, 2015; Kawarai *et al.*, 2016)

Ketiga, penetapan kadar air ekstrak tanaman obat. Dilakukan dengan cara ekstrak ditimbang sebanyak 10 gram kemudian diukur kadar airnya dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Waktu yang digunakan untuk mengukur kadar air sampai tidak ada tetesan pada alat *Sterling-Bidwell* dan ditunggu 60 menit baru dibaca skalanya, kemudian dihitung kadar air dalam satuan persen dengan rumus :

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume terbaca}}{\text{Berat bahan}} \times 100\%$$

Keempat, penetapan susut pengeringan. Dilakukan dengan metode gravimetrik. Alat yang digunakan adalah *Moisture Balance* dengan 3 kali replikasi. Caranya dengan memasukan 2 g ekstrak tanaman dalam wadah yang sudah ditara. Wadah tersebut kemudian dimasukkan ke dalam alat *Moisture Balance*. Pengoperasian alat telah selesai jika alat tersebut berbunyi dengan ditandai adanya bunyi tertentu, kemudian catat hasil susut pengeringan (dalam satuan %).

Kelima, ekstraksi. Sampel tumbuhan kering sebanyak 1000 g simplisia kering direndam dalam 10 L etanol 96% selama 5 hari dalam bejana maserasi. Ekstrak tumbuhan disaring kertas saring Whatman No. 1 ke dalam botol vial. Filtrat yang didapatkan kemudian dipekatkan menggunakan evaporator dengan

suhu dibawah 45°C hingga didapatkan ekstrak kental (Kaur & Rana, 2015; Kawarai *et al.*, 2016).

Keenam, uji kandungan kimia ekstrak menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Dilakukan pada semua tanaman yang mempunyai aktivitas antiinflamasi hasil etnomedisine di suku Tengger. Uji flavanoid dengan KLT menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan asam formiat : etil asetat : air : asam asetat glasial (11:100:57:11). Adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan bercak berwarna kuning di bawah sinar UV 254 dan 366 nm setelah disemprotkan menggunakan rutin

Uji fenolik dengan KLT dilakukan dengan menotolkan sampel pada lempeng Silika Gel GF₂₅₄. Lempeng kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* berisi fase gerak n-butanol: asam asetat : air (4:1:5) lalu dieluaskan hingga batas, lempeng dikeringkan dan diamati di bawah sinar UV 254 nm dan UV 366 nm dengan pereaksi semprot FeCl₃.

Uji Saponin. Untuk mengetahui adanya senyawa saponin maka dilakukan identifikasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis, fase diam silika gel GF 254 dan fase geraknya kloroform : metanol : air (6 : 3 : 1). Dideteksi dibawah sinar UV 254 berwarna kuning dan dibawah sinar UV 366 berwarna hijau. Pereaksi semprot anisaldehyd dengan hasil berwarna ungu dan dibawah bercak sinar biasa berwarna biru (Harborne 1987).

3. Uji aktivitas stabilitas membran sel

3.1 Pembuatan larutan alsever steril. Larutan alsever steril dibuat dengan menambahkan 2 g dekstrosa, 0,8 g natrium sitrat, 0,05 g asam sitrat dan 0,42 g NaCl dilarutkan dalam aquades sampai 100 ml pada suhu ruang. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 115°C selama 30 menit (Kumar *et al.*, 2012).

3.2 Pembuatan dapur fosfat pH 7,4 (0,15 M). Pembuatan dapur fosfat pH 7,4 adalah dengan menambahkan sebanyak 2,671 g dinatrium hydrogen fosfat (Na₂HPO₄.2H₂O) dilarutkan dalam aquades sampai 100 ml (0,15 M) .2,070 g natrium dihydrogen fosfat (NaH₂PO₄ . H₂O) dilarutkan dalam aquedes sampai 100

ml (0,15 M) dicampurkan dengan 19 ml larutan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,15 M) pada suhu ruang, kemudian disetirilisasi dengan autoklaf pada suhu 115°C (ruzin, 1999).

3.3 Pembuatan isosalin. Pembuatan isosalin dengan mencampurkan 0,85 gram NaCl dilarutkan dalam dapur fosfat pH 7,4 (0,15 M) sampai volume 100 ml pada suhu ruang, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 115°C (Oyedapo *et al.*, 2010).

3.4 Pembuatan Hiposalin. Pembuatan hiposalin dengan menambah 0,25 gram NaCl dilarutkan dalam dapur fosfat pH 7,4 (0,15 M) sampai volume 100 ml pada suhu ruang, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 115°C (Oyedapo *et al.*, 2010).

3.5 Pembuatan suspensi sel darah merah. Metode pembuatan suspensi sel darah merah dengan cara darah diambil dari sukarelawan sehat (dengan melampirkan *ethical clearance*) sebanyak 10 ml lalu dimasukkan kedalam tabung sentrifuge yang telah berisi larutan alsever steril sebanyak 10 ml, campuran darah dan larutan alsever steril tersebut kemudian disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 27°C , larutan alsever digunakan sebagai antikoagulan agar darah tidak mengalami penggumpalan selanjutnya supernatan yang terbentuk dipisahkan menggunakan pipet steril. Endapan sel-sel darah yang tersisa kemudian dicuci dengan larutan isosalin yang berfungsi untuk mencuci endapan sel-sel darah dan disentrifugasi kembali. Proses tersebut diulang 4 kali sampai isosalin jernih. Volume sel darah diukur dan ditambah dengan isosalin sehingga didapatkan suspensi sel darah merah dengan konsentrasi 10% v/v dengan cara mencampur 1 ml darah ditambah larutan isosalin 9 ml. suspensi sel darah tersebut disimpan pada suhu 4°C jika belum digunakan (Oyedapo *et al.*, 2010).

3.6 Pengujian aktivitas ekstrak terhadap stabilisasi membran eritrosit. Untuk menentukan aktivitas ekstrak terhadap stabilisasi membran eritrosit, larutan yang digunakan sebagai berikut:

3.6.1 Pembuatan larutan uji. Larutan uji (4,5 ml) terdiri dari 1 ml dapur fosfat pH 7,4 (0,15 M), 2 ml hiposalin, 0,5 ml suspensi sel darah merah dan 1 ml larutan sampel.

3.6.2 Pembuatan larutan kontrol positif. Larutan kontrol positif terdiri dari 1 ml dapar fosfat pH 7,4 ml (0,15M), 2 ml hiposalin, 0,5 ml suspensi sel darah merah dan 1 ml larutan Natrium diklofenak

3.6.3 Pembuatan larutan kontrol larutan uji. Larutan kontrol larutan uji terdiri dari 1 ml dapar berisi fosfat pH 7,4 (0,15 M) 2 ml hiposalin, 0,5 ml larutan isosalin sebagai pengganti suspensi sel darah merah dan 1 ml larutan sampel

3.6.4 Pembuatan larutan kontrol negatif. Pembuatan larutan kontrol negatif terdiri dari 1 ml dapar fosfat p H 7,4 (0,15 M), 2 ml hiposalin 0,5 ml suspensi sel darah merah dan 1 ml larutan isosalin sebagai pengganti larutan sampel. Setiap larutan diatas diinkubasi pada 37°C selama 30 menit dan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang didapat diambil dan kandungan hemoglobinnya, karena hemoglobin adalah suatu pigmen pembentuk warna dari sel darah merah, apabila sel darah merah mengalami lisis pigmen sel darah merah dapat dihitung sehingga sampel tidak dapat mempertahankan membran selnya. Pengukuran stabilitas membran sel darah merah dengan menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 560 nm (Oyedapo *et al.*, 2010). Perhitungan stabilitas sel darah merah dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ stabilitas} = 100 - \left[\frac{\text{Abs Larutan uji} - \text{Abs Larutan Kontrol Larutan Uji}}{\text{Abs Larutan Kontrol Negatif}} \right] \times 100\%$$

Kemudian uji aktivitas stabilitas membran dinyatakan dengan parameter IC_{50} (*Inhibitor Consentration*) yaitu konsentrasi senyawa uji yang menghambat lisis membran sel sebesar 50 %. Nilai IC_{50} ditentukan dari persamaan regresi linier antara konsentrasi sampel dengan persentase stabilitas membran. Persamaan regresi linier, harga r tabel dengan taraf kepercayaan 0,95. Harga IC_{50} berbanding terbalik dengan aktivitas stabilitas membran yaitu semakin besar harga IC_{50} maka aktivitas stabilitas membran semakin kecil, artinya konsentrasi yang dibutuhkan untuk stabilitas membran sebesar 50 % semakin besar.

3.6.5 Penyiapan konsentrasi ekstrak dan natrium diklofenak. Sebanyak 50 mg ekstrak dan fraksi dilarutkan dalam isosalin sampai 50 ml (1000 ppm) pada suhu ruang. Begitu juga dengan Na diklofenak dilarutkan dalam 50 ml

isosalin (1000 ppm) pada suhu ruang. kemudian kedua larutan tersebut diencerkan menjadi beberapa seri konsentrasi (50,100,200,400 dan 800 ppm).

4. Uji antiinflamasi pada tikus putih jantan secara *invivo*

4.1 Pembuatan Kontrol negatif. Kontrol negatif menggunakan CMC 1%. Menimbang 100 mg serbuk CMC dimasukan kedalam cawan penguap kemudian ditambah sedikit akuades dan dipanaskan sampai mengembang, setelah mengembang dimasukan ke dalam mortir dan menggerusnya dengan menambah sedikit demi sedikit akuades hingga 100,0 mL.

4.2 Pembuatan Kontrol positif. Kontrol positif digunakan larutan uji Metil prednisolon 4 mg. Cara pembuatan suspensi Metil prednisolon adalah serbuk Metil prednisolon digerus didalam mortir sampai homogen dan dimasukan ke dalam labu takar 100,0 mL ditambahkan CMC sampai tanda batas.

4.3 Pembuatan larutan karagenin 1%. Pelarut untuk larutan karagenin 1% digunakan larutan garam fisiologis konsentrasi 0.9% dibuat dengan cara 0.9 g NaCl dilarutkan dengan akuades hingga volume 100,0 mL.

4.4 Pembuatan Larutan uji. Larutan uji pembuatan edema digunakan larutan karagenin konsentrasi 1% dibuat dengan cara 1 g karagenin dilarutkan dengan garam fisiologis NaCl 0,9% sampai volume 100,0 mL.

4.5 Penyiapan hewan uji. Hewan uji tikus jantan galur wistar dari Laboratorium Universitas Setia Budi. Tikus diadaptasikan terhadap lingkungan selama satu minggu dengan diberi pakan standar dan diperiksa kondisi kesehatan. Semua hewan uji dipelihara dalam kondisi yang sama, sebelum digunakan tikus diadaptasikan dengan lingkungan penelitian selama satu minggu sebelum digunakan dan sebelum pemberian perlakuan. Pengaturan suhu dan kelembaban relatif dari kandang harus diperhatikan karena hal tersebut dapat mempengaruhi uji dan hasil penelitian. Tikus yang telah diadaptasikan selama satu minggu kemudian ditimbang untuk menentukan dosis dan dilakukan penelitian.

Perlakuan terhadap hewan uji. Penelitian ini menggunakan 25 tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) jantan yang terbagi dalam 5 kelompok perlakuan. Setiap kelompok terdiri dari 5 tikus sebagai ulangan (replikasi). Metode uji yang digunakan adalah metode Winter yang dimodifikasi (Turner 1965), edema buatan

ditimbulkan dengan menginjeksikan karagenin 1% yang dilarutkan dalam larutan fisiologis (NaCl 0,9%) sebanyak 1,0 mL pada kaki tikus secara subplantar. Rakhmawati (1997) melaporkan pada dosis tersebut sudah dapat menimbulkan udemata yang teramati secara jelas. Bahan uji yang diberikan adalah ekstrak dari tanaman terpilih yang memiliki kandungan saponin, flavonoid, dan steroid. Perlakuan yang diberikan pada masing-masing kelompok adalah sebagai berikut:

- I. Kontrol negatif CMC 1% (plasebo) 0,1 mg/kg BB tikus
- II. Kontrol positif Metil prednisolon 0,072 mg/kg BB tikus
- III. Ekstrak etanol tanaman terpilih 105 mg/kg BB tikus
- IV. Ekstrak etanol tanaman terpilih 210 mg/kg BB tikus
- V. Ekstrak etanol tanaman terpilih 560 mg/kg BB tikus

Penelitian ini dengan dosis 105, 210, dan 560 mg/kg BB, dan diperoleh dosis yang paling efektif sebagai anti inflamasi adalah 560 mg/kg BB (Rammohan & Reddy 2010). Volume awal kaki tikus diukur sebelum diberi perlakuan, dengan menggunakan pletismometer, dengan cara telapak kaki tikus yang telah ditandai sebatas mata kaki dimasukkan (sampai tanda) pada pletismometer. Setelah semua mendapat perlakuan, pengukuran dilakukan lagi pada jam ke 0,5;1; 2; 3; 4;5 sampai 24.

4.6 Analisis data uji antiinflamasi secara *invivo*. Efek pemberian ekstrak etanol tanaman terpilih terhadap anti inflamasi Metyl Prednisolon dilakukan dengan menghitung volume udemanya. Volume udemata merupakan selisih kaki tikus sebelum dan sesudah diradangkan dengan injeksi supplantar karagenin 1%.

$$V_u = V_t - V_o$$

Keterangan:

V_u : Volume udemata kaki tikus tiap waktu t.

V_t : Volume udemata kaki tikus setelah diradangkan dengan karagenin 1% pada waktu t.

V_o : Volume udemata kaki tikus setelah diradangkan dengan karagenin 1%.

Setelah diperoleh data volume udemata, kemudian dibuat kurva perbandingan volume udemata versus waktu. Kemudian dihitung AUC (*Area Under the Curve*) yaitu luas daerah rata-rata di bawah kurva yang merupakan hubungan volume udemata rata-rata tiap satuan waktu. Dengan rumus:

$$AUC_{tn-1}^{tn} = \frac{V_{tn-1} + V_{tn}}{2} (tn - tn - 1)$$

Keterangan :

V_{tn-1} : Volume udema rata-rata pada $tn-1$

V_{tn} : Volume udema rata-rata pada tn

Persentase daya anti inflamasi dapat di hitung dengan rumus sebagai:

$$\% \text{ Daya Anti Inflamasi} = \frac{AUC_k - AUC_p}{AUC_k} \times 100\%$$

Keterangan :

AUC_k : AUC kurva volume udema rata-rata terhadap waktu untuk kontrol negative.

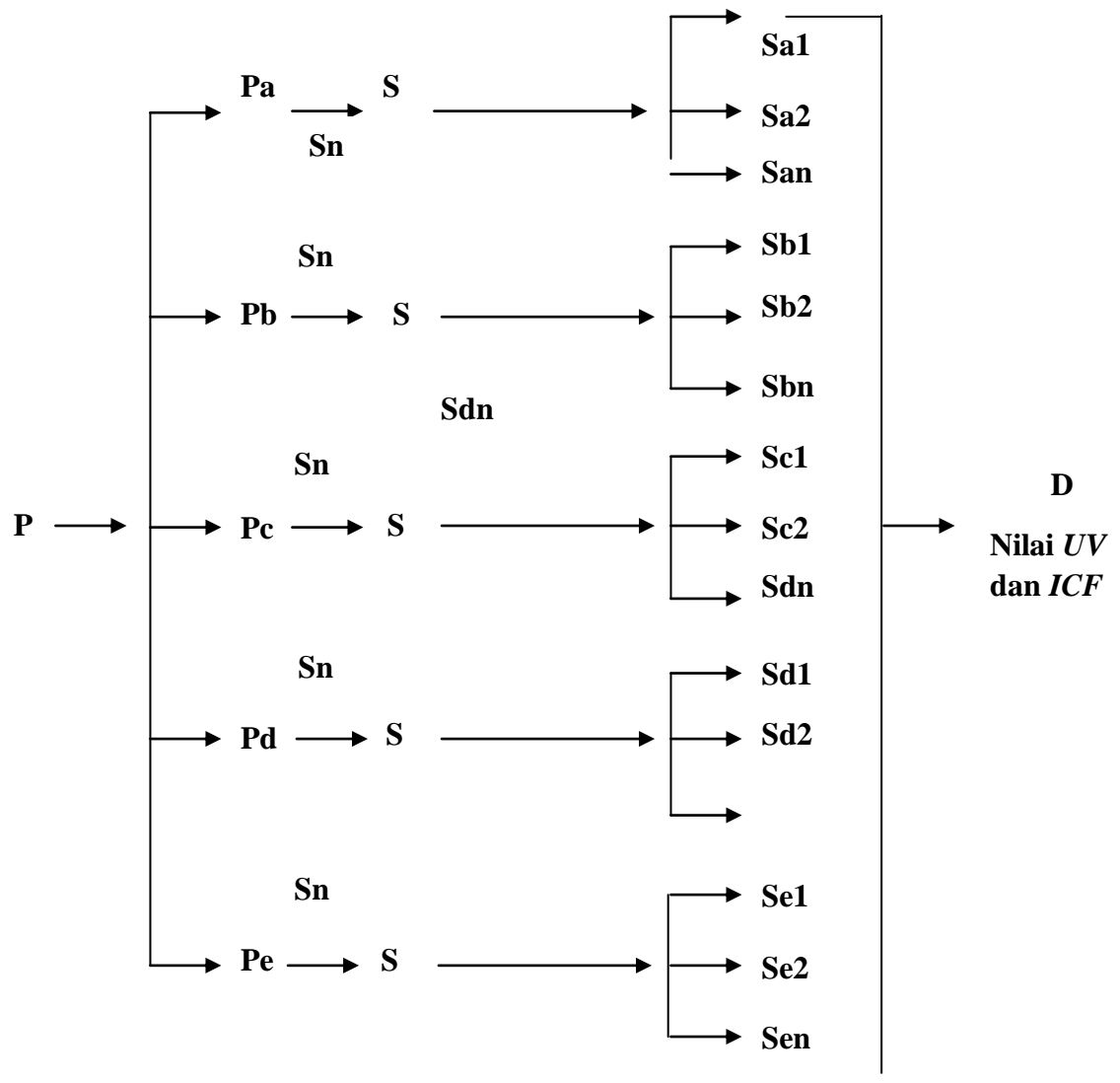
AUC_p : AUC volume udema rata-rata terhadap waktu kelompok perlakuan tiap individu.

Analisis statistik digunakan dalam pengolahan data, sebelumnya dilakukan uji hipotesis untuk mengetahui apakah ada perbedaan persentase penghambatan udem pada kaki tikus dari kelompok perlakuan dan untuk menentukan kelompok perlakuan yang memiliki daya antiinflamasi paling optimal, data kuantitatif AUC antar kelompok perlakuan di uji normalitasnya. Hal ini perlu dilakukan untuk menentukan apakah uji hipotesis dilakukan dengan metode parametrik atau non parametrik. Kriteria ujinya adalah bila nilai signifikansi $> 0,05$ maka data terdistribusi normal dan pengujian hipotesisnya dilakukan dengan metode parametrik salah satunya dengan anova satu jalan. Bila anova satu jalan menunjukkan beda nyata dilihat dari *test of homogeneity of variances* untuk mengetahui variasinya sama atau tidak sama. Kriteria *test of homogeneity of variances* adalah bila signifikasinya $> 0,05$ maka varian sama, sebaliknya bila nilai signifikasinya $< 0,05$ maka varian tidak sama. Jika varian sama maka tahap selanjutnya dilakukan uji *tukey HSD (Honestly Significant Difference)* dengan kepercayaan 95%, atau dengan uji SNK atau uji LSD, sedangkan jika variannya tidak sama dapat dilanjutkan dengan uji Dunnett's T3.

G. Alur Penelitian

Pengambilan sampel penelitian ini tahap pertama dari studi lapangan yang dilakukan dengan mencari informan di suku tengger. Kriteria informan pertama adalah ketua adat suku tengger, selanjutnya ketua adat menunjukkan atau merekomendasikan informan yang lain dengan syarat mengetahui dan pernah

menggunakan tumbuhan tersebut untuk pengobatan. Para informan lain ditanya apakah menggunakan tumbuhan obat dan pengobatan *natural*, kemudian informasi spesifik selanjutnya didapatkan dengan menggunakan wawancara yang terstruktur dengan pertanyaan-pertanyaan yang lebih kompleks, informan ditanya secara spesifik untuk menjelaskan metode dan cara preparasi dari pengobatan yang digunakan. Hal ini dilakukan dengan menggunakan media kuisioner. Interview yang digunakan dalam penelitian bersifat *semi-structured* dan *structured* seperti pada gambar 3.

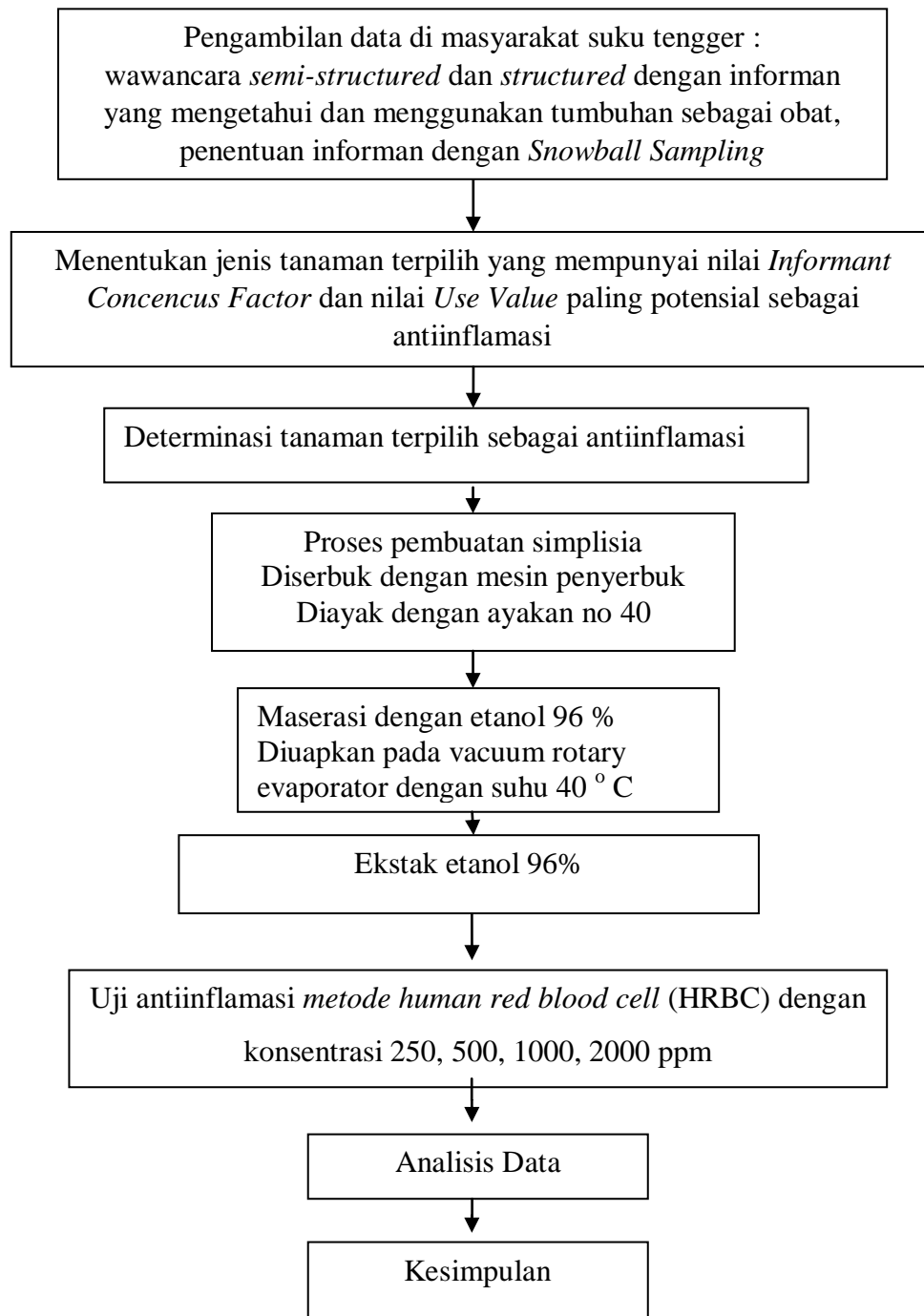


Gambar 3. Rancangan penelitian untuk pengambilan data di masyarakat suku tengger.

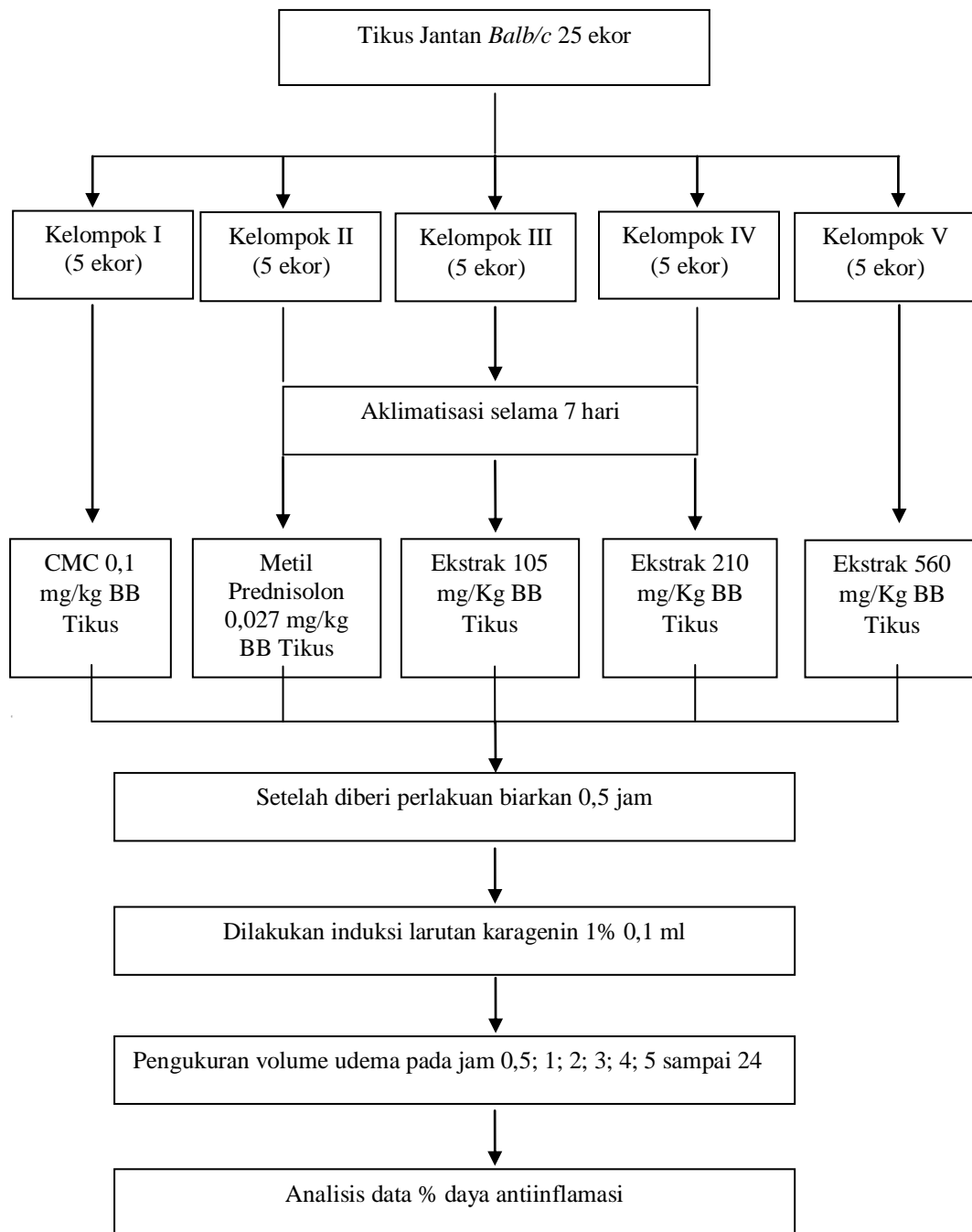
Keterangan :

P = Populasi
 Pa = Populasi desa Ngadas
 Pb = Populasi desa Jetak
 Pc = Populasi desa Wonotoro
 Pd = Populasi desa Ngadirejo
 Pe = Populasi desa Ngadisari
 Sn = Pengambilan *Snowball*
 Sen = Sampel desa Ngadisari seterusnya
 Sa1 = Sampel desa Ngadas 1
 Sa2 = Sampel desa Ngadas 2
 San = Sampel desa Ngadas seterusnya
 Sb1 = Sampel desa Jetak 1

Sb2 = Sampel desa Jetak 2
 Sc1 = Sampel desa Wonotoro 1
 Sc2 = Sampel desa Wonotoro 2
 Scn = Sampel desa Wonotoro seterusnya
 Sd1 = Sampel desa Ngadirejo 1
 Sd2 = Sampel desa Ngadirejo 2
 Sdn = Sampel desa Ngadirejo seterusnya
 Se1 = Sampel desa Ngadisari 1
 Sbn = Sampel desa Jetak seterusnya
 Se2 = Sampel desa Ngadisari 2
 D = Data
 S = Sampel



Gambar 4. Rancang penelitian uji aktivitas antiinflamasi.



Gambar 5. Rancang penelitian uji aktivitas antiinflamasi *in vivo*.

H. Analisis data

1. Analisis *Use Value*

Menurut Alburquerque (2006), nilai *Use Value* didasarkan pada jumlah responden yang menggunakan dan atau mengetahui suatu tumbuhan tertentu. Salah satu metode kuantitatif ini bertujuan untuk menunjukkan spesies yang dianggap paling penting oleh suatu populasi tertentu. Dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut (Gazzaneo *et al*, 2005).

$$UV = \frac{\sum U}{n}$$

Keterangan :

UV = Nilai *Use Value*

$\sum U$ = Jumlah informan yang mengetahui dan atau menggunakan spesies

n = Jumlah informan keseluruhan

2. Analisis *Informant Concensus Factor*

ICF akan mempunyai nilai yang rendah (mendekati 0) jika tanaman dipilih secara acak atau tidak adanya pertukaran informasi dari penggunaan tanaman dari masing-masing informan dan akan mempunyai nilai yang tinggi (mendekati 1) jika tanaman digunakan oleh banyak informan dan terjadi pertukaran informasi (Alburquerque, 2005). Heinrich *et al.* dalam Canales *et al.* (2005) menyebutkan bahwa, *Informant Concensus Factor* digunakan untuk menentukan tumbuhan yang sangat menarik dalam mencari senyawa bioaktif. *Informant Concensus Factor* digunakan untuk mengidentifikasi kategori yang paling penting pada suatu penelitian dan digunakan sebagai parameter pada spesies tanaman untuk dilaksanakan penelitian yang lebih mendalam *Informant Concensus Factor* dapat dihitung menggunakan rumus (Almeida *et al.*, 2006).

$$ICF = \frac{nar - na}{nar - 1}$$

Keterangan:

ICF = Nilai *Informant Concensus Factor*

nar = Jumlah informan yang mengetahui dan menggunakan spesies dalam satu jenis penyakit

na = Jumlah spesies dalam satu jenis penyakit

3. Analisis data uji antiinflamasi secara *invivo*

Efek pemberian ekstrak etanol tanaman terpilih terhadap anti inflamasi Metyl Prednisolon dilakukan dengan menghitung volume udemanya. Volume edema merupakan selisih kaki tikus sebelum dan sesudah diradangkan dengan injeksi supplantar karagenin 1%.

$$V_u = V_t - V_o$$

Keterangan:

V_u : Volume edema kaki tikus tiap waktu t .

V_t : Volume edema kaki tikus setelah diradangkan dengan karagenin 1% pada waktu t .

V_o : Volume edema kaki tikus setelah diradangkan dengan karagenin 1%.

Setelah diperoleh data volume edema, kemudian dibuat kurva perbandingan volume edema versus waktu. Kemudian dihitung AUC (*Area Under the Curve*) yaitu luas daerah rata-rata di bawah kurva yang merupakan hubungan volume edema rata-rata tiap satuan waktu. Dengan rumus:

$$AUC_{tn-1}^{tn} = \frac{V_{tn-1} + V_{tn}}{2} (tn - tn - 1)$$

Keterangan :

V_{tn-1} : Volume edema rata-rata pada $tn-1$

V_{tn} : Volume edema rata-rata pada tn

Persentase daya anti inflamasi dapat di hitung dengan rumus sebagai :

$$\% \text{ Daya Anti Inflamasi} = \frac{AUC_k - AUC_p}{AUC_k} \times 100\%$$

Keterangan :

AUC_k : AUC kurva volume edema rata-rata terhadap waktu untuk kontrol negative.

AUC_p : AUC volume edema rata-rata terhadap waktu kelompok perlakuan tiap individu.

Analisis statistik digunakan dalam pengolahan data, sebelumnya dilakukan uji hipotesis untuk mengetahui apakah ada perbedaan persentase penghambatan edem pada kaki tikus dari kelompok perlakuan dan untuk menentukan kelompok perlakuan yang memiliki daya antiinflamasi paling optimal, data kuantitatif AUC antar kelompok perlakuan di uji normalitasnya. Hal ini perlu dilakukan untuk menentukan apakah uji hipotesis dilakukan dengan metode parametrik atau non parametrik. Kriteria ujinya adalah bila nilai signifikansi $> 0,05$ maka data terdistribusi normal dan pengujian hipotesisnya dilakukan dengan metode parametrik salah satunya dengan anova satu jalan. Bila anova satu jalan

menunjukkan beda nyata dilihat dari *test of homogeneity of variances* untuk mengetahui variasinya sama atau tidak sama. Kriteria *test of homogeneity of variances* adalah bila signifikasinya $> 0,05$ maka varian sama, sebaliknya bila nilai signifikasinya $< 0,05$ maka varian tidak sama. Jika varian sama maka tahap selanjutnya dilakukan uji *tukey HSD (Honestly Significant Difference)* dengan kepercayaan 95%, atau dengan uji SNK atau uji LSD, sedangkan jika variannya tidak sama dapat dilanjutkan dengan uji Dunnett's T3.

4. Analisis hasil uji stabilitas membran sel

Dari hasil interview informan, diketahui kegunaan tumbuhan sebagai obat menurut Suku Tengger. Tumbuhan yang terpilih untuk dilakukan penelitian lebih mendalam sebagai obat dilakukan studi literature dengan pendekatan kemotaksonomi serta uji antiinflamasi. Data uji antiinflamasi adalah data perhitungan absorbansi sampel yang dibandingkan dengan larutan kontrol selanjutnya data tersebut akan analisis menggunakan dianalisis secara statistik dengan menggunakan Uji Normalitas *One-Sample Kolmogorov Smirnov*. tujuannya untuk melihat normalitas distribusi data stabilitas membran sel darah merah dan Uji Homogenitas (*Levene*) yang bertujuan untuk melihat homogenitas dari data DO data stabilitas membran sel darah merah. Jika data DO biofilm bervariasi homogen maka dilanjutkan Uji *One-Way ANOVA* tujuannya untuk melihat data stabilitas membran sel darah merah antar konsentrasi terdapat perbedaan secara bermakna atau tidak. Kemudian apabila data DO aktivitas antibiofilm berbeda secara bermakna ($p \leq 0,05$), sehingga dilanjutkan uji *post hoc*.