

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain penelitian

Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental, yaitu dengan menentukan aktivitas antiinflamasi ekstrak daun karika (*Carica pubescens*) terhadap tebal udem dan jumlah leukosit pada tikus putih jantan (*Swiss webster*).

B. Lokasi dan waktu penelitian

1. Determinasi tanaman daun karika dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.
2. *Ethical Clearance* dilakukan di Komite Etik Penelitian Universitas Ngudi Waluyo (KEP UNW).
3. Ekstraksi daun karika dilakukan di Laboratorium Fitokimia Program studi Farmasi fakultas Kesehatan Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.
4. Uji antiinflamasi dengan mengamati tebal udem dan uji jumlah leukosit dilakukan di Laboratorium Biologi Program studi Farmasi fakultas Kesehatan Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.

C. Subjek penelitian

Pada penelitian ini menggunakan sampel daun Karika (*Carica pubescens*) yang berwarna hijau atau hijau tua dengan dengan pertulangan menjari yang berwarna kekuningan atau kemerahan (Laily,1970) dan dipetik

langsung di daerah dataran tinggi Dieng, Kabupaten Wonosobo, Provinsi Jawa Tengah.

Subjek penelitian yang digunakan adalah hewan uji mencit putih jantan.

Rumus Federer adalah rumus untuk menentukan subjek dalam penelitian

Rumus Federer

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

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

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

$$n-1 \geq 3 + 1$$

$$n \geq 4$$

keterangan :

n = jumlah hewan uji per kelompok

t = jumlah kelompok

D. Definisi operasional

1. Daun karika diekstrak dengan metode maserasi dalam etanol 70% , Kemudian dilakukan pemekatan dengan alat rotary evaporator pada suhu $\pm 50^\circ$ karena flavonoid mudah rusak pada suhu diatas 50° (Ibrahim *et al.*, 2014).
2. Inflamasi merupakan reaksi udem (pembengkakan) pada telapak kaki mencit yang dapat timbul karena diinduksi dengan karagenan 1%.
3. Tebal udem merupakan besarnya pembengkakan pada telapak kaki mencit yang diukur dengan Jangka sorong dengan satuan mm/jam, %inhibisi radang, %AUC, %DAI, dan jumlah leukosit.

4. Aktivitas antiinflamasi merupakan berkurangnya Tebal udem dan jumlah leukosit pada telapak kaki mencit setelah diberi perlakuan.

E. Variabel penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah perbandingan ekstraksi daun karika (*Carica pubescens*) menggunakan etanol dengan variasi dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB.

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 rata-rata tebal udem, %inhibisi radang, %AUC, %DAI, dan jumlah leukosit.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah suhu, pemilihan pelarut, dan metode skrining, ini dilakukan agar tidak mempengaruhi kandungan yang ada didalam daun karika.

F. Pengumpulan data

1. Alat dan bahan

a. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven (Mommert), blender (Philips), ayakan mesh 40, toples maserasi, alat gelas (Pyrex), kertas saring, cawan porselin, rotary evaporator (RE 100-pro), corong (Pyrex), lempeng KLT, silika GF 254, pipa kapiler, sinar uv 254 dan 366, Jangka sorong (Mitutoyo), sonde oral, hematology analyzer (Rayto RT-7800for Vet), mikrotube EDTA (Monotes), mortir dan stemper, timbangan analitik (Ohaus), timbangan hewan, spidol, dan kandang tikus.

b. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia daun karika (*Carica pubescens*), etanol 70% (Technical grade), karagenan 1%, NaCl (Otsuka), NA CMC 0,1%, Natrium diklofenak (PT Frist Medipharma,) dan aquadest, butanol, asam asetat glasial, etil asetat, dan n-heksan, quarsetin (Sigma), rutin (Sigma), pereaksi deagendrof, pereaksi mayer, HCl Pekat, serbuk Mg.

2. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman pada penelitian ini dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

3. Pembuatan simplisia

Sebanyak ± 5 kg Daun Karika (*Carica pubescens*) yang dipetik dalam kondisi segar. Tahap pertama Setelah daun dipetik adalah dengan dibersihkan dari kotoran-kotoran (sortasi basah) tahap kedua daun dicuci dengan air mengalir, tahap ketiga perajangan daun dirajang dengan ukuran yang seragam, tahap keempat proses pengeringan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari selama 1 minggu dengan ditutup kain warna hitam, tahap kelima yaitu sampel yang sudah kering lalu di haluskan sampai menjadi serbuk dan diayak dengan mesh no.40 kemudian disimpan pada suhu yang bersih dan tertutup rapat (Ulfah, 2015).

4. Pembuatan ekstrak karika (*Carica pubescens*)

Prosedur pembuatan ekstraksi dengan metode maserasi dilakukan maserasi karena daun karika memiliki kandungan senyawa flavonoid dan alkaloid yang termasuk golongan senyawa yang tidak tahan terhadap pemanasan dan mudah teroksidasi pada suhu tinggi (Rompas, 2012). Caranya yaitu dengan menggunakan perbandingan 1:10. Sebanyak 250 g simplisia karika (*Carica pubescens*) dan etanol 70% sebanyak 2500 ml. Ekstrak Karika diberikan larutan etanol pertama sebanyak 1750 ml tutup wadah dan diamkan selama 3 hari, setelah 3 hari remaserasi dengan etanol yang kedua, yaitu sebanyak 750 ml tutup wadah dan didiamkan selama 2 hari. Ekstrak harus diauhkan dari cahaya matahari sambil sesekali diaduk (Luhurningtyas & Dyahariesti,

2020). Setelah selesai saring maserat, Maserat yang diperoleh dipisahkan dengan menggunakan alat *Rotary evaporator* pada temperature $\pm 50^{\circ}\text{C}$ sampai ekstrak menjadi kental (Ulfah, 2015).

Cara menghitung rendemen :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Ekstrak kental (gram)}}{\text{serbuk kering (gram)}} \times 100\%$$

5. Skrining Fitokimia

Uji KLT (Kromatografi lapis tipis)

Pada penelitian ini dilakukan pengujian Flavonoid dan alkaloid dengan metode KLT (Kromatografi lapis tipis). Fase gerak yang digunakan dalam pengujian Flavonoid dan alkaloid ada dua yaitu butanol : asam asetat glasial : air (4:1:5), dan fase gerak etil asetat : n-heksan (9:1) (Luhurningtyas & Dyahariesti, 2020)

Cara pengujianya yaitu dengan cara ekstrak etanol daun Karika (*Carica pubescens*) diambil 10 mg ekstrak etanol dilarutkan dalam 1 ml etanol 70%, ditotolkan pada batas bawah lempeng KLT. Untuk menotolkannya digunakan pipa kapiler secara tegak lurus, lalu lempeng klt yang telah diberi ekstrak Karika dimasukkan ke dalam chamber yang telah dijenuhkan dengan beberapa variasi pelarut (Fried & Sherma, 1994).

Hasil KLT diangin-anginkan lalu diperiksa dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 366 nm. Noda yang terbentuk dilingkari dan dihitung nilai Rfnya.

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh elusi}}$$

G. Uji aktivitas inflamasi

1. Uji aktivitas antiinflamasi pada tebal udem

Pengujian dalam penelitian ini menggunakan metode *hind paw edema*, yaitu pembentukan radang buatan pada telapak kaki mencit. Kaki kiri mencit yang akan diuji, diberi tanda pada mata kaki lalu diukur volume awal kaki mencit. Setelah itu masing-masing kaki mencit disuntikkan karagenan secara subplantar. Selang jeda 30 menit diberikan ekstrak dan kontrol positif secara peroral. Tebal udem (bengkak) pada kaki mencit diukur setelah 1 jam diinduksi karagenan dengan jangka sorong. Pemberian jeda dimaksudkan agar terjadi penghambatan sebelum terjadi udem. Jadi dapat diketahui potensi ekstrak dalam menghambat proses inflamasi (Sari *et al*, 2018) Apabila ekstrak (perlakuan) diberikan sebelum penginduksian karagenan dikhawatirkan efek telah habis sebelum durasi udem berakhir sehingga mungkin efeknya sudah tidak optimal. Kemudian masing-masing mencit diberikan perlakuan dengan pemberian per oral sesuai dengan kelompok perlakuan sebagai berikut :

- i. Kelompok I : Kelompok kontrol negatif diberikan perlakuan Karagenan 1% secara subplantar.
- ii. Kelompok II : Kelompok kontrol pelarut diberikan perlakuan karagenan 1% secara subplantar dan diberikan suspensi Na-CMC 0,1% secara oral.
- iii. Kelompok III : kelompok kontrol positif diberikan perlakuan karagenan 1% secara subplantar dan diberikan Suspensi Na-diklofenak 6,5 mg/30 gram BB mencit secara oral.

- iv. Kelompok IV : kelompok perlakuan dosis 100mg/kgBB diberikan karagenan 1% secara subplantar dan diberikan ekstrak etanol daun karika 100mg/kgBB secara oral.
- v. Kelompok IV : kelompok perlakuan dosis 200mg/kgBB diberikan karagenan 1% secara subplantar dan diberikan ekstrak etanol daun karika 200mg/kgBB secara oral.
- vi. Kelompok V : kelompok perlakuan dosis 400mg/kgBB diberikan karagenan 1% secara subplantar dan diberikan ekstrak etanol daun karika 400mg/kgBB secara oral.

Tebal udem pada telapak kaki mencit diukur berdasarkan pada kenaikan angka pada jangka sorong. Pengukuran dilakukan satu jam sekali selama 6 jam (Harry Noviardi, Triyani Sumiati, 2019)

Dihitung persen udem (radang) dan persen inhibisi udem dengan rumus:

- $\% \text{ Radang} = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100\%$

Keterangan :

V_0 = volume awal telapak kaki mencit

V_t = volume udem telapak kaki pada waktu (t)

- $\% \text{ inhibisi radang} = \frac{a-b}{a} \times 100\%$

Keterangan :

a = tebal udem pada kelompok hewan kontrol negatif

b = tebal udem pada kelompok hewan uji atau kontrol positif.

2. Uji aktivitas antiinflamasi pada jumlah leukosit

Hewan uji yang telah diaklimatisasi (upaya penyesuaian /adaptasi). Untuk melakukan perhitungan leukosit mencit normal maka sebelum perlakuan diambil sampel darah kapiler melalui ekor. Terdapat 25 mencit sebagai hewan uji. Setelah itu mencit diberi perlakuan uji untuk udem. Pada jam ke 3 dan 6 dilakukan pengambilan darah kapiler untuk melihat jumlah leukosit hewan uji setelah diberi perlakuan. Sampel darah yang diambil 1 ml tiap waktu (t0,t3, dan t6) dimasukkan kedalam mikrotube yang berisi EDTA. Setelah itu diamati jumlah leukosit dengan alat hematology analyzer (Siregar, Studi, Farmasi, Farmasi, & Utara, 2019).

H. Analisa Data

Hasil penelitian data nilai AUC dianalisis dengan uji SPSS dengan uji *Saphiro wilk* untuk melihat distribusi normal dan *Levene's test* untuk mengetahui homogenitas. Selanjutnya diuji dengan parametrik analisis of varian (ANOVA) satu arah dan dilanjutkan uji *LSD post hoc test* dengan taraf kepercayaan 95% (Harry Noviardi, Triyani Sumiati, 2019).