

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah jenis penelitian eksperimental laboratorium. Yang meliputi identifikasi sampel, pemeriksaan karakteristik simplisia, pengumpulan sampel, pengolahan sampel, skrining fitokimia daun jamblang (*Syzygium cumini* (L) Skeels), pembuatan ekstrak daun jamblang (*Syzygium cumini* (L) Skeels), dan pengujian ekstrak daun jamblang (*Syzygium cumini* (L) Skeels) terhadap pada penurunan volume udem pada kaki belakang tikus putih jantan galur wistar.

Rancangan penelitian dilakukan secara Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan Acak Lengkap (RAL) merupakan rancangan yang paling sederhana jika dibandingkan dengan rancangan-rancangan percobaan lainnya. Dalam rancangan ini tidak terdapat lokal kontrol, sehingga sumber keragaman yang diamati hanya perlakuan dan galat (Hanafiah, 2004).

Rancangan ini menggunakan rumus Federer dalam menentukan jumlah sampel yang akan digunakan yaitu :

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

Keterangan :

K : Jumlah kelompok perlakuan

n : Banyak sampel tiap kelompok

Penelitian ini dengan menggunakan 6 kelompok pengujian, berikut adalah perhitungan untuk menentukan banyaknya sampel tiap kelompok dengan menggunakan rumus Federer :

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

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Dari hasil tersebut maka jumlah sampel tiap kelompok adalah 4.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah hewan uji tikus putih galur wistar yang dikelompokkan secara acak. Dan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah fraksi daun jambang (*Syzygium cumini* (L) Skeels) yang didapatkan dari Kecamatan Klari, Kabupaten Karawang, Provinsi Jawa Barat.

3.3 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun jambang (*Syzygium cumini* (L) Skeels), 48 ekor tikus, etanol 70%, suspensi karagen 1%, aquadest steril, PGA, natrium diklofenak 50 mg, NaOH, H₂SO₄ pekat, Mg-HCl pekat, FeCl₃, pereaksi *Liebermann-Buchard*, HCl, pereaksi mayer, pereaksi dragendorff, n-Heksana, dan etil asetat.

3.3.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat maserasi, timbangan digital, timbangan tikus, *hand scone*, pipet, spatula, tabung reaksi, *water bath*, sonde lambung, *disposable syringe*, kantung tikus, stopwatch, mortir, stemper, *beaker glass*, corong pisah, spidol, jangka sorong dan *alcohol swab*.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Klasifikasi Variabel

a. Variabel Bebas

Variabel bebas yang terlibat dalam penelitian ini adalah variasi dosis ekstrak etanol daun jambang (*Syzygium cumini* (L) Skeels) yang diperoleh melalui orientasi.

b. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter udem pada kaki belakang tikus putih jantan galur wistar.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Pada penelitian ini, definisi operasional variabel dijelaskan dalam table berikut :

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Persyaratan Pengujian
Variabel Bebas					
1.	Dosis	Kadar obat yang mempengaruhi suatu organisme secara biologis; makin besar kadarnya, maka makin besar pula dosisnya.	-	-	-
Variabel Terikat					
1.	Volume udem	Bengkak disebabkan oleh kelebihan cairan yang terjebak dalam jaringan tubuh.	Jangka Sorong	0,01 cm atau 0,1 mm	-

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Determinasi

Determinasi tanaman bertujuan untuk memastikan kebenaran tanaman jamblang (*Syzygium cumini* (L) Skeels) dengan mencocokkan ciri – ciri morfologi dari tanaman jamblang (*Syzygium cumini* (L) Skeels) dengan menggunakan kunci determinasi. Determinasi dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Malang.

3.5.2 Pengumpulan Tanaman

Tanaman yang digunakan untuk penelitian ini adalah daun jamblang (*Syzygium cumini* (L) Skeels) sebanyak 5 kg yang didapatkan di Klari, Jawa Barat.

3.5.3 Pembuatan Simplisia

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jamblang (*Syzygium cumini* (L) Skeels) yang masih segar sebanyak 5 kg kemudian dilakukan pembuatan simplisia. Dengan cara daun yang masih segar dengan kondisi utuh dan baik dibersihkan dari kotoran yang melekat dan dicuci dengan air mengalir. Kemudian daun dijemur dengan cara diangin – anginkan selama beberapa hari. Daun yang sudah kering dihaluskan dengan blender hingga halus sehingga diperoleh 3,5 kg serbuk kering.

3.5.4 Ekstraksi Daun Jamblang

Ambil sebanyak 500 gram sampel berupa serbuk halus daun jamblang (*Syzygium cumini* L) dimaserasi dengan etanol 70% selama 3×24 jam, setiap 24 jam hingga filtrat tidak berwarna. Filtrat disaring dan diuapkan di *water bath* dengan suhu 60 – 70 °C sambil diaduk kemudian dianginkan sehingga diperoleh ekstrak kental. Hitung rendemen dari ekstrak kental daun jamblang (*Syzygium cumini* L). Rendemen dihitung dengan menggunakan satuan persen (%). Semakin tinggi nilai rendemen

yang dihasilkan maka menandakan nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak. Berikut adalah rumus untuk menghitung rendemen :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak Kental (g)}}{\text{Berat Simplisia (g)}} \times 100\%$$

3.5.5 Fraksi Daun Jamblang

Ekstrak dilarutkan dalam campuran etanol dan air dengan perbandingan (1:3), setelah itu difraksinasi dengan praktisi cair – cair menggunakan etil asetat dan n-heksana masing – masing dilakukan 3 kali pengulangan sebanyak 450 mL (3 x 450 mL) dengan 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. Fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 50°C sedangkan fraksi air dengan cara *freeze dryer* (pengeringan beku) untuk mengeluarkan atau memisahkan hampir sebagian besar air dalam ekstrak. Rendemen fraksi dihitung dengan perhitungan :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat Fraksi yang Diperoleh (g)}}{\text{Berat Ekstrak yang Ditimbang (g)}} \times 100\%$$

3.5.6 Skrining Fitokimia

a. Uji Identifikasi Flavonoid

Ekstrak kental etanol sebanyak 0,1 g dilarutkan dalam 10 mL etanol kemudian dibagi ke dalam empat tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai tabung kontrol, tabung kedua, ketiga, dan keempat berturut-turut ditambahkan NaOH, H₂SO₄ pekat, dan serbuk Mg-HCl pekat. Warna pada masing-masing tabung dibandingkan dengan tabung kontrol, jika terjadi perubahan warna maka positif mengandung flavonoid.

b. Uji Identifikasi Tanin

Uji Tanin dilakukan dengan cara ekstrak daun jamblang (*Syzygium cumini* (L) Skeels) sebanyak 0,5 gram direbus dalam 20 mL air suling dalam tabung reaksi. Saring dan tambahkan beberapa tetes 0,1% FeCl_3 sampai berubah warna. Hasil positif dengan tanin menunjukkan dengan munculnya warna hijau kecoklatan atau biru kehitaman.

c. Uji Identifikasi Terpenoid dan Steroid

Dilakukan dengan cara pereaksi *Liebermann-Buchard* ditambahkan ke dalam ekstrak daun jamblang (*Syzygium cumini* (L) Skeels). Terbentuknya warna ungu dan akhirnya biru menunjukkan bahwa simplisia mengandung senyawa golongan triterpenoid, sedangkan bila terbentuk warna merah dan terakhir berwarna hijau menunjukkan adanya senyawa golongan steroid.

d. Uji Identifikasi Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan cara 10 mg ekstrak daun jamblang (*Syzygium cumini* (L) Skeels) ditambah 10 mL HCl dan panaskan selama 2 menit sambil diaduk. Saring ekstrak daun jamblang (*Syzygium cumini* (L) Skeels) dan campuran HCl setelah dingin. Filtrat yang disaring digunakan untuk menganalisis senyawa alkaloid, masing-masing 0,5 mL ditempatkan dalam 3 tabung reaksi dengan pereaksi yang berbeda.

- Pada tabung 1, tambahkan pereaksi mayer, sampel terbentuk endapan putih atau kuning menunjukkan adanya alkaloid.
- Pada tabung 2, tambahkan pereaksi dragendorff, sampel terbentuk endapan coklat atau jingga kecoklatan menunjukkan adanya alkaloid.
- Pada tabung 3, digunakan sebagai blanko.

e. Uji Identifikasi Saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara sebanyak 0,5 gram ekstrak daun jamblang (*Syzygium cumini* (L) Skeels) dicampur dengan 5 mL air suling dan di aduk kuat – kuat. Tes positif untuk keberadaan saponin dalam larutan ditunjukkan dengan berbusa.

3.5.7 Uji Aktivitas Antiinflamasi

1. Penyiapan Hewan Uji

- a. Tikus diadaptasikan dalam kandang kurang lebih selama 1 minggu. Selama proses tersebut, dijaga agar kebutuhan makan dan minum tetap terpenuhi.
- b. Tikus dipuasakan selama (12-18) jam sebelum perlakuan, namun air minum tetap diberikan.
- c. Setiap tikus ditandai dengan spidol pada sendi kaki belakang kiri. Kemudian berat badan tiap tikus ditimbang dan dikelompokkan menjadi 6 kelompok secara acak, masing-masing kelompok terdiri atas 4 ekor tikus.

2. Pembuatan Larutan PGA 1%

Larutan PGA (*Pulvis Gummi Arabicum*) 1% dibuat dengan menimbang sebanyak 1 gram PGA (*Pulvis Gummi Arabicum*) dan 100 mL aquadest.

3. Pembuatan Suspensi Karagen 1%

1% karagen disuspensikan dengan menggunakan natrium klorida 0,9% sampai 100 mL dalam gelas kimia.

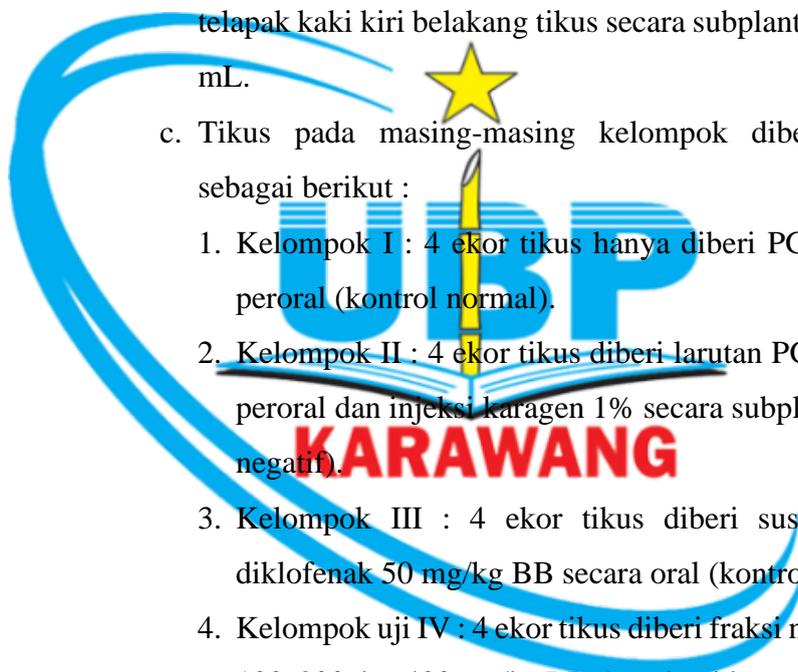
4. Pembuatan Suspensi Natrium Diclofenak

Sebanyak 10 tablet natrium diklofenak dengan masing – masing tablet mengandung 50 mg natrium diklofenak. Kemudian ditimbang dan dihitung bobot rata – rata lalu digerus. Natrium diklofenak yang telah ditimbang kemudian disuspensikan

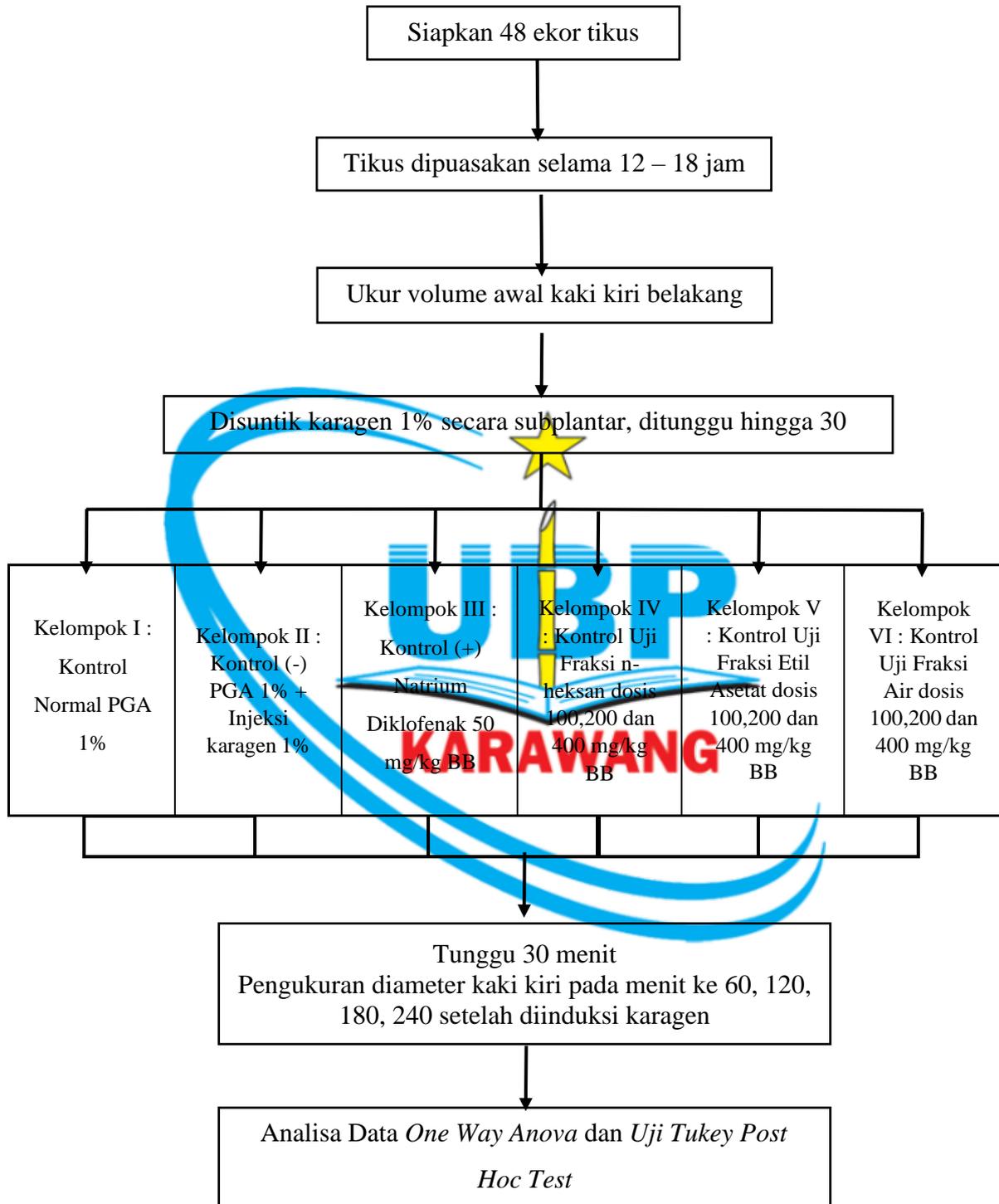
dengan larutan PGA 1% sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga homogen. Kemudian masukkan ke dalam labu ukur 100 mL hingga ad 100 mL.

5. Pengujian Terhadap Hewan Uji

- a. Sebelum diberikan perlakuan, terlebih dahulu dilakukan pengukuran diameter kaki kiri belakang masing-masing tikus dengan jangka sorong. Hasil pengukuran dicatat sebagai diameter awal.
- b. Pada menit ke-30 disuntikkan sediaan karagen 1% pada telapak kaki kiri belakang tikus secara subplantar sebanyak 1 mL.
- c. Tikus pada masing-masing kelompok diberi perlakuan sebagai berikut :
 1. Kelompok I : 4 ekor tikus hanya diberi PGA 1% secara peroral (kontrol normal).
 2. Kelompok II : 4 ekor tikus diberi larutan PGA 1% secara peroral dan injeksi karagen 1% secara subplantar (kontrol negatif).
 3. Kelompok III : 4 ekor tikus diberi suspens natrium diklofenak 50 mg/kg BB secara oral (kontrol positif).
 4. Kelompok uji IV : 4 ekor tikus diberi fraksi n-heksan dosis 100, 200 dan 400 mg/kg BB daun jambang secara peroral.
 5. Kelompok uji V : 4 ekor tikus diberi fraksi etil asetat dosis 100, 200 dan 400 mg/kg BB daun jambang secara peroral.
 6. Kelompok uji VI : 4 ekor tikus diberi fraksi air 100, 200 dan 400 mg/kg BB daun jambang secara peroral.
- d. Pada menit 60, 120, 180 dan 240 setelah penyuntikan karagen, diameter kaki kiri belakang tikus diukur menggunakan jangka sorong. Hasil dicatat sebagai diameter akhir.



3.5.8 Alur Prosedur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Prosedur Pembuatan

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengukuran volume edema telapak kaki tikus setiap waktu pengamatan pada semua kelompok ditabulasi. Ada tidaknya efek antiinflamasi dilihat dengan cara menghitung prosentase edema setiap waktu.

$$\% \text{ Edema} : \frac{X_t - X_o}{X_o} \times 100\%$$

Keterangan : X_t : volume edema pada waktu t

X_o : volume edema sebelum diberi perlakuan

Dari hasil perhitungan tersebut data diolah dengan menggunakan uji normalitas dan uji homogenitas. Kemudian data yang telah terdistribusi normal dan homogen ($P > 0,01$) maka dilanjutkan dengan uji statistik parametrik *One Way Anova* dengan menggunakan GraphPad Prism Versi 10 dan uji *Tukey HSD Post Hoc*.

3.7 Tempat dan Waktu Penelitian

3.7.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi dan Laboratorium Farmakologi Universitas Buana Perjuangan Karawang.

