

## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Jenis dan Rancangan penelitian

Pada penelitian ini menggunakan metode pembentukan radang telapak kaki belakang tikus. Rancangan metode ini ialah menyuntikan karagenan 1% udem pada kaki belakang tikus lalu setelah itu dicek diameter pada kaki hewan uji persatu jam sekali.

### 3.2 Sampel

Daun *C.costata* yang diperoleh di hutan yang banyak di huni Suku Karo sebagai sample dalam penelitian ini. Daun *C.costata* dalam serbuk simplisia diekstraksi dan di fraksinasi kemudian dilakukan uji skrining fitokimia.

### 3.3 Alat dan Bahan

#### 3.3.1 Alat

Timbangan analitik, alat gelas, *blender*, cawan penguap, batang pengaduk, *water bath*, *rotatory evaporator*, corong pisah, pipet, kandang hewan uji tikus, sonde oral, *disposable syringe*, alat ukur *plestismometer*

#### 3.3.2 Bahan

36 tikus putih jantan, fraksi daun *C.costata*, karagenan 1%, gom arab 1%, aquadest, etanol 70%, etil asetat, n-heksan, Natrium Diklofenak 50 mg/kg BB.

### 3.4 Lokasi Penelitian dan Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang dan Lab BALITRO Bogor pada bulan Februari 2021 sampai dengan Juni 2021.

### 3.5 Prosedur Percobaan

#### 3.5.1 Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji tikus jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) di aklimatisasikan selama satu minggu untuk bisa beradaptasi dengan kondisi tepat dan hewan uji diberikan makan dan minum (Steyleynes *et al.*, 2019)

#### 3.5.2 Pembuatan Simplisia

Daun *C.costata* dibersihkan dibawah air bersih minimal dua kali, lalu dikeringkan dengan di jemur di bawah sinar matahari hingga kering. Bahan yang sudah kering lalu diblender dan di ayak hingga mendapat serbuk halus.

### 3.5.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun *C.costata*

Ekstraksi dingin diperoleh dengan merendam bubuk simplisia (500 g) dalam etanol 70% pada suhu kamar selama 3 hari 3 malam. Residu dipisahkan dari filtratnya diulang tiap sehari sekali. Filtrat dikumpulkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 58°C. Ekstrak pekat yang diperoleh dikeringkan pada suhu 40°C sebelum digunakan untuk percobaan. Ekstrak yang telah kering kemudian dilarutkan dalam aquadest untuk pembuatan berbagai dosis. Kemudian ekstrak dicampurkan dengan air dan etanol dalam perbandingan 1:3. setelah itu difraksinasi dengan praktisi cair-cair menggunakan etli asetat dan N-heksana masing-masing dilakukan 4 kali pengulangan sebanyak 150 mL (4 x 150 mL) menggunakan alat corong pisah dengan cara dikocok kuat berkali-kali secara searah kemudian didapatkan hasil fraksi yaitu fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana (Alkandahri *et al.*, 2019).

### 3.5.4 Pembuatan Larutan GOM 1%

Membuat 1% larutan gom arab dengan menimbang 1 g gom arab kemudian dicampur 100 mL aquadest lalu di panaskan menggunakan *hot plate* agar homogen, setelah itu didinginkan. Perbandingan aquadest dan gom arab adalah 100 : 1 dimana dalam 100 mL aquadest terdapat 1 g gom arab (Steleyes *et al.*, 2019)

### 3.5.5 Uji Aktivitas Antiinflamasi Daun *C.costata*

Aktivitas anti-inflamasi dari ekstrak etanol daun *C.costata* dinilai menggunakan edema kaki kanan yang diinduksi karagenan. Perubahan diameter kaki tadi diukur menggunakan *plethysmometer* 30 menit sebelumnya diinduksi dan pada 1, 2, 3, 4, 5 dan 6 jam setelah induksi peradangan. Rata-rata kaki bengkak dalam tes serta kelompok standar

dibandingkan dengan kontrol dan % penghambatan volume edema kaki itu. 36 tikus wistar jantan dibagi secara acak menjadi 9 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 4 tikus sebagai berikut.

- |            |  |
|------------|--|
| Kelompok 1 | kelompok kontrol negatif yaitu tikus yang diberikan induksi karagenin 1%, lalu diberikan GOM 1% PO.                                |
| Kelompok 2 | Kelompok kontrol positif disuntikan induksi karagenin 1% lalu diberikan Natrium Diklofenak 50mg/kg BB yang dilarutkan dalam GOM 1% |
| Kelompok 3 | Kelompok kontrol normal hanya diberikan GOM 1% PO.   |
| Kelompok 4 | Kelompok kontrol terapi diinduksi dengan karagenan 1%, lalu diberikan fraksi air dengan dosis 62,5 mg/kg BB.                       |
| Kelompok 5 | Kelompok kontrol terapi diinduksi dengan karagenan 1%, lalu diberikan fraksi Nettle asetat dengan dosis 62,5 mg/kg BB.             |
| Kelompok 6 | Kelompok kontrol terapi diinduksi dengan karagenan 1%, lalu diberikan n-Heksan dengan dosis 62,5 mg/kg BB.                         |
| Kelompok 7 | Kelompok kontrol terapi diinduksi dengan karagenan 1%, lalu diberikan fraksi air dengan dosis 125 mg/kg BB.                        |
| Kelompok 8 | Kelompok kontrol terapi diinduksi dengan karagenan 1%, lalu diberikan fraksi etil asetat dengan dosis 125 mg/kg BB.                |
| Kelompok 9 | Kelompok kontrol terapi diinduksi dengan karagenan 1%, lalu diberikan fraksi n-Heksan dengan dosis 125 mg/kg BB.                   |

Rumus pengukuran nilai edema, persen inhibisi edema adalah sebagai berikut :

$$\text{Persen radang} = \frac{Ct - Tt}{Ct} \times 100 \%$$

Keterangan :

Ct = diameter kaki pada jam ke-t setelah pemberian karagenan

Tt = diameter kaki sebelum induksi karagenan

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{A - B}{B} \times 100 \%$$

A = % rata-rata peradangan kontrol negatif pada waktu t

B = % rata-rata peradangan pada kelompok perlakuan waktu t

### 3.6 Skrining Fitokimia Daun *C. costata*

#### 1. Pemeriksaan Flavonoid

Sampel di larutkan lalu ditambahkan serbuk mg+Hcl+amil alkohol jika terbentuk warna kuning-merah maka positif flavonoid.

#### 2. Pemeriksaan Glikosida Antrakuinon

Sampel dilarutkan dengan etanol lalu ditambahkan asam sulfat 2 N, dilakukan pemanasan lalu setelah dingin dimasukkan kedalam corong pisah dan ditambah benze 10 ml, lalu dikocok. Lalu lapisan benze diambil kocok kembali dengan larutan NaOH 2 lalu diamkan. Jika terdapat lapisan merah berarti positif glikosida antarkuinon (Salim *et al.*, 2017).

#### 3. Pemeriksaan Steroida/Triterpenoida

Sampel diambil 1g setelah itu dimaserasi. Hasil maserasi diuapkan dalam cawan lalu ditambahkan asam asetat 20 tetes dan asam sulfat 1 tetes. Jika terbentuk warna biru-ungu maka menunjukkan positif steroid/triterpenoidS (Salim *et al.*, 2017).

#### 4. Pemeriksaan Saponin

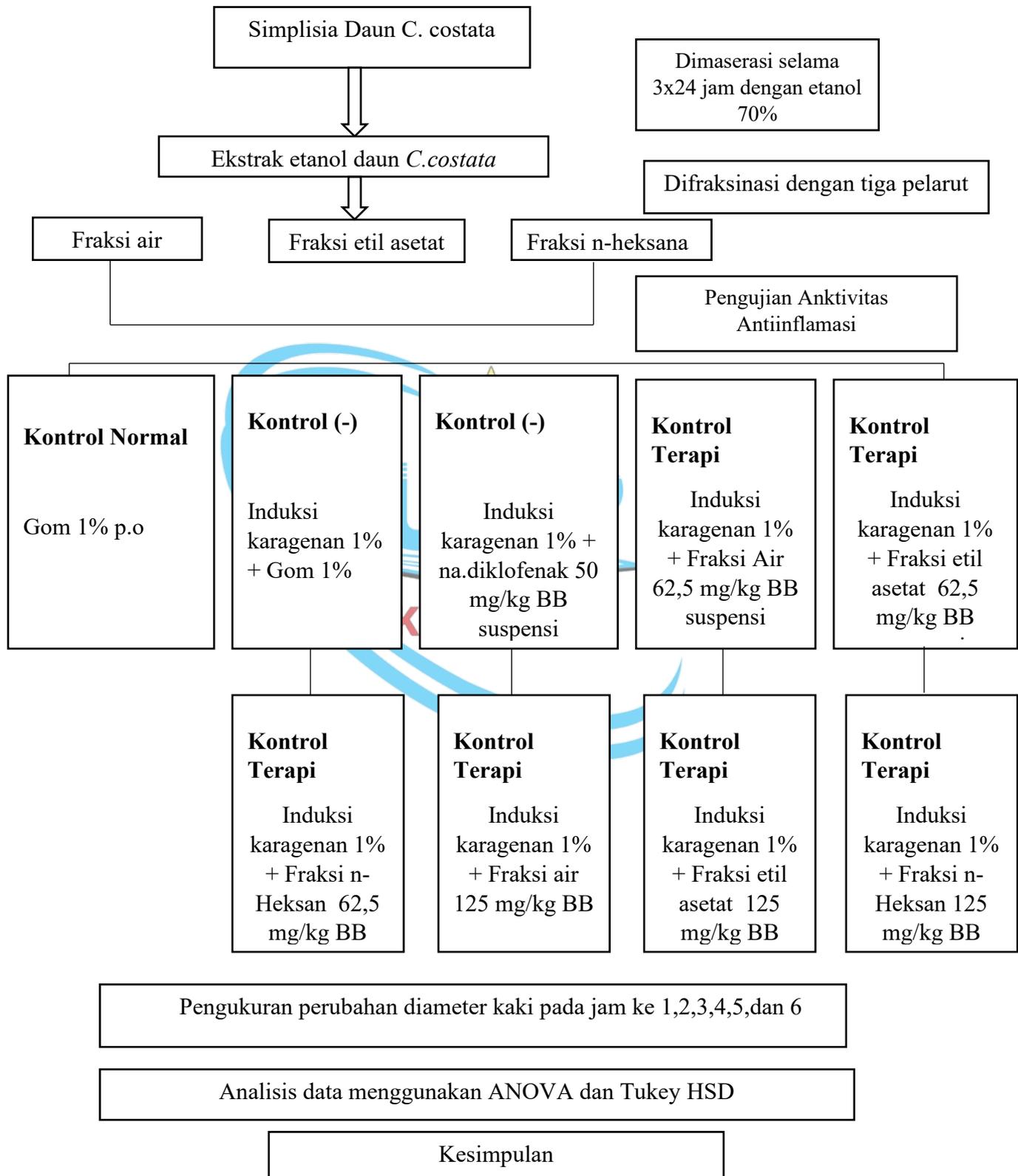
Sampel diambil 0,5 g lalu ditambahkan air panas untuk melarutkan setelah itu dinginkan, lalu kocok hingga kuat selama 10 menit hingga terbentuk buih 1-10 cm. (Salim *et al.*, 2017).

#### 5. Pemeriksaan Tanin

Sampel diambil 0,5 g dilarutkan dengan air 10 ml, setelah itu disaring lalu ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  1-3 tetes. Jika terbentuk warna biru-kehitaman maka positif tanin (Salim *et al.*, 2017).



### 3.7 Skema Penelitian



**Bagan 3. 1** Skema Penelitian

### 3.8 Pemeriksaan Kadar Air

Penentuan kadar air dilakukan dengan metode gravimetri secara tidak langsung yakni ditentukan dari bobot sampel yang diperoleh sebelum dan sesudah dipanaskan dalam oven. Siapkan oven pada suhu 105 °C selama 15 menit. Cawan porselen sebelumnya di panaskan selama satu jam dalam oven dan setelahnya di dinginkan dalam eksikator selama 15 menit. Cawan porselen kosong di timbang. Sebanyak 1,0 gram sampel dimasukkan ke dalam cawan porselen dan dipanaskan dalam oven bersuhu 105°C selama 3 jam. Selanjutnya di dinginkan dalam eksikator selama 15 menit dan ditimbang.

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{\text{Bobot sebelum dikeringkan} - \text{Bobot setelah dikeringkan}}{\text{Bobot sebelum dikeringkan}} \times 100\%$$

Hasil kadar air yang diperoleh kemudian di ukur. Panaskan kembali sampel dalam oven 105°C selama satu jam. Selanjutnya didinginkan dalam eksikator selama 15 menit dan ditimbang. Hasil kadar air yang diperoleh kembali di ukur. Ulangi pemanasan selama 1 jam hingga diperoleh bobot yang konstan (yakni selisih hasil bobot pemanasan sampel pertama dan pemanasan selanjutnya  $\geq 0,01$  gram) (AOAC, 2005).

### 3.9 Analisis Data

Data ditampilkan dalam bentuk deskriptif dengan menilai hasil pemeriksaan kadar antiinflamasi total pada hewan uji dengan kontrol normal, kontrol positif, kontrol negatif, kelompok terapi fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi N-heksana. Kemudian dianalisa oleh SPSS dengan uji ANOVA dan Tukey untuk menentukan perubahan kadar antiinflamasi se sebelum dan sesudah perlakuan dengan  $p < 0,05$  dan data disajikan dalam bentuk grafik.