

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Lokasi Penelitian

Jenis penelitian ini adalah bersifat eksperimental. Lokasi penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Farmasi Universitas Sahid Surakarta.

3.2 Instrumen Penelitian

3.2.1 Alat

Seperangkat alat gelas (*pyrex*), timbangan analitik (*ACIS*), plastimograf (lokal), seperangkat alat maserasi, oven (*Memmert*), kain flannel, sudip, dan *vacuum rotary evaporator (biobase)*.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah kertas saring, aquadestilata (*water for injection* bebas pirogen), simplisia daun dan buah adas, karagenin 1%, etanol 96%, CMC Na 1% (*bratachem*), NaCl 0,9%, Natrium Diklofenak 50 mg (*Planet Kimia*).

3.2.3 Hewan uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar sebanyak 24 tikus dengan berat 150 - 250 gram umur 2 - 4 bulan yang diperoleh dari Universitas Muhammadiyah Surakarta, disimpan dalam kandang tikus pada suhu ruang, lampu

dalam keadaan hidup selama 12 jam dan lampu keadaan mati selama 12 jam, diberikan makanan standar dan diberikan minum (Purnamasari, 2013). Pengelompokan dilakukan secara acak masing-masing 3 ekor per kelompok. Semua tikus dipelihara dengan cara yang sama, mendapatkan diet yang sama.

3.3 Sampel

Daun dan buah tanaman adas diambil dari Cepogo, Boyolali dan dipilih secara acak dengan memilih daun pada saat proses fotosintesis berlangsung maksimal, berwarna hijau, tidak terlalu tua dan juga tidak terlalu muda. Buah yang dipilih yang sudah tua diambil dalam keadaan masih segar.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol dari daun adas dan buah adas untuk antiinflamasi yang akan diinduksi pada hewan uji.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah titik pusat atau tujuan persoalan yang merupakan kriteria dari penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek antiinflamasi dari ekstrak etanol daun adas dan buah adas terhadap penurunan volume edema pada tikus putih jantan galur wistar yang diinduksi karagenin 1%.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel bebas. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kondisi hewan uji yang meliputi berat badan, usia, jenis kelamin yang digunakan, galur, dosis pemberian.

3.5 Jalannya Penelitian

1) Determinasi Tanaman Adas

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi tanaman untuk menetapkan kebenaran yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi pada tanaman secara makroskopis dan dengan acuan buku yang dibuktikan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar.

2) Pembuatan ekstrak etanol daun dan buah adas

Daun dan buah adas dicuci bersih dengan air yang mengalir untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel, lalu ditiriskan dan dipotong-potong, setelah itu dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C. Tanaman ini diperoleh dari Cepogo, Boyolali.

Daun dan buah adas yang telah dikeringkan kemudian dihaluskan dengan mesin penyerbuk dan diayak dengan nomor 40 *mesh* sehingga diperoleh serbuk daun dan buah adas yang mempunyai derajat kehalusan yang relatif homogen. Pembuatan serbuk ini bertujuan untuk memperluas permukaan partikel bahan

yang kontak dengan pelarut sehingga penyarian dapat berlangsung efektif.

Serbuk buah dan daun adas diekstraksi menggunakan etanol 96% dengan cara maserasi pada suhu kamar selama 3 x 24 jam. Maserasi dilakukan dengan cara serbuk dimasukkan ke dalam maserator kemudian ditambahkan pelarut etanol 96% dengan perbandingan pada daun adas dan buah adas (1:5) dan diaduk setiap 12 jam kemudian didiampkankan selama 24 jam pada tempat yang terlindung dari cahaya matahari. Setelah 3 hari maserat disaring dan diperas. Maserat yang didapat kemudian disaring dengan corong buchner dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* lalu diuapkan di *waterbath* pada suhu 60°C hingga diperoleh konsistensi kental. Rendemen yang diperoleh yaitu persentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan. Pelarut etanol 96% lebih awet dalam penyimpanan karena mengandung kadar air yang sedikit sehingga lebih kecil kemungkinan untuk tumbuh bakteri (Septiani, 2018). Adapun perhitungan rendemen sebagai berikut :

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

3) Pembuatan larutan uji

a) Pembuatan suspensi karagenin 1%.

Terlebih dahulu membuat pelarut untuk larutan karagenin 1% digunakan larutan garam fisiologis konsentrasi 0,9% dibuat

dengan cara 0,9 g NaCl dilarutkan dengan aquadestilata hingga volume 100 mL. Setelah itu barulah membuat larutan uji pembuat udemia dengan cara ditimbang sejumlah 1 g karagenin, kemudian larutkan dalam 100 mL Natrium klorida 0,9% di dalam Beaker glass. Volume injeksi secara intraplantar pada kaki kiri belakang setiap tikus sebanyak 0,1 mL sudah dapat menimbulkan udemia yang dapat teramati secara jelas (Septiani, 2018).

b) Pembuatan larutan CMC Na 1%.

Kontrol negatif digunakan CMC Na 1% yang memiliki makna 1 gram CMC Na dalam 100 mL aquadestilata. Sebanyak 1 gram serbuk CMC Na dimasukkan dalam cawan penguap kemudian ditambahkan dengan sedikit aquadestilata dan dipanaskan sampai mengembang, setelah mengembang dimasukkan dalam mortir dan digerus dengan menambahkan sedikit demi sedikit aquadestilata hingga 100 mL, kemudian diaduk hingga homogen (Bhuja, 2016).

c) Pembuatan larutan Natrium Diklofenak.

Ditimbang seksama 45,00 mg Natrium Diklofenak kemudian dimasukkan kedalam mortir, gerus dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL kemudian ditambahkan CMC Na 1% sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 0,45 mg/mL. Dosis Natrium Diklofenak pada manusia = 50 mg Faktor konversi manusia ke berat tikus 200 gram = 0,018

$$\begin{aligned}\text{Dosis pada tikus} &= 0,018 \times 50 \text{ mg} \\ &= 0,9 \text{ mg}/200 \text{ gram BB tikus} = 4,5 \text{ mg/kg BB}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Larutan stok Natrium Diklofenak} &= 9 \text{ mg}/10 \text{ mL} \\ &= 0,9 \text{ mg}/1 \text{ mL}\end{aligned}$$

d) Pembuatan larutan ekstrak daun dan buah adas

Ekstrak daun adas maupun buah adas ditimbang sebanyak 7 gram, kemudian digerus dalam mortir dengan tujuan untuk mengecilkan partikel setelah itu ditambahkan larutan suspensi CMC Na diaduk sampai homogen dan kemudian dituang kedalam botol sampai tanda kalibrasi 100 mL lalu ditambahkan aquadestilata ad tanda batas yang diinginkan (Septiani, 2018). Larutan stok ekstrak etanol daun dan buah adas yaitu 7 gram ekstrak/ 80 mL CMC Na sehingga didapatkan 87,5 mg/mL

e) Uji Antiinflamasi

Pada penelitian ini hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan galur Wistar yang berumur 2-3 bulan dengan bobot badan 150-250 gr. Masing-masing 3 hewan uji disetiap kelompok percobaan. Prosedur uji antiinflamasi yaitu tikus dipuasakan 18 jam sebelum pengujian, kemudian air minum tetap diberikan. Tikus ditimbang dan dikelompokkan secara acak. Ada 24 ekor tikus yang dibagi menjadi 8 kelompok secara acak. Kaki kiri belakang setiap tikus yang akan diinduksi diberi tanda pada mata kaki, kemudian diukur volumenya terlebih dahulu dengan cara

memasukkan telapak kaki tikus kedalam plastismograf hingga tanda batas. Setiap tikus diberi perlakuan sesuai kelompoknya.

Tabel 1. Perlakuan hewan uji

	Kelompok	Perlakuan
I	Kontrol negatif	(CMC-Na 1%)
II	Kontrol positif	(Na Diklofenak 4,5mg/kg BB tikus)
III	Ekstrak daun adas	(87,5 mg/kg BB tikus)
IV	Ekstrak daun adas	(175 mg/kg BB tikus)
V	Ekstrak daun adas	(350 mg/kg BB tikus)
VI	Ekstrak buah adas	(87,5 mg/kg BB tikus)
VII	Ekstrak buah adas	(175 mg/kg BB tikus)
VIII	Ekstrak buah adas	(350 mg/kg BB tikus)

Volume telapak kaki tikus diukur pada variasi waktu pengamatan 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, dan 2.00, dan variasi dosis seperti tabel 1 dengan cara memasukkan telapak kaki tikus ke dalam alat plastismograf hingga batas tanda, menghitung AUC volume edema, dan menghitung % daya antiinflamasinya.

f) Perhitungan Daya Antiinflamasi

Volume edema dihitung dari selisih volume telapak kaki tikus sesudah dan sebelum penginduksian karagenin 1%.

Rumus menghitung volume edema:

$$V_u = V_t - V_o$$

Keterangan :

V_u : Volume edema kaki tikus tiap waktu t

V_t : Volume edema kaki tikus setelah diinduksi karagenin 1% pada waktu (t)

V_0 : Volume edema kaki tikus sebelum dikaragenin 1%

Setelah diperoleh nilai volume edema kaki tikus, ditentukan nilai *Area Under Curve* (AUC) dengan rumus:

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

Keterangan :

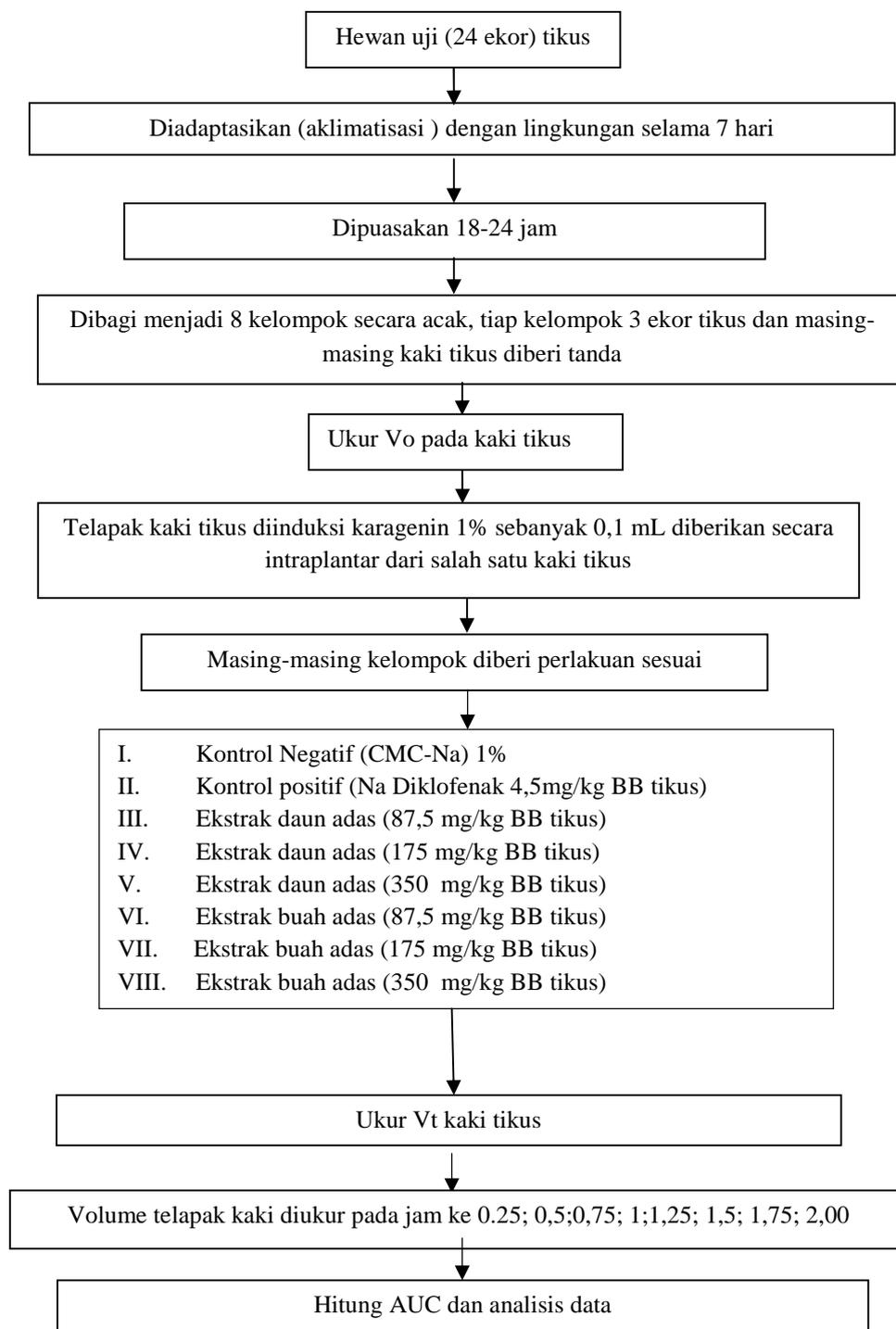
AUC_{tn-1}^{tn} : luas daerah dibawah kurva presentase radang terhadap waktu kelompok perlakuan

V_{tn} : volume edema (mL)

tn : waktu (jam)

Nilai AUC yaitu luas daerah rata-rata di bawah kurva yang merupakan hubungan volume edema rata-rata tiap satuan waktu (Apridamayanti, Sanera, & Robiyanto, 2018).

3.6 Skema Penelitian



Gambar 2. Skema Penelitian

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk melihat normalitas data, serta uji *Levene* untuk melihat homogenitas data. Data yang terdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan uji statistik parametrik *One-Way Anova* dengan tingkat kepercayaan 95% (Mughniyah, 2016).