

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian berupa eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui apakah tumbuhan cep-cepan memiliki aktivitas sebagai imunodulator. Pada penelitian ini menggunakan 3 jenis sempel uji yaitu ekstrak, liquid SNEDDS, dan solid SNEDDS untuk melihat seberapa efektif sediaan SNEDDS mengoptimalkan penghantaran zat aktif kedalam tubuh.

#### **3.2 Sampel**

Sampel ekstrak cep-cepan dibuat oleh laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Yang selanjutnya di buat menjadi liquid SNEDDS dengan konsentrasi 1000ppm/ml dan dibuat solid SNEDDS dengan dosis zat aktif 10mg/1gram.

#### **3.3 Bahan, Peralatan, Dan Lokasi Penelitian**

##### **3.3.1 Bahan Penelitian**

###### **a. Bahan Uji**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak cep-cepan, liquid SNEDDS, dan solid SNEDDS yang sudah di fomulakan sebelumnya.

###### **b. Bahan Kimia**

Etanol 70 %, eter, larutan NaCl, dan sel darah merah domba (dari biofarma cisarua bandung).

###### **c. Hewan Uji**

Sebanyak 42 Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih balb/c berumur 40 minggu dengan berat badan 190-360 gram yang diperoleh dari laboratorium Uniersitas Buana Perjuangan Karawang dan diberikan makan berupa butiran (pelet) dan minuman air mineral.

##### **3.3.2 Peralatan Penelitian**

Peralatan yang akan digunakan antara lain mikropipet 10-1000  $\mu$ L (Acura Socorex), timbangan analitik (Scaltec SBC 22 dan BP 160P), gelas ukur, pipet takar, corong kaca, beaker glass, batang pengaduk, kaca arloji, sarum suntik 1 dan 5 ml, sonde oral.

### 3.3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilaksanakan di Laboratorium Instrumental dan Laboratorium Farmakologi Universitas Buana Perjuangan Karawang, laboratorium imunologi fakultas kedokteran Universitas Padjadjaran. Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Desember 2022- Maret 2023.

### 3.4 Variabel Penelitian

#### 3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang terlibat dalam penelitian ini yaitu ekstrak, solid, dan liquid SNEDDS dengan beberapa variasi dosis yang berbeda..

#### 3.4.2 Variabel Terkait

Variabel terikat yang terlibat dalam penelitian ini yaitu hasil pengujian ELISA terkait kadar interferon gamma dan tumor necrosis factor alpha dalam plasma darah tikus.

#### 3.4.3 Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol yang terlibat dalam penelitian ini yaitu suhu dan kelembapan ruangan, pemberian makanan dan minum, dan pemberian sampel berdasarkan dosis berat badan.

### 3.5 PROSEDUR PENELITIAN

#### 3.5.1 Metode Pembuatan Sempel

Penelitian ini menggunakan 3 sempel yaitu ekstrak, liquid dan solid SNEDDS. Pembuatan ekstrak menggunakan simplisia yang dikirim langsung dari sumatra utara. Di ekstrak dengan cara metode maserasi dengan etanol 70%. Sedangkan liquid SNEDDS terdiri dari 10 % fase minyak yaitu asam oleat, 63% surfaktan yaitu span 20, dan 27% co-surfaktan yakni Peg400 dengan konsentrasi zat aktif 10000 ppm. Dibuat melalui dua kali proses magnetik stirer dan juga sonifikasi. Dan yang terakhir solid SNEDDS terbuat dari 10% laktosa, 89% avicel dan 1 % aerosil dengan dosis zat aktif 1 mL liquid SNEDDS dalam 1 gram solid SNEDDS atau sama dengan 10 mg/gram solid SNEDDS.

#### 3.5.2 Metode Pemberian Sempel (*Bihanu, et al, 2018*)

Pemberian sampel bersampel pengujian diberikan berdasarkan kelompoknya. Pada penelitian kali ini menggunakan 12 kelompok pengujian terdiri dari kontrol

normal, kontrol negatif, kontrol positif dengan stimuno, ekstrak dengan dosis kelompok 25, 50, dan 100 mg/KgBB tikus, liquid SNEDDS dengan dosis kelompok 25, 50, dan 100 mg/KgBB tikus, dan solid SNEDDS 2,5, 5, 10 gram/KgBB tikus.

Pada kelompok normal tidak di lakukan perlakuan tikus di biarkan hidup normal. Pada kelompok kontrol negatif tidak di lakukan pemberian sediaan akan tetapi di hari ke 15 di induksikan sedarah merah domba. Pada kontrol positif di berikan stimuno berdasarkan dosis konversi dosis manusia ke dosis tikus. Dan untuk 9 kelompok ekstrak, liquid, dan solid SNEDDS di berikan sediaan berdasarkan dosis yang telah ditentukan berdasarkan berat badan tikus.

### 3.5.3 Metode Perlakuan Hewan Uji (*Bihanu et al, 2018*)

Sebelum mendapatkan perlakuan selama 30 hari tikus di netralkan dan di sesuaikan dengan lingkungan dengan di simpan di ruangan labolatorium di beri makan pelet dan air minum mineral

Tabel 3.2 Metode perlakuan

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

tikus  
**KARAWANG**

Hari ke 0-5, Tikus di timbang dan di besikan sampel. Hari ke 6-10, tikus di timbang dan di besikan sampel Hari ke 11-15, tikus di di timbang dan di beri sampel. pada hari ke 15 tikus di induksikan sel darah merah domba sebagai antigen. Dari hari 15-20 tikus diberikan perlakuan masih sama di timbang dan di beri sampel berdasarkan kelompoknya. Dan di hari ke 21 tikus di ambil darah nya menggunakan pipa kapiler dari mata tikus.

Cara menginduksi sel darah merah domba:

Sel darah merah domba yang telah di bekukan dalam suhu -20 derajat celcius. Di di ambil dan di suntikan pada perut tikus sebelah kiri bagian bawah.

Cara pengambilan sampel darah dari mata:

Pengambilan darah dilakukan dengan cara, mengambil dari mata menggunakan pipa kapiler yang di tusukan selamping mata tikus bagian depan

dan sedikit di putar maka darah akan keluar dan bisa di tampung menggunakan tabung edta. Yang kemudian akan di ambil plasmanya untuk pengujian ELISA di laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung.

#### **3.5.4 Metode Pengujian ELISA (Uji kadar antibodi)**

Untuk menentukan kadar antibody yaitu menghitung kadar interferon gama dan tumor necrosis factor alpha dalam penelitian ini digunakan ELISA Kit (Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran). Prosedur ELISA pada tahap ini mengikuti Protokol For ELISA Kit yang disertakan pada paket ELISA Kit.

#### **3.6 Analisa Data**

Untuk mengetahui efektivitas imunomodulator cep-cepen (Castanopsis Costata BL) melalui pengukuran interferon gamma dan tumor necrosis factor alpha pada tikus putih galur wistar menggunakan uji analisis data menggunakan ANOVA oneway dilanjutkan tukey HSD Post hoc. Sebelum pengujian ANOVA data terlebih dahulu kaji tingkat kenormalan homogenitas data dan varian datanya terlebih dahulu. Kemudian dilihat tingkat signifikan datanya menggunakan uji turkey (Pratisto, 2018).

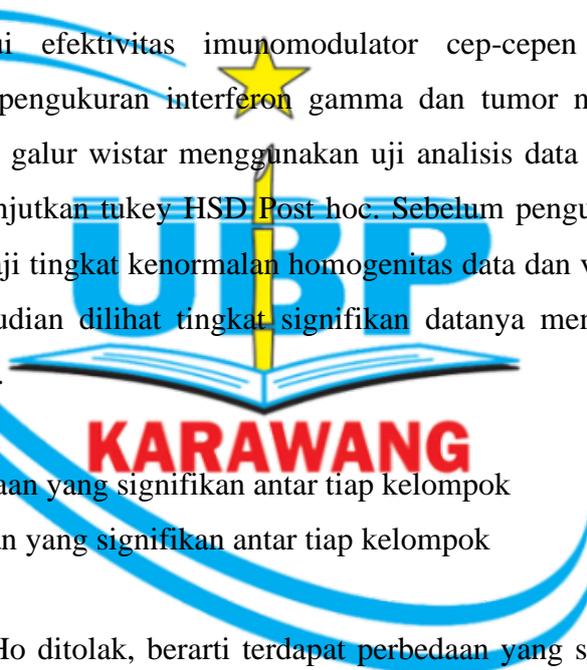
Hipotesis :

Ho : Tidak ada perbedaan yang signifikan antar tiap kelompok

Hi : Terdapat perbedaan yang signifikan antar tiap kelompok

Kriteria Pengujian :

Bila nilai sig < 0,05 Ho ditolak, berarti terdapat perbedaan yang signifikan Bila nilai sig > 0,05 Ho diterima, berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan.



### 3.7 Skema Penelitian

**Tabel 3.2** Alur Penelitian

