

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Jenis penelitian ini dilakukan secara ekperimental laboratorium secara in vivo menggunakan metode bersihan karbon dan uji hematologi. Perlakuan yang berikan ialah pemberian ekstrak biji pinang (*Areca catechu L.*) untuk mengetahui peningkatan jumlah leukosit, limfosit, monosit, dan granulosit pada mencit jantan yang diinduksi tinta karbon sebagai antigen. Dosis ekstrak biji pinang (*Areca catechu L.*) mengacu pada penelitian (Suhatri, yimmi Syavardie, 2011) dengan pemberian ekstrak 0,5 mg/20grBB, 1 mg/20grBB, 2 mg/20grBB.

#### **B. Lokasi Penelitian**

Determinasi tanaman pinang dilaksanakan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang. Determinasi dilakukan untuk mengetahui apakah tumbuhan biji pinang pada penelitian ini merupakan sampel tanaman pinang yang benar dalam flora tumbuhan.

Ethical Clearance diajukan kepada Komite Etik Penelitian Universitas Ngudi Waluyo (KEP UNW). Ethical Clearance dilakukan untuk meyakinkan penelitian yang diselenggarakan sesuai dengan prinsip etika penelitian dan memiliki negative consequence kepada subjek penelitian sekecil mungkin.

Pembuatan ekstrak biji pinang yang dibutuhkan pada penelitian dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Ngudi Waluyo, sedangkan untuk perlakuan setiap kelompok terhadap hewan uji dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Ngudi Waluyo.

### C. Subjek Penelitian

Subjek uji penelitian ini yaitu mencit putih yang diperoleh dari Farm Mouse Ungaran Timur, Semarang, Jawa Tengah. Penentuan jumlah sampel hewan uji ditentukan berdasarkan rumus Federer, yakni :

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

Dimana : n = jumlah sampel tiap kelompok

t = jumlah kelompok

Perhitungan : banyaknya kelompok perlakuan = 5 kelompok

sampel yang dibutuhkan untuk tiap kelompok =

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

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

$$(n-1) \times 4 \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$n \geq (15 + 4) / 4$$

$$n \geq 4,75 \text{ (dibulatkan)}$$

$$n >= 5$$

Hewan uji sebanyak 25 ekor mencit jantan sebagai subjek uji yang dipelihara sampai dengan bobot 20-30 gram. Disimpan dalam kotak plastik, terbagi jadi 5 kelompok perlakuan dan setiap kotak berisi 5 ekor mencit. Kriteria pemilihan hewan uji berdasarkan standar yang telah diupayakan, seperti:

1. Aklimatisasi (penyesuaian subjek uji pada suasana lingkungan sekitar, biasanya dilakukan selama 7 hari)

2. Kualitas Hewan

Dilihat berdasarkan kondisi kesehatan hewan uji, meliputi: penurunan berat badan, sakit dan kematian

3. Faktor lingkungan

Pemantauan ini diperlukan karena untuk mengetahui suhu, temperature, cahaya, kelembapan udara serta pemberian pakan yang akan mempengaruhi kualitas dari hewan uji.

Pada penelitian ini sampel uji yang digunakan adalah mencit jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Hewan uji dipilih secara acak yang diambil dari populasi kandang hewan.

A. Kriteria Inklusi

1. Mencit jantan swiss Webster
2. Berat badan hewan uji 20-30 gr
3. Umur 2-3 bulan
4. Keadaan sehat

## B. Kriteria Eklusi

1. Mencit mati saat aklimitasi
2. Mencit mati saat diberikan perlakuan
3. Mencit mengalami penurunan berat badan drastis setelah masa adaptasi

## D. Definisi Operasional

Definisi Operasional yang dilakukan pada penelitian ini sebagai berikut :

1. Imunomodulator adalah proses upaya meningkatkan sistem imun untuk mempertahankan kekebalan tubuh agar tetap maksimal dan terlindung dari berbagai bahaya yang dapat ditimbulkan oleh patogen atau mikroorganisme
2. Profil hematologi dilihat menggunakan alat hematology analyzer. Alat ini merupakan pengukuran jumlah leukosit, limfosit, monosit, granulosit dari darah hewan uji.
3. Uji hematologi yang dilakukan digunakan sebagai parameter dalam menilai aktivitas imunomodulator pada biji pinang (*Areca catechu L.*) terhadap nilai jumlah leukosit limfosit, monosit, dan granulosit

## E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas yang digunakan yaitu simplisia biji pinang (*Areca catechu L.*) dengan diberikan perlakuan dosis ekstrak 0,5

mg/20grBB, 1 mg/20grBB, 2 mg/20grBB (Suhatri, yimmi Syavardie, 2011).

## 2. Variabel tergantung

Variabel tergantung yakni pengaruh pemberian ekstrak biji pinang (*Areca catechu L.*) terhadap peningkatan jumlah leukosit limfosit, monosit, dan granulosit mencit jantan yang diinduksi tinta karbon.

## 3. Variabel terkendali

Variabel terkendali yang digunakan ialah biji pinang (*Areca Catechu L.*) yang diperoleh di STT Kanaan Ungaran yang akan di uji aktivitas imunomodulatornya dengan diinduksi tinta karbon serta dilihat berdasarkan profil hematologi setelah pemberian ekstrak pada hewan uji.

## **F. Alat dan Bahan**

### 1. Alat

Untuk melakukan penelitian pada uji biji pinang diperlukan alat untuk melakukan ekstraksi dan uji imunomodulator yaitu alat maserasi, rotary evaporator (RE-2000E), waterbath, Blood Analyzer, microtube (0,5 ml), pipet tetes, kandang dan tempat makan minum hewan uji, Muffle furnace (Thermolyte), Moisture balances (Ohaus), beker glass (Iwaki 100ml), spuid intravena (Onemed), ayakan mesh no. 40, blender (Philips), oven (Memmert), corong gelas (iwaki), micropipet, cawan porselen, kertas

saring, gelas ukur (Herma 100ml), timbangan hewan, timbangan analitik (Ohaus), enlermeyer (Iwaki).

## 2. Bahan

Biji pinang (*Areca Catechu L.*) diperoleh di STT Kanaan Ungaran, mencit putih jantan sebanyak 25 ekor dengan berat badan 20-30 gram, fitofarmaka imunostimulan *Phyllanthus niruri L* (Apotek Ngudi Waluyo), CMC Na 0,1%, tinta cina (Pelikan 4001), etanol 70% (Indrasari), aquadest, baku dragondroff, baku sitroborat, identifikasi KLT: etil asetat, n-heksan, silica gel GF<sub>254nm</sub>, Uji Tabung: Pemeriksaan alkaloid: asam klorida, LP Mayer, LP Dragondroff, Pemeriksaan Flavonoid: serbuk magnesium, asam klorida pekat, Pemeriksaan Tanin: FeCl<sub>3</sub>.

## G. Prosedur Penelitian

### 1. Determinasi

Determinasi tanaman biji pinang dilaksanakan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.

### 2. Ethical clearance

Pengajuan ethical clearance ini dilakukan sebagai kajian aspek etik penelitian agar perlakuan yang diberikan pada subjek uji sesuai dengan protokol penelitian kesehatan. Pengajuan ini diajukan kepada Komite Etik Penelitian Universitas Ngudi Waluyo (KEP UNW).

### 3. Preparasi Sampel

Preparasi sampel dilakukan untuk meminimalkan adanya pengotor yang ada pada sampel sehingga meminimalisir adanya komponen lain pada simplisia.

Biji pinang sebanyak 2 kg yang diperoleh dari lokasi kemudian dilakukan sortir basah dibawah air mengalir yang berguna untuk memisahkan biji dengan benda asing yang terdapat pada tumbuhan. Kemudian setelah sortir basah selesai dilakukan, potong biji pinang menjadi dua lalu dikeringkan dibawah sinar matahari dengan ditutupi kain hitam untuk mencegah terjadinya degradasi pada biji pinang serta meminimalis kadar air yang terdapat pada biji pinang, dan setelah kering biji pinang dihaluskan sampai berbentuk serbuk menggunakan mesin penghalus (blender).

### 4. Kadar Air

Pengukuran kadar air dilakukan untuk mengetahui banyak nya kadar air yang masih terkandung pada simplisia dan ekstrak. Penentuan kadar air ini diperlukan agar jumlah air yang dihasilkan tidak tinggi, karena semakin tinggi kadar air yang dihasilkan maka dapat mengurangi dan menurunkan kualitas dari biji pinang.

Pengukuran kadar air ini dikerjakan menggunakan alat moisture balance. Metode perlakuan nya yaitu terlebih dahulu setarakan alat

kemudian ditimbang sebanyak 2 gram masukan kedalam alat tersebut dan dilihat hasil yang terdapat pada layar alatnya (Ramadhani *et al.*, 2020).

Persyaratan kadar air yang ditentukan pada simplisia kering yaitu kurang dari 10%. Serbuk simplisia juga disimpan dalam tempat yang gelap agar tidak terjadi dekomposisi dari kandungan senyawa yang ada pada suatu simplisia (Puspitasari *et al.*, 2019).

#### 5. Kadar Abu

Sampel yang akan digunakan ditimbang sebesar 2-3 g, masukkan kedalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan dan timbang. Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b (Ditjen POM, 2017).

Fungsi kadar abu yaitu mengetahui komponen yang tidak mudah menguap (komponen anorganik atau garam mineral) yang tetap ada saat pemijaran senyawa organik. Hasil dari kadar abu jika semakin tinggi kadar abu maka semakin buruk kualitas dari simplisia dan ekstrak, tetapi jika semakin rendah kadar abu suatu simplisia dan ekstrak, maka semakin tinggi kemurniannya (Siswati, 2020).

#### 6. Pembuatan Ekstrak

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Metode maserasi digunakan pada penelitian ini karena pada proses ini tidak menggunakan panas sehingga tidak akan merusak senyawa metabolit



sekunder (flavonoid, tanin, alkaloid, saponin) yang terkandung dalam simplisia (Kiswandono, 2011).

Pembuatan ekstrak biji pinang menggunakan perbandingan 1:10 bagian untuk mendapatkan 100% ekstrak murni (Anief, 2000). Langkah awal dalam pembuatan ekstrak yaitu menggunakan perbandingan 1:7,5 untuk maserasi dengan cara 500 gram serbuk simplisia dilarutkan dengan etanol 70% sebanyak 3750 ml selama 3 hari dan ditempatkan dalam wadah tertutup, kemudian lakukan remaserasi dengan perbandingan 1:2,5 selama 2 hari dengan menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 1250 ml (Suhatri, 2011). Maserat yang diperoleh kemudian digabungkan menjadi satu dan dipekatkan menggunakan rotary evaporator suhu 50°C lalu dikentalkan dengan waterbath suhu 50°C.

Pemilihan etanol 70% dengan tujuan meningkatkan keamanan dan kemudahan saat ekstrak diuapkan dimana etanol 70% mampu melarutkan senyawa yang bersifat polar, semipolar dan non polar (Ramadhani *et al.*, 2020). Penggunaan etanol 70% memiliki sifat polar dan metabolit sekunder pada biji pinang yang dominan ialah tanin dan alkaloid, dimana golongan tanin dan alkaloid merupakan senyawa fenolik yang larut dalam air sehingga cenderung bersifat polar. Berdasarkan kepolaran dan kelarutan, senyawa yang bersifat polar akan mudah larut dalam pelarut polar, sedangkan senyawa nonpolar akan mudah larut dalam pelarut nonpolar (Padmasari *et al.*, 2013).

## 7. Identifikasi Metabolit Sekunder menggunakan KLT

### 1. Identifikasi Tanin dan Alkaloid

Identifikasi ini dilakukan untuk pengujian metabolit sekunder yang terkandung pada biji pinang serta mengidentifikasi adanya senyawa tanin dan alkaloid menggunakan kromatografi lapis tipis. Pengujian dengan KLT memakai fase diam silika gel GF 254 sedangkan fase gerak adalah n-heksan : etil asetat (1:9). Reagen semprot pada identifikasi alkaloid menggunakan dragendroff dan tanin menggunakan sitroborat. Pengamatan noda dilakukan dengan sinar tampak, lampu UV 254 nm dan 366 nm.

### 2. Uji Tabung

#### A. Pemeriksaan Alkaloid

Sampel ditimbang sebanyak 500 mg, tambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air, panaskan di atas penangas air selama 2 menit, dinginkan lalu saring. Filtrat diambil sebanyak 3 tetes masukkan kedalam spot plat/tabung reaksi, lalu ditambahkan ke masing-masing spot plat/tabung reaksi 2 tetes larutan pereaksi (LP) Meyer dan dragendroff. Hasil menunjukkan positif alkaloid jika dengan LP Meyer terbentuk endapan/adanya gumpalan putih atau putih kekuningan, dan LP Dragendroff terbentuk endapan kuning jingga (Surbakti, 2018).

## B. Pemeriksaan Flavonoid

Sebanyak 500 gram sampel ditambahkan 20 ml air panas, dididihkan selama 10 menit dan disaring dalam keadaan panas, ke dalam 5 ml filtrat ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium dan 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah. Flavonoida positif jika terbentuk warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol (Surbakti, 2018).

## C. Pemeriksaan Tanin

Sebanyak 500 gr sampel dilarutkan dengan 10 ml air suling, disaring lalu filtratnya diencerkan dengan air suling sampai tidak berwarna. Filtrat yang diperoleh diambil 2 ml, lalu ditambahkan 1-2 tetes pereaksi  $FeCl_3$ . Jika hasil yang diperoleh berwarna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Surbakti, 2018).

## 8. Uji Imunomodulator

### a. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan ialah mencit putih jantan galur swiss webster dengan berat badan rata-rata 20-30 gram, umur 2-3 bulan sebanyak 25 ekor. Hewan uji yang kemudian dikelompokkan secara acak dan dibagi menjadi 5 kelompok.

b. Metode uji bersihan karbon

Metode bersihan karbon ialah metode yang dipakai untuk mengukur aktivitas eliminasi partikel karbon dari aliran darah oleh makrofag (Linsentia, 2011). Uji ini berguna untuk melihat pengaruh ekstrak biji pinang terhadap kemampuan fagositosis makrofag pada partikel asing.

Pada metode ini, hewan uji yang dipakai ialah mencit putih jantan sejumlah 25 ekor terbagi menjadi 5 kelompok perlakuan yang sebelumnya telah dilakukan aklimatisasi selama 7 hari untuk beradaptasi dengan lingkungan sekitar.

<b>Kelompok</b>	<b>Perlakuan</b>
<b>Kelompok 1 (Kontrol Negatif)</b>	Pada hari ke 1-6, hewan uji diberikan CMC Na 0,1%
<b>Kelompok 2 (Kontrol Positif)</b>	Pada hari ke 1-6, hewan uji diberikan sediaan fitofarmaka <i>Phyllanthus niruri</i> L sebanyak 9,1 mg/20 gram BB
<b>Kelompok 3</b>	Pada hari ke 1-6, hewan uji diberikan ekstrak biji pinang sebanyak 0,5 mg/ 20 gram BB
<b>Kelompok 4</b>	Pada hari ke 1-6, hewan uji diberikan ekstrak biji pinang sebanyak 1 mg/20 gram BB
<b>Kelompok 5</b>	Pada hari ke 1-6, hewan uji diberikan ekstrak biji pinang sebanyak 2 mg/ 20 gram BB

Setiap kelompok diberikan perlakuan sekali sehari selama 7 hari secara per oral, namun hewan uji tetap diberikan makan dan

minum secara per oral selama masa pengujian berlangsung. Pada hari ke-8, semua mencit disuntikan secara intravena dengan tinta cina pelikan melalui pembuluh darah ekor sebanyak 0,1 ml. Kemudian darah mencit diambil melalui ekor pada menit ke-0 dan menit ke-15 lalu ditampung pada microtube 0,5 ml.

## 9. Penetapan Tinta Karbon

### 9.1 Perlakuan Tinta Karbon

Tinta karbon sebanyak 5 g dimasukkan ke dalam cawan penguap dan diuapkan dalam oven pada suhu 105°C selama 30 menit (Alfitasari *et al.*, 2017)

### 9.2 Pembuatan Suspensi Karbon

Suspensi tinta karbon dibuat dengan menambahkan 1,6 ml tinta karbon ke dalam 8,4 ml larutan gelatin 1% b/v dalam NaCl 0,9% (Linsentia, 2011).

## H. Analisis Data

Pada penelitian ini data hasil berupa parameter hematologi seluruh kelompok perlakuan yang diperoleh dibuat dalam bentuk tabel dan dilanjutkan dengan analisis secara statistik menggunakan software SPSS dengan metode uji ANOVA untuk menentukan perbedaan rata-rata diantara kelompok. Jika terdapat perbedaan, dilanjutkan uji Pos Hoc Tukey HSD untuk melihat perbedaan nyata antar kelompok uji. Data yang tidak normal dianalisis menggunakan uji Kruskal Wallis untuk menentukan perbedaan rata-

rata diantara kelompok, dan dilanjutkan uji Post Hoc Wilcoxon. Data dikatakan signifikan jika ditunjukkan dengan nilai  $p < 0,05$  sedangkan jika hasil  $p > 0,05$  maka nilai tersebut dapat dikatakan dengan nilai tidak signifikan. Dengan adanya perbedaan hasil ini akan mencerminkan peningkatan atau penurunan profil hematologi hewan uji yang diinduksi tinta karbon setelah pemberian ekstrak biji pinang.