

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Lokasi Penelitian

Jenis penelitian bersifat eksperimental dimana dilakukan perlakuan terhadap subjek uji dan bersifat eksploratif, mengetahui aktivitas infusa buah pare sebagai antiinflamasi pada tikus putih jantan galur wistar yang diinduksi karagenin dan penelitian di Laboratorium Farmakologi Farmasi Universitas Sahid Surakarta.

3.2 Populasi dan Sampel

- a. Populasi adalah jumlah keseluruhan dari satuan-satuan atau individu-individu yang karakteristiknya hendak diteliti, berdasarkan hal tersebut populasi pada penelitian ini adalah buah pare yang diambil dari Pasar Kleco, Surakarta.
- b. Sampel adalah suatu bagian dari keseluruhan serta karakteristik yang dimiliki oleh sebuah populasi yang dimaksud dalam penelitian ini adalah infusa buah pare dengan konsentrasi dosis 8%, 24%, dan 44%.

3.3 Instrumen Penelitian

3.3.1 Alat

Pisau, Blender (Panasonic), Ayakan mesh 20, panci infusa dan kompor listrik (Maspion), kertas saring, tabung reaksi, *waterbath*, timbangan analitik (ACIS),

plestimograf (lokal), *magnetic stirrer* (thermo), spuit injeksi (*onemed*), sonde oral tikus, kandang tikus, timbangan tikus (*scale max 500g*).

3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini untuk uji kuantitatif adalah infusa buah pare sebagai sampel pengujian, karagenin 1% (*Bratacho*), Na-Diklofenak (*Bratacho*), CMC Na (*Bratacho*), *aquadestilata*.

3.3.3 Hewan Uji

Tikus putih jantan galur wistar diambil dari Universitas Setia Budi dengan kriteria umur 2 - 3 bulan dan berat badan 150 - 200 gram.

3.4 Variabel Penelitian

a. Variable Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang direncanakan untuk di teliti yang berpengaruh terhadap variabel tergantung, variabel bebas yang dimaksud adalah konsentrasi infusa buah pare dengan konstentrasi dosis 8%, 28% dan 44%.

b. Varaibel Tergantung

Dalam penelitian ini adalah titik pusat permasalahan yang merupakan kriteria dalam penelitian, variabel dalam penelitian ini berupa efektivitas antiinflamasi infusa buah pare terhadap tikus putih jantan galur wistar.

c. Variabel Terkendali

Dalam penelitian ini adalah variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel tergantung, sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya

agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti yang lain secara tepat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kondisi fisik dari hewan uji meliputi berat badan 150 - 200 gram, usia (2-3 bulan), galur wistar dan jenis kelamin, digunakan serta kondisi peneliti.

3.5 Jalannya Penelitian

3.5.1 Determinasi Tanaman

Pada tahap pertama dalam penelitian ini dilakukan determinasi tanaman buah pare untuk menentukan kebenaran yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi pada tanaman secara makroskopis dan dari buku yang dibuktikan di UPT-Laboratoirum Universitas Setia Budi, Jalan Letjen Sutoyo, Mojosongo Kecamatan Jebres, Kota Surakarta Jawa Tengah 57127

3.5.2 *Ethical Clearance*

Pada penelitian ini dilakukan pengujian pada Komisi Etik Penelitian RSUD Dr. Moewardi Jl. Kolonel Sutarto No.132, Jebres, Kec. Jebres, Kota Surakarta, Jawa Tengah 57126. *Ethical Clearance* merupakan syarat dalam melakukan penelitian yang melibatkan makhluk hidup yang menyatakan bahwa suatu proposal penelitian layak dilaksanakan setelah memenuhi persyaratan tertentu.

3.5.3 Pengeringan dan Pembuatan Serbuk

Bahan baku disortasi (tidak terlalu tua dan juga tidak terlalu muda) selanjutnya dibersihkan dan dicuci terlebih dahulu dengan air bersih, dirajang (ditiris tipis-tipis) lalu bahan diletakkan pada loyang yang terbuat dari alumunium dan dikeringkan di dalam oven pada suhu 40°C. Buah pare yang telah kering

kemudian dibuat serbuk dengan cara diblender kemudian di ayak dengan ayakan 40 *mesh* sehingga diperoleh serbuk dengan derajat kehalusan yang relatif homogen. Penyerbukan ini bertujuan untuk memperluas permukaan partikel bahan yang kontak dengan pelarut sehingga penyerapan dapat berlangsung efektif (Ainia, 2017).

3.5.4 Pembuatan Infusa Buah Pare

Buah pare diekstraksi menggunakan metode infusa. Metode infusa dipilih karena unit alat yang dipakai sangat sederhana sehingga biaya operasional yang diperlukan relatif rendah.

Pembuatan infusa mengikuti standar dalam Farmakope Indonesia (1995), akan tetapi jumlah serbuk simplisia ditingkatkan menjadi 30 g dari standar Farmakope yaitu 10 g, untuk dihasilkan infusa pekat. Diperlukan serbuk pare kering sebanyak 30 g yang dilarutkan dalam 100 mL air dan dimasukkan ke dalam panci infusa. Panci dipanaskan di dalam penangas air selama 15 menit dihitung mulai suhu di dalam panci mencapai 90°C sambil sesekali diaduk. Penyaringan dilakukan selagi panas menggunakan kain putih (Depkes, 1995).

3.5.5 Uji Fitokimia

a. Uji Flavonoid

1 mL larutan infusa buah pare ditambahkan 10 tetes H₂SO₄. Diamati perubahan warna yang terjadi dalam waktu 2-5 menit. Reaksi positif flavonoid ditunjukkan terbentuknya warna merah sedangkan reaksi negatif tidak terbentuknya warna merah (Yuniarti *et al.*, 2015).

b. Uji Saponin

2 mL larutan infusa ditambahkan 5 mL air panas, lalu dikocok selama 2 menit. Setelah itu ditambahkan 2 tetes HCl pekat dan dikocok lagi. Uji positif ditunjukkan oleh terbentuknya busa permanen \pm 15 menit sedangkan uji negatif tidak terbentuk adanya busa (Yuniarti *et al.*, 2015).

c. Uji Alkaoid

Infusa pekat buah pare sebanyak 2 mL dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 0,5 mL HCl 2 %. Larutan dibagi menjadi 2 dipakai untuk uji alkaloid sebagai berikut:

1. Filtrat 1 ditambah dengan 2-3 tetes larutan pereaksi Mayer akan terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning bila terdapat alkaloid.
2. Filtrat 2 ditambah dengan 2-3 tetes larutan pereaksi *Dragendorff* akan terbentuk endapan jingga bila terdapat alkaloid (Aini, 2017).

d. Terpenoid dan Steroid

Sebanyak 2 mL infusa buah pare ditambahkan 0.5 mL kloroform dan 0.5 mL asam asetat anhidrat. Setelah itu ditambahkan 2 tetes asam sulfat pekat. Apabila terbentuk warna biru atau biru hijau menunjukkan adanya steroid sedangkan bila terbentuk cincin kecoklatan menandakan adanya terpenoid (Harborne, 1987).

3.6 Pembuatan Larutan

3.6.1 Pembuatan Larutan CMC Na 1%

Larutan CMC Na 1% sebagai kontrol negatif berupa 1 gram dalam 100 mL aquadestilata. Sebanyak 1 gram serbuk CMC Na dimasukkan kedalam cawan

penguap kemudian ditambahkan aquadestilata sedikit dan dipanaskan sampai mengembang, setelah mengembang dimasukkan kedalam mortir dan digerus dengan menambahkan sedikit demi sedikit aquadestilata sampai 100 mL dan aduk hingga homogen (Bhuja, 2016) diberikan ke hewan uji secara peroral.

3.6.2 Pembuatan Larutan Karagenin 1%

Pertama membuat pelarut terlebih dengan cara 0.9 g NaCl dilarutkan dengan aquadest hingga 100 mL selanjutnya pembuatan karagenin dengan cara 1 g karagenin dilarutkan dalam 100 mL NaCl 0,9% didalam beker glass. Untuk cara pemberian diberikan secara *intraplantar* (septiani, 2018).

3.6.3 Pembuatan Larutan Natrium Diklofenak

Volume maksimal larutan uji secara oral yang dapat diberikan pada tikus dengan berat badan 150 sampai 200 gram adalah 5 mL. Dosis natrium diklofenak yang digunakan untuk manusia 50 mg/kg BB manusia (Munghniyah, 2016). Faktor konversi dari manusia dengan berat badan 70 kg pada tikus dengan berat badan 200 g adalah 0,018.

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

$$\begin{aligned} \text{VP secara PO} &= \frac{1}{2} \times V_{\text{max}} \\ &= \frac{1}{2} \times 5 \text{ mL} \\ &= 2,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Larutan stock 100 mL} &= \frac{100 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL}} \times 0,9 \text{ mg} \\ &= 36 \text{ mg ad 100 CMC Na 1\%} \end{aligned}$$

Cara pemberian ke hewan uji secara *intraplantar* (Setyawati, 2020).

3.6.4 Pembuatan Larutan Stok Infusa Buah Pare

Dari penelitian yang telah dilakukan oleh (Parawansah *et al.*,2016) menunjukkan bahwa ekstrak etanol buah pare memiliki aktivitas antiinflamasi dan antipiretik dengan dosis yang diberikan 50 mg/KgBB mencit, 150 mg/KgBB mencit, 250 mg/KgBB mencit.

- a. Dosis absolut untuk mencit 20 gram, dengan dosis 50 mg/kgBB mencit

$$= \frac{20 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 50 \text{ mg}$$

$$= 1 \text{ mg}$$

faktor konversi dari mencit (20 g) ke tikus (200 g) adalah 7

Dosis ekstrak etanol buah pare untuk BB tikus (200 g)

$$= 1 \text{ mg} \times 7 = 7 \text{ mg}$$

(Perkiraan berat simplisia kering jika rendemen ekstrak etanol buah pare 10%)

7 mg ekstrak etanol buah pare setara dengan

$$= \frac{100}{10} \times 7 \text{ mg}$$

$$= 70 \text{ mg (simplisia kering buah pare)}$$

Volume pemberian infusa buah pare untuk tikus (200 g) dengan konsentrasi infusa buah pare 30%. Berat simplisia yang digunakan untuk membuat infusa buah pare 100 mL adalah 30 gram.

$$= \frac{70 \text{ mg}}{30000 \text{ mg}} \times 100 \text{ mL}$$

$$= 0,2 \text{ mL}/200 \text{ gBB tikus}$$

Volume pemberian suspensi infusa buah pare untuk tikus (200 g) = 2,5 mL.

Jadi konsentrasi infusa buah pare dalam suspensi CMC Na 1% adalah

$$= \frac{0,2 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL}} \times 100\%$$

$$= 8 \% \text{ (v/v)}$$

Pembuatan larutan stok suspensi infusa buah pare dengan konsentrasi 8 % (v/v) adalah

$$= 8 \text{ mL (Infusa buah pare) ditambah CMC Na 1% ad 100 mL}$$

b. Dosis absolut untuk mencit 20 gram, dengan dosis 150 mg/kgBB mencit

$$= \frac{20 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 150 \text{ mg}$$

$$= 3 \text{ mg}$$

faktor konversi dari mencit (20 g) ke tikus (200 g) adalah 7

Dosis ekstrak etanol buah pare untuk BB tikus (200 g)

$$= 3 \text{ mg} \times 7$$

$$= 21 \text{ mg}$$

(Perkiraan berat simplisia kering jika rendemen ekstrak etanol buah pare 10%)

21 mg ekstrak etanol buah pare setara dengan

$$= \frac{100}{10} \times 21 \text{ mg}$$

$$= 210 \text{ mg (simplisia kering buah pare)}$$

Volume pemberian infusa buah pare untuk tikus (200 g) dengan konsentrasi infusa buah pare 30%. Berat simplisia yang digunakan untuk membuat infusa buah pare 100 mL adalah 30 gram.

$$= \frac{210 \text{ mg}}{30000 \text{ mg}} \times 100 \text{ mL}$$

$$= 0,7 \text{ mL}/200 \text{ gBB tikus}$$

Volume pemberian suspensi infusa buah pare untuk tikus (200 g) = 2,5 mL.

Jadi konsentrasi infusa buah pare dalam suspensi CMC Na 1% adalah

$$= \frac{0,7 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL}} \times 100\%$$

$$= 28 \% \text{ (v/v)}$$

Pembuatan larutan stok suspensi infusa buah pare dengan konsentrasi 28 %

(v/v) adalah

$$= 28 \text{ mL (Infusa buah pare) ditambahkan CMC Na 1% ad 100 mL}$$

c. Dosis absolut untuk mencit 20 gram, dengan dosis 250 mg/kgBB mencit

$$= \frac{20 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 250 \text{ mg}$$

$$= 5 \text{ mg}$$

faktor konversi dari mencit (20 g) ke tikus (200 g) adalah 7

Dosis ekstrak etanol buah pare untuk BB tikus (200 g)

$$= 5 \text{ mg} \times 7$$

$$= 35 \text{ mg}$$

(Perkiraan berat simplisia kering jika rendemen ekstrak etanol buah pare

10%)

35 mg ekstrak etanol buah pare setara dengan

$$= \frac{100}{10} \times 35 \text{ mg}$$

$$= 350 \text{ mg (simplisia kering buah pare)}$$

Volume pemberian infusa buah pare untuk tikus (200 g) dengan konsentrasi infusa buah pare 30%. Berat simplisia yang digunakan untuk membuat infusa buah pare 100 mL adalah 30 gram

$$= \frac{350 \text{ mg}}{30000 \text{ mg}} \times 100 \text{ mL}$$

$$= 1,1 \text{ mL}/200 \text{ gBB tikus}$$

Volume pemberian suspensi infusa buah pare untuk tikus (200 g) = 2,5 mL.

Jadi konsentrasi infusa buah pare dalam suspensi CMC Na 1% adalah

$$= \frac{1,1 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL}} \times 100\%$$

$$= 44 \% \text{ (v/v)}$$

Pembuatan larutan stok suspensi infusa buah pare dengan konsentrasi 44 %

(v/v) adalah

$$= 44 \text{ mL (Infusa buah pare) ditambahkan CMC Na 1% ad100 mL}$$

3.7 Pengujian Efek Antiinflamasi

3.7.1 Orientasi Karagenin

Penetapan waktu orientasi karagenin 1% dilakukan dengan menggunakan 2 ekor tikus. Kaki tikus tersebut diinjeksi dengan karagenin 1% kemudian diukur dengan alat plestimograf. Pengukuran dilakukan tiap 0,5 jam dari waktu 0 hingga kaki tikus kembali normal. Orientasi ini digunakan sebagai dasar pengukuran udem dalam pengujian (Haryoto *et al.*, 2010).

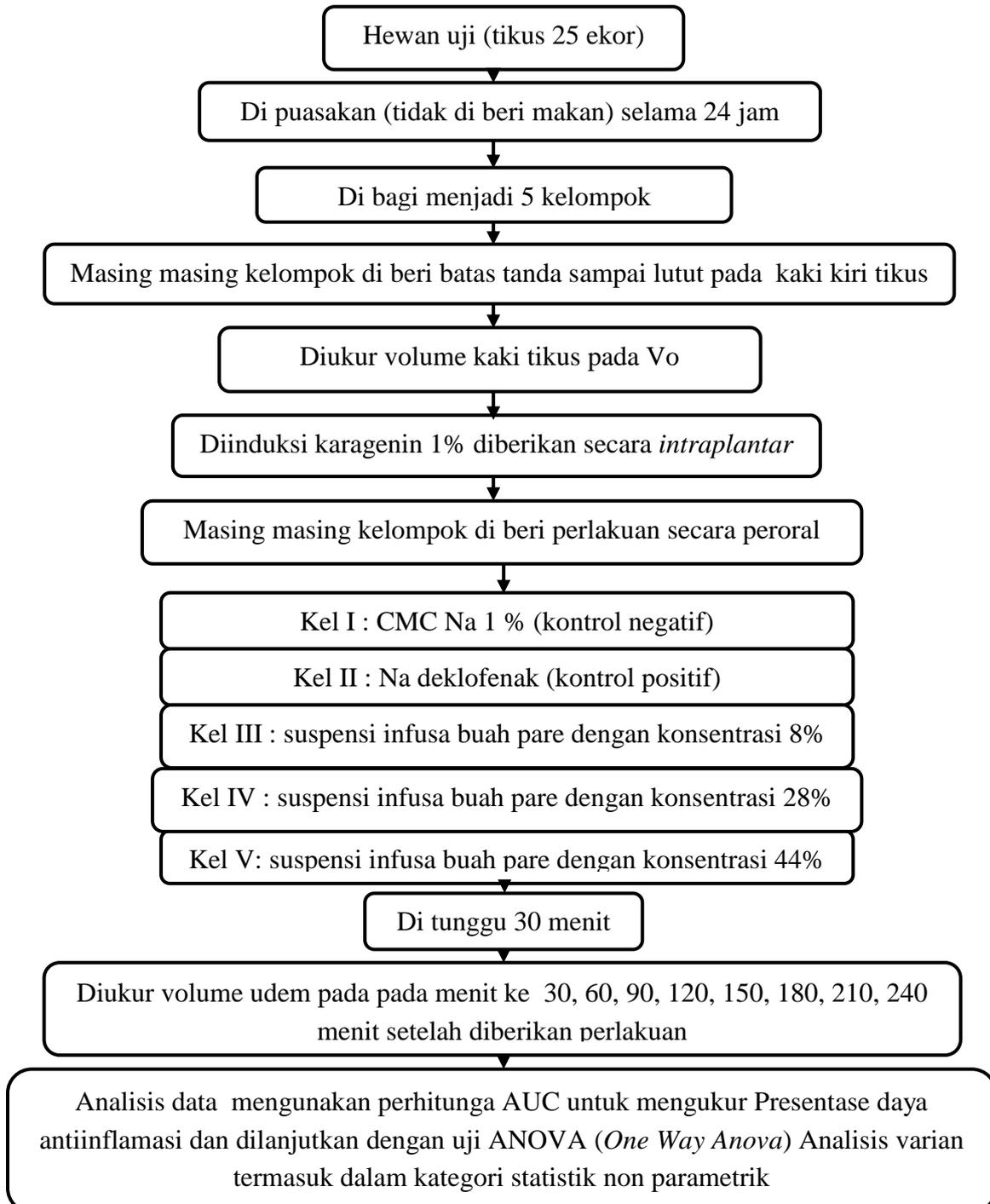
3.7.2 Uji Antiinflamasi

Prosedur pengujian efek antiinflamasi infusa buah pare terhadap tikus putih jantan yaitu, 25 ekor tikus percobaan terlebih dahulu diadaptasikan dengan

lingkungan penelitian, dipuaskan 18-24 jam dan tetap diberikan air minum, kemudian tikus yang telah memenuhi syarat dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok yang sama banyak setiap kelompok diberikan perlakuan sebagai berikut:

- a. Kelompok pertama, tikus putih jantan diberikan CMC Na 1% sebagai kontrol negatif sebanyak 2,5 mL/200 g BB tikus secara peroral 5 menit sesudah pemberian karagenin 1% secara *intraplantar*.
- b. Kelompok kedua, tikus putih jantan diberikan larutan natrium diklofenak sebagai kontrol positif sebanyak 2,5 mL/200 g BB tikus, 5 menit sesudah pemberian karagenin 1% secara *intraplantar*.
- c. Kelompok ketiga, tikus putih jantan diberikan infusa buah pare secara peroral dengan konsentrasi dosis larutan stok 8 % infusa buah pare dalam suspensi CMC Na, 5 menit sesudah pemberian karagenin 1% secara *Intraplantar*.
- d. Kelompok keempat, tikus putih jantan diberikan infusa buah pare secara peroral dengan konsentrasi dosis larutan stok 28 % infusa buah pare dalam suspensi CMC Na, 5 menit sesudah pemberian karagenin 1% secara *intraplantar*.
- e. Kelompok kelima, tikus putih jantan diberikan infusa buah pare secara peroral dengan konsentrasi dosis larutan stok 44 % infusa buah pare dalam suspensi CMC Na, 5 menit sesudah pemberian karagenin 1% secara *intraplantar*.

Tikus putih jantan yang telah di berikan perlakuan diukur volume udemnya pada kaki tikus pada menit ke 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360 menit setelah diberikan infusa buah pare dengan menggunakan alat plestimograf.



Gambar 3.1 Uji Efek Antiinflamasi

3.8 Analisi Data

Pengaruh pemberian infusa buah pare terhadap efek antiinflamasi diperoleh dengan menghitung volume edema. Volume udem merupakan selisih bentuk kaki tikus sebelum dan sesudah diradangkan dengan injeksi *intraplantar* karagenin 1 %.

Menghitung volume udem sebagai berikut:

$$V_u = V_t - V_0$$

Keterangan:

V_u : Volume udem kaki tikus tiap waktu (t)

V_t : Volume udem kaki tikus setelah diradangkan dengan karagenin 1%

V_0 : Volume udem kaki tikus setelah diradangkan dengan karagenin 1%.

Setelah di peroleh volume udem, kemudian dibuat kurva perbandingan volume udem dan waktu. AUC (*Area Under the Curve*) yaitu luas daerah dibawah kurva antara rata-rata volume udem terhadap waktu pengamatan. Rumus yang digunakan untuk menghitung AUC sebagai berikut :

$$AUC = \frac{C_{t_{n-1}} + C_{t_n}}{2} (t_n - t_{n-1})$$

Keterangan :

AUC : Luas daerah rata-rata di bawah kurva yang merupakan hubungan tebal edema rata-rata tiap waktu (*Area Under Curve*)

$C_{t_{n-1}}$: Rata-rata tebal edema pada t_{n-1}

C_{t_n} : Rata-rata tebal edema pada t_n

t_{n-1} : Waktu pengukuran sebelumnya dari menit ke-0 sampai menit ke- 240

t_n : Waktu pengukuran telapak kaki tikus dari menit ke-0 sampai menit ke- 240

Presentase daya antiinflamasi dapat di hitung dengan rumus sebagai berikut

$$\% \text{ Daya antiinflamasi} = \frac{\text{AUC}_k - \text{AUC}_p}{\text{AUC}_k} \times 100\%$$

Keterangan :

AUC_k : AUC kurva volume udem rata – rata terhadap waktu untuk kontrol negatif

AUC_p : kurva volume udem rata rata terhadap waktu untuk kelompok perlakuan tiap individu.

Hasil dari AUC dianalisis statistik didahului dengan analisis homogenitas varian dengan *Levene test* dan uji normalitas dengan *shapiro wilk*. Apabila dari data didapatkan hasil data yang terdistribusi normal dan homogen maka uji dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*, jika hasil tidak menunjukkan beda maka tidak dilakukan uji lanjutan, jika dari data menunjukkan ada beda maka uji dilanjutkan dengan uji *Post hock test* (Apridamayanti *et al.*, 2018).