

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan metode *in vivo* ekstrak etanol daun tin (*Ficus carica-l*) dan daun bidara (*Ziziphus spina-christi*) pada mencit galur Balb/C yang diinduksi *croton oil*.

B. Tempat dan Waktu

1. Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu

Penelitian dilakukan pada bulan September 2018- Februari 2019

C. Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan subjek hewan uji yaitu mencit galur Balb/C yang didapat dari Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Mencit yang digunakan sebanyak 90 ekor dibagi ke dalam 15 kelompok untuk dilakukan pengamatan uji antiinflamasi.

D. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel penelitian

Variabel Bebas : Dosis sediaan krim antiinflamasi ekstrak etanol daun tin (*Ficus carica l*) dan daun bidara (*Ziziphus spina-christi*)

Variabel Tergantung : Ketebalan epidermis, ekspresi enzim COX-2 dan jumlah sel radang

Variabel Kontrol : Mencit galur Balb/C berusia 2-3 bulan dengan jenis kelamin jantan dengan berat badan 35-45 gram diberi pakan AD1 dan minum air suling

2. Definisi Operasional

a. Tebal epidermis

Tebal epidermis adalah peningkatan diameter jaringan epidermis kulit dari kondisi normal.

b. Ekspresi enzim COX-2

Enzim COX-2 adalah enzim alami yang aktivitasnya meningkat pada kondisi radang sehingga mengkatalis pembentukan senyawa pro-inflamasi prostaglandin (PG).

c. Jumlah sel radang

Sel radang adalah senyawa pada tingkat seluler yang jumlahnya meningkat pada kondisi peradangan melebihi nilai normal .

d. Sediaan krim

Sediaan krim adalah salah satu bentuk sediaan topikal yang diformulasikan agar dapat menghantarkan obat ke tempat aksinya sehingga menghasilkan efek farmakologi.

E. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (*Mettler Toledo*), blender, bejana atau toples, alat-alat gelas (*Iwaki Pyrex*), corong, pengaduk, alat uji difusi gerak, alat uji daya lekat salep, alat uji daya sebar salep, digital stirring hotplates (*Thermo Fisher Scientific Cimarec*), rotary evaporator, water bath (*Memmerth*), cawan porselin, pipet volume, pipet, kertas saring, aluminium foil, pH meter (*Seven Easy Mettler Tholedo*), Mikroskop (*Olympus*)

2. Bahan Penelitian

Simplisia kering daun tin (*Ficus Carica L*) dan daun bidara (*Ziziphus spina-christi*) yang diperoleh dari distributor Rumah Terapi Zaitun, croton oil untuk menginduksi peradangan pada mencit yang diperoleh dari distributor, etanol 70% (Brataco[®]) untuk maserasi, reagen-reagen skrining fotokimia, bahan-bahan untuk memformulasikan sediaan krim antiinflamasi berupa Vaseline(Brataco[®]), Propilen glikol(Brataco[®]), Stearyl alkohol(Brataco[®]),

Lauril sulfat(Brataco[®]), asam oleat(Brataco[®]), dan aquades. Reagen-reagen untuk evaluasi *in vivo* dan uji iritasi. Hewan uji yang digunakan adalah mencit galur Balb/C.

F. Langkah Kerja

1. Determinasi serbuk simplisia daun Tin dan daun Bidara

Determinasi simplisia daun Tin (*Ficus carica linn.*) dan daun Bidara (*Ziziphus spina christi.*) dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Ahmad Dahlan.

2. Persiapan Bahan dan Subyek Uji

Tahap persiapan ini dibagi menjadi dua yaitu tahap persiapan serbuk simplisia dan persiapan mencit sebagai subyek uji. Persiapan serbuk dilakukan dengan menimbang simplisia kering dan diblender menjadi serbuk. Persiapan subyek uji dilakukan dengan memberikan pakan AD 1 dan minuman air suling UAD kemudian diberikan crottoin oil selama tiga hari agar subyek uji mengalami peradangan.

3. Ekstraksi Serbuk Simplisia

Metode ekstraksi yang peneliti gunakan adalah metode maserasi. Maserasi dimulai dengan menimbang serbuk simplisia daun tin (*Ficus carica l*) dan daun bidara (*Ziziphus spina-christi*) masing-masing sebanyak 1kg, kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam bejana dan ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak

10 L. Maserasi dilakukan selama 7 hari dan pada hari ketiga dilakukan remaserasi. Pada hari ke tujuh disaring untuk memperoleh maserat menggunakan corong Buchner, kemudian dipanaskan menggunakan instrumen rotary evaporator dengan kecepatan 90 rpm pada suhu 80°C. Evaporasi bertujuan untuk memekatkan larutan zat terlarut yang tidak mudah menguap dan pelarut yang mudah menguap (Praptiningsih, 1999). Tahap akhir dari pembuatan ekstrak kental ini yakni hasil ekstrak cair dari proses rotary dipanaskan dengan water bath pada suhu 80°C sehingga diperoleh ekstrak kental dan dihitung rendemennya.

4. Skrining Fitokimia

Ekstrak kental daun tin dan bidara yang diperoleh selanjutnya dilakukan skrining kandungannya secara kualitatif untuk mengetahui ada tidaknya kandungan flavovoid, tanin, antrakuinon, saponin, alkaloid dan polifenol. Penapisan fotokimia ini dilakukan dengan uji warna yang direaksikan dengan reagen-reagen yang diadopsi dari buku (Harborne, 1985) sebagai berikut ;

a. Pengujian Pendahuluan

Serbuk (± 2 g) dipanaskan dengan air (10 ml) selama 30 menit diatas penangas air mendidih, larutan yang terjadi disaring dengan kapas. Larutan yang dihasilkan bila berwarna kuning sampai merah menunjukkan adanya senyawa yang mengandung kromofor (flavonoid dan antrakuinon. Bila larutan ditambah KOH 3 tetes warna larutan akan menjadi lebih intensif.

b. Pengujian Flavonoid

Skринing flavonoid dilakukan dengan metode KLT yaitu ekstrak kental dilarutkan dengan metanol, kemudian ditotolkan pada fase diam silika gel F 254 5x10 cm dan dielusi dengan fase gerak jenuh kombinasi etil asetat:metanol:air dengan perbandingan 65:28,5:30. Pembanding standar yang digunakan adalah senyawa rutin.

c. Pengujian Alkaloid

Serbuk (± 2 g) dipanaskan dalam tabung reaksi besar dengan HCl 1% (10 ml) selama 30 menit diatas penangas air mendidih. Suspensi disaring dengan kapas dan dimasukkan dalam tabung reaksi I dan tabung reaksi II sama banyak. Larutan I dibagi dua sama banyak, lalu kedalam larutan ditambah pereaksi Dragendorff (3 tetes) dan larutan I ditambah dengan pereaksi Mayer (3 tetes). Bila dengan kedua pereaksi tersebut terbentuk endapan, menunjukkan adanya alkaloid.

d. Uji Antrakuinon

Serbuk (300 mg) dididihkan selama 2 menit dengan KOH 0,5 N (10 ml) dan larutan hydrogen peroksida 1 ml. Setelah dingin, suspensi disaring melalui kapas. Fitrat (5 ml) ditambahkan asam asetat (10 tetes) sampai pH 5, kemudian ditambah toluena (10 ml). Dikocok pelan-pelan dan diamkan sebentar, lapisan atas (5 ml) diambil dengan pipet volume dan dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambah KOH 0,5 N, jika timbul warna merah pada lapisan air (basa) menunjukkan adanya senyawa antrakuinon.

e. Uji Polifenol

Serbuk (300 mg) dipanaskan dengan air (10 ml) selama 20 menit dalam penangas air mendidih kemudian disaring panas-panas. Setelah dingin ditambahkan FeCl_3 sebanyak 3 tetes. Jika timbul warna hijau biru menunjukkan adanya polifenol.

f. Uji Tanin

Serbuk (300 mg) dipanaskan dengan air (10 ml) selama 30 menit diatas penangas air, kemudian disaring. Filtrat (5 ml) ditambah larutan NaCl 2 % (1 ml), bila terjadi suspensi atau endapan disaring melalui kertas saring. Filtrat ditambah larutan gelatin 1% (5 ml), bila timbul endapan menunjukkan adanya tannin atau zat samak.

g. Uji Saponin

Serbuk (100 mg) dalam tabung reaksi, ditambah 10 ml air suling, ditutup dan dikocok kuat-kuat selama 30 menit. Tabung dibiarkan dalam posisi tegak selama 30 menit. Apabila timbul buih setinggi ± 3 cm dari permukaan, menunjukkan adanya saponin.

5. Formulasi Sediaan Krim

Krim tipe M/A dibuat dengan metode peleburan. Bahan padat seperti stearil alkohol dileburkan terlebih dahulu pada suhu 60°C . Fase minyak seperti vaseline album, nipasol, stearil alkohol, Na lauril sulfat dan asam oleat dicampur kedalam mortir hangat sampai homogen. Bahan yang larut dalam air yaitu propilen glikol

dan nipagin dicampurkan hingga homogen. Selanjutnya kedua fase dicampurkan hingga homogen. Selanjutnya ditambahkan ekstrak yang telah dilarutkan dengan sedikit alkohol lalu diaduk sampai homogen. Krim dimasukkan kedalam wadah yang tertutup rapat.

Tabel 3. Formula krim ekstrak etanolik daun tin dan daun bidara

Bahan	Formula					
	KB 2,5%	KB 5%	KT 2,5%	KT 5%	KK2,5%	KK 5%
Ekstrak	2,5	5	2,5	5	2,5	5
Vaselin	10	10	10	10	10	10
Metilparaben	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Propilparaben	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
Propilen glikol	8	8	8	8	8	8
Stearyl Alkohol	10	10	10	10	10	10
Lauril sulfat	1	1	1	1	1	1
Asam oleat	4	4	4	4	4	4
Alkohol	qs.	qs.	qs.	qs.	qs.	qs.
Aquadest ad	100	100	100	100	100	100

Keterangan:

KT 2,5 : Krim dengan ekstrak daun tin 2,5% basis A/M

KT 5 : Krim dengan ekstrak daun tin 5% basis A/M

KB 2,5 : Krim dengan ekstrak daun bidara 2,5% basis A/M

KB 5 : Krim dengan ekstrak daun bidara 5% basis A/M

KK 2,5 : Krim dengan ekstrak kombinasi daun tin dan bidara 2,5%

KK 5 : Krim dengan ekstrak kombinasi daun tin dan bidara 5%

6. Uji Sifat Fisik Krim

A. Uji viskositas.

Sejumlah krim diukur secara langsung dengan alat Rheosys Merlin *spindle cone and plate 2.0/30mm*. Sistem pengukuran, kecepatan putar *spindle*, jumlah titik pengukuran, interval waktu pengukuran antartitik, dan

suhu diatur pada “*test definition*”. Pengukuran viskositas dimulai dengan menekan *start* dan berlangsung dalam waktu tertentu, viskositas krim dan kurva aliran krim dihasilkan secara otomatis (Putranti et al., 2018)

B. Uji daya sebar.

Krim ditimbang 0,5 gram dan diletakkan di tengah cawan petri yang berada dalam posisi terbalik. Diletakkan cawan petri yang lain di atas krim. Dibiarkan selama 1 menit. Diukur diameter krim yang menyebar. Krim ditambahkan 50 gram beban tambahan, didiamkan 1 menit dan diukur diameter setelah beban mencapai 500 gram (Shovyana and Zulkarnain, 2013).

C. Uji daya lekat.

Krim ditimbang sebanyak 0,23gram sebelum ditempatkan diatas gelas obyek yang telah ditentukan luasnya. Krim diletakkan pada gelas obyek. Krim dilepas beban seberat 80 gram, dicatat waktunya hingga kedua objek gelas tersebut terlepas (Shovyana and Zulkarnain, 2013).

D. Uji pH.

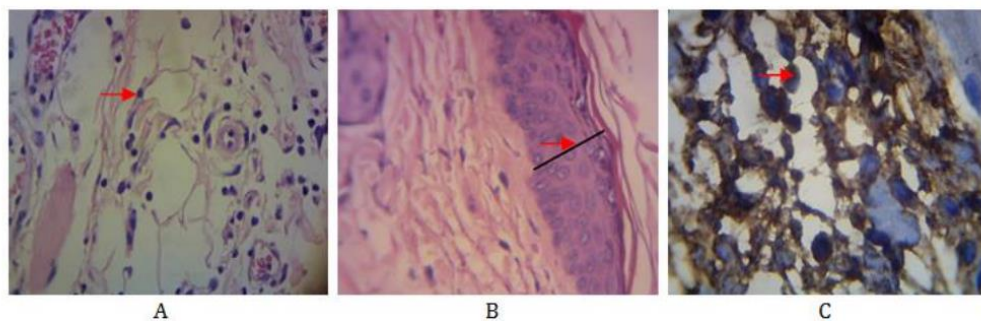
Pengujian pH dilakukan menggunakan pH meter dimasukkan kedalam krim, kemudian dilihat pH meternya dengan parameter normal 4,5 – 6,5 (Shovyana and Zulkarnain, 2013).

7. Evaluasi *In Vivo* Efek Antiinflamasi Krim

Penelitian ini menggunakan lima belas kelompok perlakuan yang masing – masing terdiri dari enam ekor mencit galur BALB/c. sembilan kelompok tersebut meliputi tiga kelompok kontrol yaitu satu kelompok normal, satu kelompok kontrol positif dengan pemberian emulgel Voltaren[®], dan satu kelompok yang *croton oil* tanpa penyembuhan. Dua belas kelompok lainnya merupakan sampel yang pada awalnya diinduksi infalamasi dengan *croton oil* serta mendapat perlakuan krim ekstrak tin 2,5%, krim ekstrak tin 5%, krim ekstrak bidara 2,5%, krim ekstrak bidara 5%, krim ekstrak kombinasi tin dan bidara 2,5%, krim ekstrak kombinasi tin dan bidara 5%, Ekstrak mentah daun tin 2,5%, Ekstrak mentah daun tin 5%, Ekstrak mentah daun bidara 2,5%, Ekstrak mentah daun bidara 5%, Ekstrak mentah kombinasi daun tin dan bidara 2,5% , dan ekstrak mentah kombinasi daun tin dan daun bidara 5% . Kelompok yang mendapatkan induksi inflamasi sebelumnya dicukur rambut bagian punggung dan diolesi perontok rambut (Veet[®]). Setelah 24 jam, pada bagian punggung tersebut ditetesi dengan 0,1 mL *croton oil* (0,1%).

Prosedur induksi inflamasi pertama – tama mencukur bulu punggung mencit selebar 2x2 cm. Setelah 24 jam punggung mencit ditetaskan dengan 0,1 ml *croton oil* konsentrasi 0,1%. Tiga puluh menit kemudian dilakukan pengolesan krim ekstrak sebesar 100 mg selama 3 hari dengan perlakuan sama rata. Selanjutnya mencit dikorbankan. Area pengambilan kulit adalah bagian punggung dengan daerah perlakuan sebesar 1x1 cm. Jaringan kulit kemudian direndam dalam

formalin 10% untuk pembuatan preparat histopatologik dengan pengecatan hematoksin eosin (HE) dan imunohistokimia COX-2 yang dilakukan sesuai metode standar di laboratorium patologi, Fakultas kedokteran, UGM dan Laboratorium patologi anatomi, RS. Dr. Sardjito, Yogyakarta (Sugihartini *et al*, 2013). Hasil pengecatan dianalisis di bawah mikroskop cahaya (*Olympus*) di laboratorium histologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Analisa ekspresi COX-2, sel radang dan tebal epidermis digunakan software *Toupview*[®].

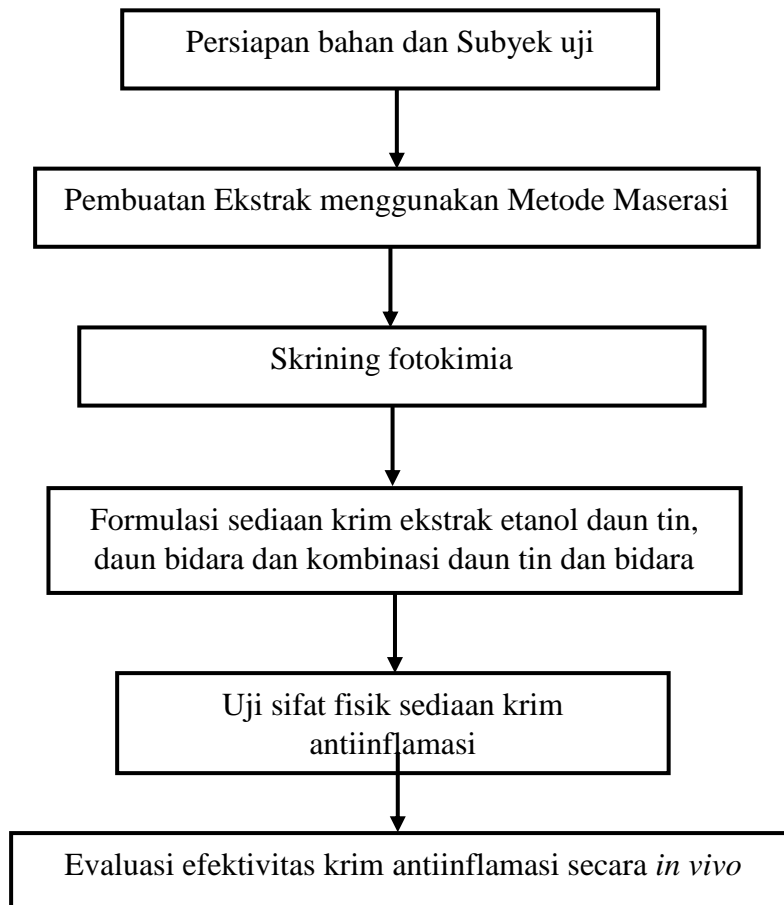


Gambar 5. Gambaran mikroskopis jaringan kulit dengan pengecatan hematoksin eosin (HE) (A) sel radang, (B) ketebalan epidermis dan (C) sel mengekspresikan COX-2 dengan pengecatan imunohistokimia (Sugihartini *et al.*, 2017).

Penghitungan jumlah sampel radang dilakukan pada preparat histopatologik yang dicat dengan HE. Jumlah sel radang dihitung pada tiga bidang pandang dari tiap irisan jaringan kulit terhadap hewan uji. Perhitungan sel radang dapat diketahui dengan adanya bercak berwarna coklat kehitaman. Ketebalan epidermis diukur berdasarkan rerata jarak antara lapisan epidermis terdalam dengan terluar diukur dari tiga bidang pandang dari tiap irisan jaringan kulit tiap hewan uji. Perhitungan jumlah sel yang mengekspresikan COX-2 dilakukan dengan perbesaran 120x pada

tiga bidang pandang pada tiap irisan jaringan kulit tiap hewan uji, berdasarkan jumlah sel yang menunjukkan warna coklat pada sitoplasma atau intinya. Perhitungan tersebut dilakukan setelah preparat jaringan kulit diberi pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi polyclonal COX-2. Pengamatan dan pengukuran mikroskopik semua dilakukan dengan menggunakan mikroskop yang terhubung dengan optilab. Prosedur pengecatan imunohistokimia dilakukan dengan menggunakan metode direct (Sugihartini et al., 2017).

G. Skema Langkah Kerja



H. Analisis Data

1. Persentase Rendemen

Ekstrak kental yang diperoleh dari proses ekstraksi dihitung persen rendemennya dengan menggunakan persamaan berikut :

$$Rendemen = \frac{\text{Bobot ekstrak kental yang didapat}}{\text{bobot serbuk simplisia yang digunakan}} \times 100\% \quad (1)$$

2. Analisis Hasil

Hasil presentase pengamatan terhadap preparat IHC, jumlah sel radang dan ketebalan epidermis pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dianalisis dengan menggunakan seperangkat komputer. Perlakuan diuji dengan *one way* ANOVA. Jika dari hasil uji ANOVA ditemukan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan maka dilanjutkan dengan *post hoc test LSD* untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan. Signifikansi hasil ditetapkan dengan $p < 0,05$.