

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Dalam penelitian ini ada enam kelompok yang dipilih secara acak yaitu :

Tabel 3. 1 Pembagian Kelompok Hewan Uji

Kelompok	Perlakuan
Kontrol Positif	Induksi Karagenan 1% + Natrium Diklofenak 6,5 mg/kgBB
Kontrol Negatif	Induksi Karagenan 1%
Kontrol Pelarut	Induksi Karagenan 1% + Na CMC 0,1%
Perlakuan Dosis 1	Induksi Karagenan 1% + Ekstrak Etanol Biji Karika 100 mg/kgBB
Perlakuan Dosis 2	Induksi Karagenan 1% + Ekstrak Etanol Biji Karika 200 mg/kgBB
Perlakuan Dosis 3	Induksi Karagenan 1% + Ekstrak Etanol Biji Karika 400 mg/kgBB

B. Lokasi Penelitian

1. Pengumpulan biji karika diperoleh dari rumah produksi dan pusat oleh-oleh “Exotic Carica” di dataran tinggi Dieng, Kabupaten Wonosobo, Jawa Tengah.
2. Determinasi tumbuhan karika dilakukan di Laboratorium Ekologi Biosistemik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.
3. Determinasi hewan uji mencit putih jantan galur *Swiss webster* diperoleh dari “Farmouse” Jalan Imam Bonjol 108, Salatiga.
4. *Ethical Clearance Prosedure* hewan uji dilakukan di Komite Etik Penelitian (KEP) Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.

5. Uji fitokimia dan pembuatan ekstrak etanol biji karika dilakukan di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.
6. Uji aktivitas antiinflamasi terhadap tebal edema dan jumlah leukosit hewan percobaan dilakukan di Laboratorium Biologi Program Studi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.

C. Subjek Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji karika (*Carica pubescens*) yang diperoleh dari daerah dataran tinggi Dieng, Kabupaten Wonosobo, Jawa Tengah.

Penentuan jumlah sampel hewan uji menggunakan rumus Federer (Nugroho, 2018).

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan : t = banyaknya kelompok

n = banyaknya hewan uji tiap kelompok

Pada penelitian ini sampel hewan uji akan dibagi menjadi 6 kelompok, sehingga :

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

$$(n-1)(5) \geq 15$$

$$n-1 \geq 15/5$$

$$n \geq 3 + 1$$

$$n \geq 4$$

Dari penentuan jumlah sampel hewan uji menggunakan rumus Federer maka penelitian ini menggunakan jumlah sampel hewan uji mencit putih jantan (*Swiss webster*) sebanyak 24 ekor yang dibagi menjadi 6 kelompok hewan uji sehingga masing-masing kelompoknya berisi 4 ekor hewan uji. Mencit putih jantan yang digunakan memenuhi kriteria sebagai berikut :

1. Kriteria Inklusi
 - a. Mencit putih jantan (*Swiss webster*)
 - b. Berat badan mencit 20 – 30 gram
 - c. Umur 2-3 bulan
2. Kriteria Eksklusi
 - a. Mencit mati atau sakit pada saat penerimaan sebelum masa penelitian
 - b. Mencit mati atau sakit selama masa penelitian berlangsung
 - c. Mencit dengan kelainan anatomis

D. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol biji karika (EEBK) diperoleh dari proses ekstraksi dengan maserasi serbuk simplisia biji karika dalam etanol 70% yang kemudian dilakukan pemekatan ekstrak menggunakan rotary evaporator dan penangas air pada suhu 50°C.
2. Inflamasi ditunjukkan dengan reaksi udema atau pembengkakan yang timbul pada telapak kaki mencit setelah diinduksi karagenan 1% secara intraplantar.
3. Tebal udema adalah besarnya udema pada telapak kaki mencit yang diukur dengan jangka sorong dalam satuan mm.jam.

4. Jumlah leukosit saat terjadi inflamasi akan mengalami peningkatan dalam darah yang diukur dengan *hematology analyzer* dalam satuan ($\times 10^9/L$).
5. Aktivitas antiinflamasi adalah berkurangnya tebal edema pada telapak kaki mencit dan menurunnya jumlah leukosit setelah diberi perlakuan sediaan uji.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Sesuai dengan tujuan penelitian yang akan dicapai, maka variabel yang akan dipelajari dalam penelitian ini adalah dengan variasi dosis ekstrak etanol biji karika yang diperoleh dengan cara maserasi dengan etanol 70%. Pada penelitian ini dosis yang diberikan adalah 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB terhadap tebal edema dan jumlah leukosit hewan percobaan.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi, akibat dari adanya variabel bebas yaitu aktivitas antiinflamasi. Variabel terikat dalam penelitian ini diukur dengan parameter :

a. Tebal Udema

Udema (pembengkakan lokal) adalah gejala peradangan yang paling jelas. Udema disebabkan oleh terjadinya peningkatan permeabilitas kapiler yang selanjutnya menyebabkan peningkatan cairan ekstrasvaskuler (Dhyantari *et al.*, 2014).

Alat ukur : Jangka sorong

Hasil : mm.jam

Skala : Numerik

b. Leukosit

Selama proses inflamasi, jumlah leukosit dalam darah terutama sel fagosit akan meningkat. Peningkatan jumlah leukosit dalam darah terjadi untuk meningkatkan proses pencernaan atau fagositosis sel-sel yang telah rusak dan agen-agen penyerang yang dapat merusak sel selanjutnya (Aria *et al.*, 2015).

Alat ukur : *Hematology Analyzer*

Hasil : $10^9/L$

Skala : Numerik

3. Variabel Terkendali

- a) Hewan Uji : kondisi, galur, jenis kelamin, berat badan dan umur
- b) Tumbuhan : lokasi pengumpulan biji karika

F. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Oven (*Memmert*), blender (*Philips*), toples kaca maserasi, *rotary evaporator (RE-100 Pro)*, kertas saring (*Whatman*), chamber (*Nescafe*), lempeng KLT silica gel 60 F254 (*Merck*), pipa kapiler, Lampu UV 254 dan 366, penjepit tabung reaksi, rak tabung reaksi, jangka sorong (*Mitutoyo*), *hematology analyzer (Rayto RT-7600 for Vet)*, mikrotube EDTA K3 (*Monotes*), *surgical blade no.12 (Braun)*,

sonde oral, spuit 1 ml (*Terumo*), mortir stamper, alat-alat gelas (*Pyrex*), cawan porselin, krus porselin, tabung reaksi (*Iwaki*), corong kaca (*Pyrex*), neraca analitik (*Ohaus*), *waterbath*, *muffle furnace* (*Thermolyne*), *moisture balance* (*Ohaus*).

b. Bahan

Biji karika diperoleh dari pusat oleh-oleh “Exotic Carica” di dataran tinggi Dieng, etanol 70% (*Technical Grade*), baku pembanding untuk KLT yaitu kuersetin (*Sigma*) dan rutin (*Sigma*), butanol, asam asetat glasial, etil asetat, n-heksan, peraksi dragendorff, pereaksi mayer, HCl pekat, serbuk Mg, NaCl 0,9% (*Otsuka*), air suling, karagenan, Na CMC, Natrium Diklofenak tablet 50 mg generik (PT. First Medipharma).

2. Determinasi Tumbuhan Karika

Determinasi tumbuhan karika dilakukan di Laboratorium Ekologi Biosistemik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang untuk mengetahui kebenaran dari tumbuhan karika (*Carica pubescens*) dengan tujuan untuk menghindari kesalahan pengumpulan bahan utama penelitian. Surat keterangan determinasi tumbuhan karika dapat dilihat pada lampiran 10.

3. Determinasi Hewan Uji

Determinasi hewan uji mencit putih jantan galur *Swiss webster* diperoleh dari “Farmouse” Jalan Imam Bonjol 108, Salatiga. Hasil determinasi menunjukkan kebenaran dari hewan uji yang digunakan

adalah mencit (*Mus musculus*) jantan galur Swiss webster usia 2-3 bulan.

Surat keterangan determinasi hewan uji dapat dilihat pada lampiran 11.

4. *Ethical Clearance* Hewan Uji

Ethical Clearance Prosedure hewan uji dilakukan di Komite Etik Penelitian (KEP) Universitas Ngudi Waluyo Ungaran dengan tujuan untuk memastikan bahwa penelitian terhadap hewan uji telah mendapatkan perlindungan dan sesuai prinsip-prinsip kesejahteraan hewan. Surat keterangan *Ethical Clearance Prosedure* dapat dilihat pada lampiran 9.

5. Pembuatan Simplisia Biji Karika

- a. Pengambilan bahan baku dilakukan di salah satu rumah produksi dan pusat oleh-oleh “Exotic Carica” di dataran tinggi Dieng.
- b. Sortasi basah dilakukan dengan cara memisahkan biji karika dari *sarkotesta* atau kotoran dan bahan asing lainnya. Sortasi basah dilakukan dengan menggunakan sarung tangan, karena getah karika membuat tangan gatal karena mengandung enzim papain.
- c. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada biji karika. Pencucian biji karika dilakukan dengan air bersih yang mengalir.
- d. Pengeringan biji karika dilakukan dibawah sinar matahari secara tidak langsung dengan ditutupi kain hitam. Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air agar didapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama.

- e. Sortasi kering dilakukan untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian tanaman yang tidak diinginkan dan kotoran yang masih ada pada simplisia biji karika kering (Wahyuni, 2014).

6. Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Karika (EEBK)

a. Pembuatan Serbuk Simplisia

Tahap awal proses ekstraksi adalah pembuatan serbuk simplisia dengan penyerbukan yang bertujuan untuk memperluas permukaan serta membantu pemecahan dinding dan membran sel, sehingga lebih mudah memaksimalkan proses ekstraksi. Simplisia biji karika yang sudah kering di haluskan menggunakan blender. Pengayakan serbuk simplisia dilakukan berdasarkan penelitian oleh Sasongko & Sugiyarto (2017) yang menggunakan mesh 40 terhadap serbuk biji karika.

b. Penentuan Metode Ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah metode maserasi berdasarkan penelitian oleh Sasongko & Sugiyarto (2017) yaitu serbuk simplisia biji karika di maserasi dan disimpan di tempat terlindung cahaya selama kurang lebih 5 hari, karena metabolit sekunder terutama flavonoid yang diduga memiliki aktivitas antiinflamasi pada biji karika merupakan golongan senyawa yang tidak tahan panas dan mudah teroksidasi pada suhu tinggi (Rompas, 2012), serta sifat fisik senyawa alkaloid yang kurang tahan panas pada suhu tinggi menurut Robinson 1995 (dalam Eleanore, 2013). Pada penelitian ini dilakukan maserasi selama 3 hari, dan remaserasi selama 2 hari

berdasarkan penelitian Luhurningtyas & Dyahariesti, (2020). Tujuan dilakukan remaserasi adalah untuk menarik kandungan senyawa yang masih tertinggal selama maserasi pertama.

c. Penentuan Pelarut

Pelarut yang digunakan adalah pelarut yang sesuai untuk mengekstraksi kandungan zat aktif dari serbuk simplisia. Menurut (Utami & Taebe, 2016) pelarut etanol 70% memiliki kemampuan menyari senyawa pada rentang polaritas yang lebar mulai dari senyawa polar hingga non polar. Biji karika diduga mengandung flavonoid dan alkaloid yang memiliki aktivitas antiinflamasi. Seperti yang telah dilaporkan oleh Wijayanti & Febrinasari (2017) bahwa ekstraksi maserasi etanol biji karika menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1:10 ditemukan ada flavonoid dan alkaloid. Penelitian Eleanore (2013) menyatakan bahwa pada pelarut air tidak ditemukan adanya senyawa alkaloid karena alkaloid mempunyai kelarutan kecil dalam air, sedangkan pada ekstrak etanol 70% ditemukan adanya senyawa alkaloid. Sasongko & Sugiyarto (2017) pada penelitiannya juga melakukan maserasi biji karika dengan etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Maka dari itu pada penelitian ini 250 gram serbuk biji karika dilarutkan dengan 1750 mL etanol 70% selama 3 hari dan remaserasi dengan 750 mL etanol 70% selama 2 hari (Luhurningtyas & Dyahariesti, 2020).

d. Evaporasi

Pemekatan dilakukan dengan cara penguapan atau evaporasi cairan pelarut sampai diperoleh filtrat kental atau pekat menggunakan *rotary evaporator* dan penangas air suhu 50°C. Pemilihan suhu 50°C berdasarkan penelitian Kurniawan *et al.*, (2019) yang menyebutkan pada penelitiannya bahwa maserat biji karika dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C. Ibrahim *et al.*, (2014) melaporkan bahwa peningkatan suhu ekstraksi perlu diperhatikan, suhu ekstraksi yang terlalu tinggi dan waktu ekstraksi yang lama serta melampaui batas waktu optimum dapat menyebabkan hilangnya senyawa pada filtrat akibat penguapan. Selain itu flavonoid tidak tahan terhadap suhu tinggi diatas 50°C, apabila penguapan menggunakan suhu diatas 50°C senyawa flavonoid dapat mengalami perubahan struktur dan menghasilkan ekstrak yang rendah. Rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak berupa pasta (gram)}}{\text{Berat serbuk simplisia kering (gram)}} \times 100\%$$

7. Penetapan Parameter Standarisasi

a. Parameter Spesifik

1) Pemeriksaan Organoleptik

Pemeriksaan organoleptik dilakukan dengan tujuan sebagai memberikan pengenalan awal serbuk simplisia dan ekstrak biji

karika secara objektif berupa bentuk, warna, dan bau (Depkes RI, 2000)

2) Pengujian Metabolit Sekunder

a) Uji Warna

Identifikasi Golongan Flavonoid

Uji *Bate-Smith* : Ekstrak ditambahkan larutan HCl pekat kemudian dipanaskan diatas penangas air selama 15 menit. Reaksi positif pada uji *Bate-Smith* apabila terjadi perubahan dari warna kuning tua menjadi warna merah menurut Achmad, 1986 (dalam Minarno, 2015).

Uji *Wilstatter* : Ekstrak ditambahkan larutan HCl pekat dan 2-3 potong kecil logam Mg. Reaksi positif pada uji *Wilstatter* apabila terjadi perubahan warna dari kuning tua menjadi orange atau jingga menurut Achmad, 1986 (dalam Minarno, 2015).

Identifikasi Golongan Alkaloid

Uji Mayer : Ekstrak ditambah dengan larutan HCl pekat kemudian ditambahkan pereaksi mayer menghasilkan endapan berwarna putih atau kuning menurut Nahar dan Sarker, 2009 (dalam Maulana 2018).

Uji Dragendorff : Ekstrak ditambah dengan larutan HCl pekat kemudian ditambahkan pereaksi mayer

menghasilkan endapan berwarna jingga atau coklat menurut Nahar dan Sarker, 2009 (dalam Maulana 2018).

b) Kromatografi Lapis Tipis

Pemisahan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak biji karika dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT). KLT adalah metode pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan distribusi antara dua fase yaitu fase diam dan fase gerak.

Identifikasi Flavonoid Fase Gerak B:A:A

Pada penelitian ini fase gerak yang dipakai dalam KLT adalah fase gerak campuran n-butanol : asam asetat glasial : air (BAA) (4:1:5) yang mampu memberikan pemisahan terbaik. Fase gerak yang baik adalah fase gerak yang bisa memisahkan senyawa dalam jumlah yang banyak yang ditandai dengan munculnya noda. Noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak antara noda satu dengan yang lainnya jelas (Harborne, 1987). Fase diam yang digunakan adalah plat silica gel 60 F254, sedangkan fase gerak yang digunakan bersifat polar karena mengandung air. Plat silica gel 60 F254 diaktivasi dengan cara dioven pada suhu 100°C selama 10 menit untuk menghilangkan air yang terdapat pada plat KLT (Sastrohamidjojo, 2007). Baku pembanding yang digunakan adalah kuersetin dan

rutin berdasarkan penelitian Luhurningtyas & Dyahariesti, (2020) yang menyatakan bahwa biji karika mengandung kuersetin dan rutin.

Ekstak etanol biji karika seberat 10 mg dilarutkan dalam 1 mL etanol 70% kemudian ditotolkan sepanjang plat dengan menggunakan pipa kapiler pada jarak 1 cm dari garis bawah dan 1 cm dari garis atas. Ekstrak etanol biji karika dielusi menggunakan eluen butanol : asam asetat glasial: air (BAA) dengan perbandingan (4:1:5) yang telah dijenuhkan. Hasil KLT diangin-anginkan kemudian disemprot dengan pereaksi semprot sitroborat untuk mendeteksi flavonoid. Setelah itu diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 366 nm. Noda yang terbentuk dilingkari dan dihitung nilai Rfnya. Rf standar flavonoid yaitu 0,31-0,98 menurut Harbone, 1996 dalam (Ruliyanti, 2020). Rumus perhitungan Rf adalah sebagai berikut :

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh elusi}}$$

Identifikasi Alkaloid Fase Gerak n-Heksan:Etil Asetat

Pada penelitian ini juga memakai fase gerak n-heksan : etil asetat (1:9) berdasarkan penelitian Luhurningtyas & Dyahariesti, (2020) bahwa alkaloid pada biji karika

ditemukan dengan pemisahan KLT fase gerak n-heksan : etil asetat (1:9). Fase gerak n-heksan-etil asetat umumnya digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa bersifat non polar sampai semipolar. Menurut Harbone 1996 (dalam Maulana 2018) timbulnya bercak coklat jingga setelah penyemprotan pereaksi Dragendorff menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Nilai Rf standar alkaloid umumnya 0,07-0,62. Hasil KLT diangin-anginkan dan diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 366 nm kemudian disemprot menggunakan pereaksi semprot dragendorff untuk mendeteksi alkaloid dan dilihat pada sinar tampak. Noda yang terbentuk dilingkari dan dihitung nilai Rfnya.

b. Parameter Non Spesifik

1) Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan untuk mengetahui kandungan jumlah air dalam serbuk simplisia dan ekstrak etanol biji karika. Serbuk simplisia dan ekstrak etanol biji karika masing-masing ditimbang sebanyak 2-3 gram dalam cawan aluminium dangkal yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C dan telah ditara dalam alat ruang pengering *Moisture Balance*. Serbuk dan ekstrak diratakan dalam cawan aluminium, kemudian dimasukkan tutup alat dan keringkan

pada suhu penetapan hingga alat membaca otomatis. Kadar air yang baik <10% (Depkes RI, 2000).

2) Penetapan Kadar Abu Total

Serbuk simplisia atau ekstrak etanol biji karika masing-masing ditimbang sebanyak 2 gram dan dimasukkan ke dalam krus porselen yang sudah ditara. Kemudian dipijarkan perlahan-lahan dalam *Muffle Furnace* dengan menaikkan suhu secara bertahap hingga $\pm 600^{\circ}\text{C}$ selama ± 6 jam atau sampai bebas karbon (arang habis). Selanjutnya didinginkan dan ditimbang (Depkes RI, 1980).

Kadar abu total dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Persen Kadar Abu Total (\% b/b)} = \frac{c-a}{b-a} \times 100\%$$

Keterangan :

a = berat krus kosong, dinyatakan dalam gram

b = berat krus + sampel, dinyatakan dalam gram

c = berat krus + abu, dinyatakan dalam gram

8. Penetapan Dosis dan Perhitungan Larutan Stok

a. Konversi Dosis dan Perhitungan Larutan Stok Natrium

Diklofenak

Natrium diklofenak 50 mg dipilih sebagai kontrol positif berdasarkan penelitian (Noviardi *et al.*, 2019) yang telah melaporkan pada penelitiannya bahwa natrium diklofenak 50 mg sebagai kontrol positif memberikan inhibisi radang sebesar 88,89% pada mencit putih jantan yang diinduksi karagenan. Natrium diklofenak dosis 50 mg merupakan dosis lazim untuk manusia

dewasa, rata-rata berat badan manusia dewasa adalah 70 kgBB. Pada penelitian ini dosis natrium diklofenak yang digunakan untuk mencit adalah 6,5 mg/kgBB. Perhitungan konversi natrium diklofenak dan perhitungan larutan stok natrium diklofenak dapat dilihat pada lampiran 1.

b. Perhitungan Larutan Stok Ekstrak Etanol Biji Karika

Pada penelitian ini perlu dilakukan optimasi dosis dengan rentang yang lebih bervariasi untuk mengetahui aktivitas penghambatan inflamasi yang optimal dari ekstrak etanol biji karika. Pada penelitian ini dosis ekstrak etanol biji karika yang digunakan adalah 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB. Penentuan dosis ekstrak berdasarkan hasil penelitian Ahmed & Ramabhimalah (2015) yang telah melaporkan bahwa ekstrak air biji pepaya dengan dosis 400 mg/kgBB secara per oral dapat menurunkan volume udem pada telapak kaki hewan uji yang diinduksi karagenan dengan persen inhibisi radang 83,85%. Perhitungan larutan stok ekstrak etanol biji karika dapat dilihat pada lampiran 1.

9. Pembuatan Suspensi Na CMC 0,1%

Na CMC sebanyak 0,1 gram ditaburkan dalam lumpang berisi air suling panas 10 mL. Na CMC kemudian didiamkan selama 15 menit dan digerus sampai diperoleh massa yang transparan, diencerkan

menggunakan air suling, dihomogenkan dan dimasukkan ke labu takar 100 mL dicukupkan volumenya dengan air suling sampai 100 mL.

10. Pembuatan Karagenan 1%

Karagenan sebanyak 100 mg ditimbang kemudian dilarutkan menggunakan larutan garam fisiologis (NaCl 0,9%) sehingga didapat volume 10 mL. Larutan karagenan 1% akan diinduksikan sebanyak 0,1 mL secara intraplantar pada telapak kaki mencit (Priamsari & Krismonikawati, 2019).

11. Pembuatan Suspensi Natrium Diklofenak

Natrium Diklofenak yang digunakan pada penelitian ini adalah natrium diklofenak tablet 50 mg generik dari PT. First Medipharma. Berat bahan aktif natrium diklofenak dalam 1 tablet adalah 50 mg. Sebanyak 10 tablet natrium diklofenak 50 mg digerus dalam lumpang hingga halus dan homogen, ditimbang berat totalnya yaitu 1300 mg dengan berat rata-rata pertablet adalah 130 mg. Jumlah pengambilan serbuk tablet natrium diklofenak dihitung sesuai dengan larutan stok yang digunakan yaitu 39 mg/100 mL. Natrium diklofenak sebanyak 101,4 mg dimasukkan dalam mortir dan ditambahkan suspensi Na CMC 0,1% sedikit demi sedikit sambil digerus sampai homogen kemudian dimasukkan ke labu takar 100 mL, dicukupkan volumenya dengan suspensi Na CMC 0,1% sampai 100 mL. Perhitungan pengambilan serbuk tablet natrium diklofenak dapat dilihat pada lampiran 1.

12. Pembuatan Suspensi Ekstrak Etanol Biji Karika

Ekstrak etanol biji karika ditimbang masing-masing 60 mg, 120 mg, dan 240 mg ke kemudian dimasukkan ke dalam mortir dan ditambahkan suspensi Na CMC 0,1% sedikit demi sedikit sambil digerus sampai homoge setelah itu dituang dalam labu takar 10 mL, dicukupkan volumenya dengan suspensi Na CMC 0,1% sampai 10 mL.

13. Penyiapan Hewan Percobaan

Pada penelitian ini, hewan uji yang digunakan adalah mencit putih jantan (*Swiss webster*) yang telah lolos *Ethical Clearance Prosedure* dari Komite Etik Penelitian (KEP) Universitas Ngudi Waluyo Ungaran dengan Nomor 25/KEP/EC/UNW/2022. Mencit diadaptasikan dengan lingkungan penelitian dan kondisi laboratorium untuk menghilangkan stres akibat proses transportasi. Aklimatisasi dilakukan selama satu minggu dengan suhu ruang berkisar 24-25°C di dalam kandang polypropylene berukuran 40 cm x 30 cm x 10 cm yang ditutup dengan penutup kawat dan beralaskan sekam. Penggantian sekam dilakukan setiap dua hari sekali. Hewan uji sebanyak 24 ekor di kelompokkan secara acak menjadi 6 kelompok dimana masing-masing perlakuan terdiri atas 4 ekor mencit.

Semua mencit dipelihara dalam kondisi yang sama, diberikan makanan berupa pellet 512 dan air minum yang seragam. Mencit dipuaskan selama \pm 18 jam dengan tetap diberi minum *ad libitum* sebelum pengujian, hal ini dimaksudkan untuk menghindari kemungkinan

adanya pengaruh makanan terhadap efek bioavailabilitas dan proses farmakokinetik sediaan uji dalam memberikan aktivitas antiinflamasi.

G. Pengolahan Data

1. Uji Aktivitas Antiinflamasi Parameter Udema

- a. Mencit yang telah ditimbang berat badannya kemudian diberi tanda dengan spidol pada bagian punggung dan pada batas mata kaki kiri untuk memudahkan dalam identifikasi pengukuran.
- b. Tebal awal telapak kaki kiri mencit diukur menggunakan jangka sorong sebelum diberi induksi karagenan 1% dan dinyatakan sebagai tebal kaki awal (Co).
- c. Semua kelompok uji diberi induksi 0,1 mL larutan karagenan 1% secara intraplantar pada telapak kaki kiri mencit.
- d. 30 menit kemudian setelah diberi induksi karagenan 1%, masing-masing mencit diberikan perlakuan per oral sesuai dengan kelompok perlakuan sebagai berikut :
 - 1) Kontrol negatif, tidak diberi perlakuan (kelompok sakit)
 - 2) Kontrol pelarut, diberikan suspensi Na CMC 0,1%
 - 3) Kontrol positif, diberikan suspensi natrium diklofenak dosis 6,5 mg/kgBB
 - 4) Kelompok uji, diberikan suspensi ekstrak etanol biji karika dosis 100 mg/kgBB
 - 5) Kelompok uji, diberikan suspensi ekstrak etanol biji karika dosis 200 mg/kgBB

- 6) Kelompok uji, diberikan suspensi ekstrak etanol biji karika dosis 400 mg/kgBB
- e. Tebal edema kaki mencit diukur setelah satu jam induksi karagenan dengan cara diukur dengan jangka sorong. Tebal edema diukur pada jam ke-1, 2, 3, 4, 5, dan 6 dinyatakan sebagai tebal edema pada waktu tertentu (C_n)
- f. Dari data tebal edema kemudian dihitung rata-rata tebal edema, persen radang, persen inhibisi radang, nilai AUC, dan persen daya antiinflamasi (Priamsari & Krismonikawati, 2019).

$$\% \text{ Radang} = \frac{C_n - C_0}{C_0} \times 100\%$$

Keterangan :

C_0 = Tebal edema awal telapak kaki mencit

C_n = Tebal edema telapak kaki pada waktu (t)

$$\% \text{ Inhibisi Radang} = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

Keterangan :

a = Tebal edema pada kelompok hewan kontrol negatif

b = Tebal edema pada kelompok hewan uji atau kontrol positif

$$AUC_{0-x} = \left(\frac{C_1 + C_0}{2} \times t_1 - t_0 \right) + \left(\frac{C_2 + C_1}{2} \times t_2 - t_1 \right) + \dots + \left(\frac{C_n + C_{n-1}}{2} \times t_n - t_{n-1} \right)$$

Keterangan :

AUC_{0-x} = Area Under Curve dari ketebalan edema telapak kaki

$C_n - C_{n-1}$ = Besarnya tebal edema

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

Keterangan :

AUC_k = AUC rata-rata untuk kontrol negatif

AUC_p = AUC rata-rata perlakuan pada tiap individu

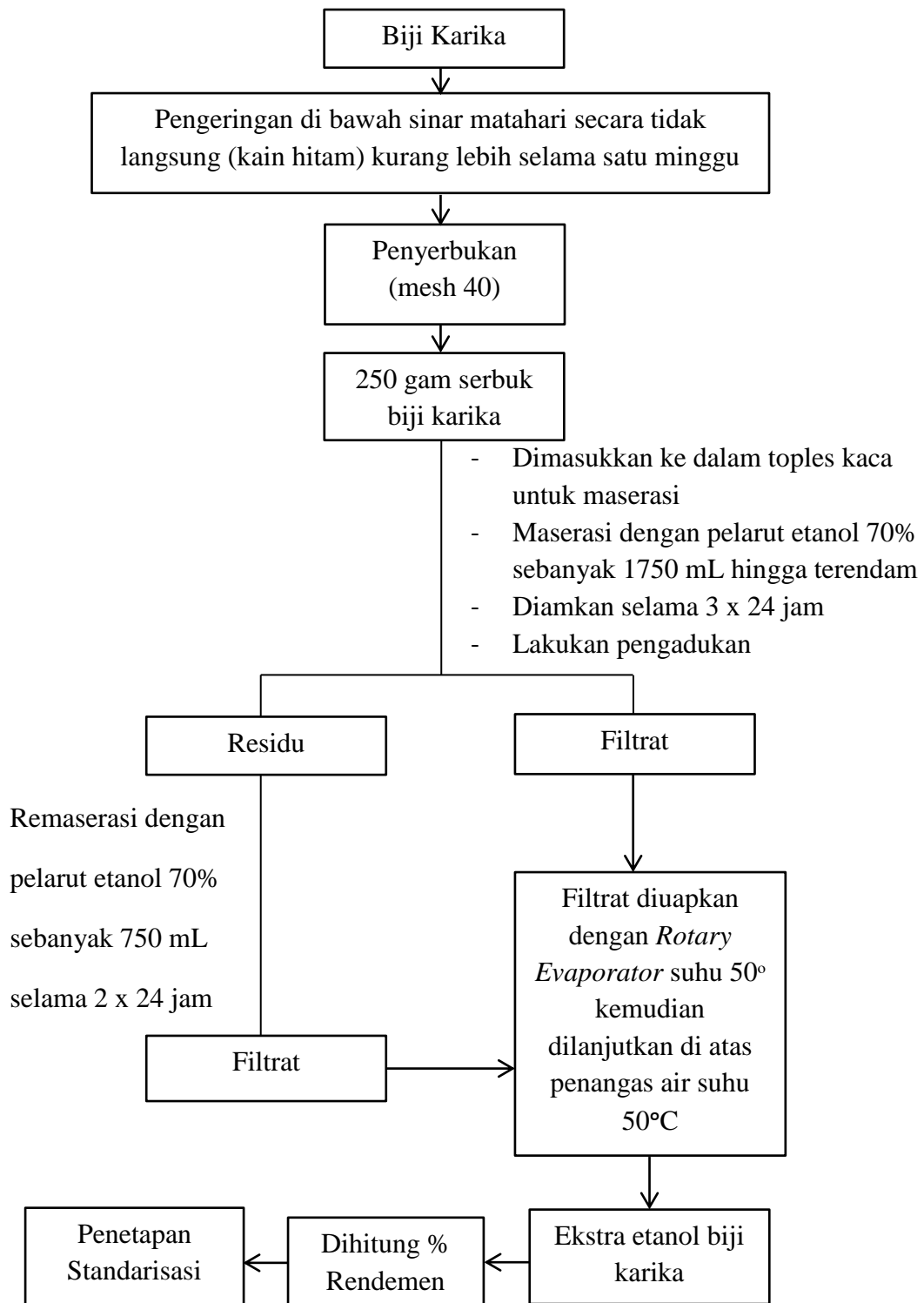
2. Uji Aktivitas Antiinflamasi Parameter Leukosit

Hewan uji yang telah diaklimatisasi, sebelum diinduksi karagenan (jam ke-0) diambil darah melalui vena lateral ekor untuk dilakukan pemeriksaan jumlah leukosit mencit normal, kemudian diambil darah pada jam ke 3 dan 6 untuk melihat jumlah leukosit hewan uji setelah induksi karagenan. Masing-masing sampel darah pada tiap waktu (t₀, t₃, dan t₆) sebanyak 1 ml darah dimasukkan ke dalam mikrotube yang berisi EDTA. Jumlah leukosit diperiksa dengan alat *hematology analyzer*. Pengambilan darah melalui vena lateral ekor dilakukan berdasarkan penelitian (Kandy, 2016) yang melakukan pengambilan darah melalui ekor untuk mengetahui jumlah leukosit hewan uji yang diinduksi karagenan.

H. Analisis Data

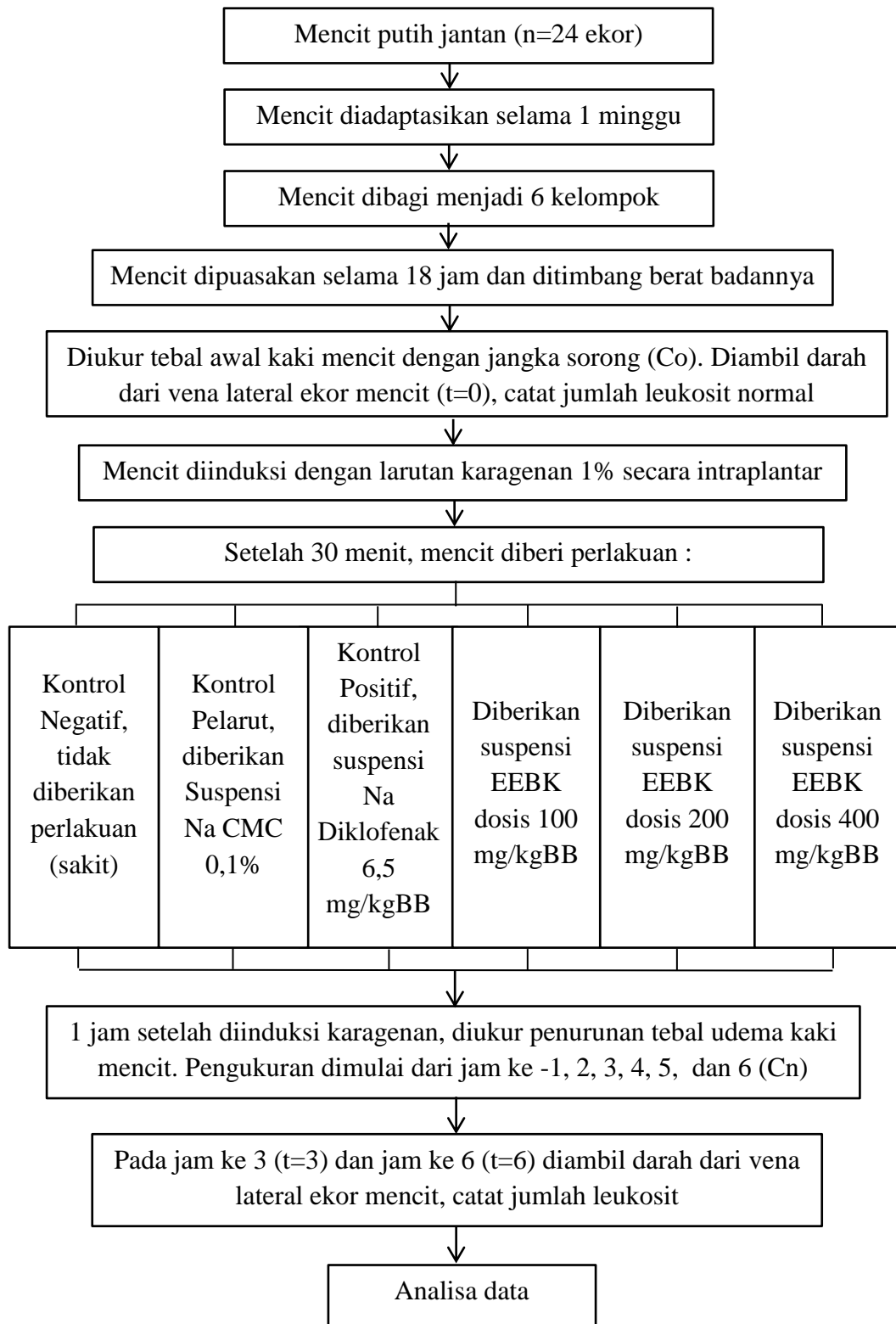
Nilai AUC kemudian dianalisis menggunakan *Saphiro Wilk test* untuk mengetahui normalitas dan *Levene's test* untuk mengetahui homogenitas. Apabila data terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji parametrik analisis varian (ANOVA) satu arah dan dilanjut uji *LSD Post-Hoc Test* dengan taraf kepercayaan 95%.

I. Skema Kerja Ekstraksi Biji Karika



Gambar 3.1 Skema Kerja Ekstraksi Biji Karika

J. Skema Kerja Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Biji Karika



Gambar 3. 2 Skema Kerja Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Biji Karika