

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan September 2018 sampai Februari 2019

C. Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan subjek hewan uji yaitu mencit jantan galur Balb/C yang didapat dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Mencit yang digunakan sebanyak 90 ekor yang dibagi ke dalam 15 kelompok untuk dilakukan pengamatan uji anti-inflamasi.

D. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel penelitian

Variabel Bebas : Dosis sediaan gel anti-inflamasi ekstrak etanol daun tin (*Ficus carica linn*) dan daun bidara (*Zizhipus mauritania linn*)

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.

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

2. Definisi Operasional

a. Ketebalan Epidermis

Ketebalan epidermis adalah peningkatan diameter jaringan epidermis kulit dari kondisi normal

b. Jumlah Sel Radang

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

c. Ekspresi Enzim COX-2

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

d. Sediaan Gel

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

E. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (*Mettler Toledo*[®]), blender (*Airlux*[®]), alat-alat gelas (*Pyrex* dan *Iwaki*[®]) corong *Buchner*, corong (*Herma*[®]), pipet volume (*Pyrex*[®]), cawan porselin (*Pyrex*[®]), kertas saring (*Whatman*[®]), alumunium foil (*Diamond*[®]), rotary evaporator (*IKA*[®]), water bath (*Memmert*[®]), pH meter (*Seven Easy Mettler Tholedo*[®]), Mikroskop (*Olympus*[®]), Digital Stirring Hotplates (*Thermo Fisher Scientific Cimarec*[®]), viskometer *Reeosis Merlin VR 2*, ultraturax (*IKA*[®] T25 Digital), toples, pro pipet, batang pengaduk, alat uji daya lekat gel, alat uji daya sebar gel dan perangkat alat bedah hewan uji.

2. Bahan Penelitian

Simplisia kering daun tin (*Ficus Carica l*) dan daun bidara (*Zizhipus mauritania l*) yang diperoleh dari distributor Rumah Terapi Zaitun, crotton oil untuk menginduksi peradangan pada mencit yang diperoleh dari distributor sigma, etanol 70% (*Brataco*[®]) untuk maserasi, reagen-reagen skrining fitokimia dan standardisasi ekstrak, bahan-bahan untuk memformulasikan sediaan gel antiinflamasi seperti ekstrak etanol daun tin dan bidara, carbopol 940 (*Brataco*[®]), TEA (*Brataco*[®]), sorbitol (*Brataco*[®]), parafin cair (*Brataco*[®]), metil paraben(*Brataco*[®]), profil paraben(*Brataco*[®]), dan aquadest. Produk emulgel *voltaren*[®] dan *veet*[®]. Hewan uji yang

digunakan adalah mencit galur Balb/C yang berusia 2-3 bulan dan pakannya.

F. Langkah Kerja

1. Determinasi Tumbuhan

Determinasi daun tin (*Ficus carica l*) dan daun bidara (*Zizhipus mauritania linn*) dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

2. Persiapan Bahan dan Subjek Uji

Tahap persiapan ini dibagi menjadi dua yaitu tahap persiapan serbuk simplisia dan persiapan mencit sebagai subjek uji. Sebanyak satu kilogram simplisia kering diblender untuk memperoleh serbuk halus. Mencit diberi pakan AD 1 dan minuman air suling kemudian diberikan *crotton oil* subjek uji mengalami peradangan.

3. Ekstraksi Serbuk Simplisia

Metode ekstraksi yang peneliti gunakan adalah metode maserasi. Serbuk simplisia daun tin (*Ficus carica linn*) dan daun bidara (*Zizhipus mauritania linn*) masing-masing sebanyak satu kilogram ditambahkan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1 bagian serbuk dilarutkan dengan 10 bagian pelarut. Maserat diperoleh dari hasil penyaringan dan kemudian diuapkan pelarutnya dengan rotary evaporator berkecepatan 90 rpm pada

suhu 70°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 dengan memanaskan ekstrak cair dari proses rotary pada water bath bersuhu 70°C sehingga diperoleh ekstrak kental dan dihitung rendemennya.

4. Skrining Fitokimia

Ekstrak kental daun tin dan daun bidara yang diperoleh, selanjutnya diskriming kandungannya secara kualitatif untuk mengetahui ada tidaknya kandungan flavonoid, tanin, antrakinon, saponin, alkaloid dan polifenol. Penapisan fitokimia berdasarkan uji warna hasil pereaksian dengan reagen-reagen yang diadopsi dari buku Harboune (1987) sebagai berikut ;

a. Pengujian Pendahuluan

Serbuk (± 2 g) dipanaskan dengan air (10 ml) selama 30 menit diatas penangas air mendidih dan disaring dengan kapas. Larutan yang dihasilkan bila berwarna kuning sampai merah menunjukkan adanya senyawa yang mengandung kromofor (flavonoid dan antrakinon). Untuk memperoleh warna yang lebih intensif ditambahkan KOH.

b. Pengujian Flavonoid

Skrining flavonoid menggunakan metode KLT dengan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak kombinasi etil asetat:metanol:air

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 dengan penangas air mendidih. Suspensi disaring dengan kapas dalam tabung reaksi I dan tabung reaksi II sama banyak. Larutan I dibagi dua kemudian ditambah pereaksi Dragendorff (3 tetes) dan pereaksi Mayer (3 tetes). Terbentuknya endapan dan terjadinya perubahan warna menjadi jingga atau kuning menunjukkan adanya alkaloid.

d. Uji Antrakinon

Serbuk (300 mg) dididihkan selama 2 menit dengan KOH 0,5 N (10 ml) dan larutan hydrogen peroksida 1 ml. Filtrat (5 ml) ditambahkan asam asetat (10 tetes) sampai pH 5 dan toluena (10 ml). Lapisan atas filtrat (5ml) hasil penggojogan ditambah KOH 0,5 N, jika timbul warna merah pada lapisan air (basa) menunjukkan adanya senyawa atrakinon.

e. Uji Polifenol

Serbuk (300 mg) dipanaskan dengan air (10 ml) selama 20 menit dalam penangas air mendidih. Setelah dingin ditambahkan FeCl_3 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. Filtrat (5 ml) ditambah larutan NaCl 2 % (1 ml), dan larutan gelatin 1% (5 ml), bila timbul endapan menunjukkan adanya tanin atau zat samak.

g. Uji Saponin

Serbuk (100 mg) dalam tabung reaksi, ditambah dengan 10 ml air suling. Selama 30 menit tabung digojog dengan kuat. Apabila timbul buih setinggi ± 3 cm dari permukaan, menunjukkan adanya saponin.

5. Formulasi Sediaan Gel

Formulasi gel antiinflamasi daun tin (*Ficus carica linn*) dan daun bidara (*Zizhipus mauritania linn*) disajikan dalam tabel tiga. Pembuatan gel menggunakan basis carbopol 940 yang dikembangkan dengan akuades suhu normal dan panas sedikit demi sedikit ditambah pengadukan perlahan dan selama 24 jam didiamkan sampai basis mengembang. *Triethanolamine* (TEA), ekstrak daun tin dan daun bidara, sorbitol, metil paraben, profil paraben, parafin cair dan akuades hingga volume 100 ml ditambahkan dalam formulasi. Penambahan bahan dimulai dari yang sifat bahannya sama dengan basis carbopol 940, sedangkan bahan yang sifatnya berbeda dengan basis dilakukan

dalam kondisi panas dan didiamkan sampai suhu kamar. Gel dimasukkan ke dalam wadah yang cocok dan ditutup rapat.

Tabel 3. Formulasi gel ekstrak daun tin (*Ficus carica l*) dan daun bidara (*Zizhipus mauritania linn*) dalam % b/v dan keterangannya sebagai berikut :

Bahan	Formula					
	GB 2,5%	GB 5%	GT 2,5%	GT 5%	GK2,5%	GK 5%
Ekstrak	2,5	5	2,5	5	2,5	5
Carbopol 940	2	2	2	2	2	2
Triethanolamine (TEA)	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
Sorbitol	2	2	2	2	2	2
Parafin cair	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Metil paraben	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Profil paraben	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Aquadest ad	100	100	100	100	100	100

Keterangan :

- GB2,5% : Gel dengan ekstrak daun bidara 2,5%
- GB5% : Gel dengan ekstrak daun bidara 5%
- GT2,5% : Gel dengan ekstrak daun tin 2,5%
- GT5% : Gel dengan ekstrak daun tin 5%
- GK2,5% : Gel dengan ekstrak kombinasi daun tin dan bidara 2,5%
- GK5% : Gel dengan ekstrak kombinasi daun tin dan bidara 5%

6. Evaluasi Sifat Fisik Gel

a. Penetapan pH

0,5 gram gel diencerkan dalam 5 ml aquadest, kemudian diukur pH nya menggunakan pH meter (Naibaho, *et al.*, 2013).

b. Uji daya sebar

0,5 gram gel diletakkan di atas penampang bulat, kemudian penampang lainnya diletakkan di atasnya selama 1 menit. Diameter sebar gel diukur dan ditambahkan beban 50 gram, 100 gram, 250 gram sampai 500 gram selama satu menit kemudian diukur diameternya. Pengujian ini direplikasi sebanyak 3 kali.

c. Uji daya lekat

0,25 gram gel diletakkan pada objek gelas yang luasnya sudah ditentukan dan ditimpa dengan objek gelas lainnya yang terpasang pada alat uji. Beban satu kg ditambahkan selama 5 menit. Beban tersebut dilepaskan beserta beban penyangga 80 g dan dicatat waktunya hingga kedua objek gelas tersebut terlepas (Naibaho, *et al.*, 2013).

d. Uji viskositas

Pengujian menggunakan instrumen dengan kecepatan pengukuran viskositasnya 0,1-60 rpm. Alat yang digunakan adalah viskometer *Rheosys Merlin VR II*. Instrumen ini dilengkapi dengan perangkat lunak *Rheosys Micra*. Skala viskositas sediaan yang diujikan

akan muncul pada perangkat lunak yang digunakan dalam bentuk tabel dan grafik (Sakila, 2018).

7. Evaluasi Efek Antiinflamasi Gel

Evaluasi ini dengan hewan uji mencit dalam 15 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit jantan galur Balb/C. 15 kelompok tersebut meliputi :

a. Kelompok Kontrol Positif

Kelompok ini adalah kelompok mencit yang diberi perlakuan induksi inflamasi *crotton oil* 4% 0,1 ml dan gel Voltaren® yang ada dipasaran. Kelompok kontrol positif ini juga terdiri dari mencit sehat yang tidak diberi perlakuan.

b. Kelompok Kontrol Negatif

Kelompok ini adalah mencit yang diberi perlakuan induksi inflamasi *crotton oil* 4% 0,1 ml.

c. Kelompok Gel Ekstrak Daun Tin

Kelompok ini adalah mencit yang mendapatkan perlakuan induksi inflamasi *crotton oil* 4% 0,1 ml dan gel ekstrak daun tin (*Ficus carica linn*) dengan konsentrasi 2,5% (GT 2,5%) dan 5% (GT 5%). Kelompok ini juga terdiri dari mencit yang diberi perlakuan ekstrak mentah daun tin dengan konsentrasi 2,5% dan 5%

d. Kelompok Gel Ekstrak Daun Bidara

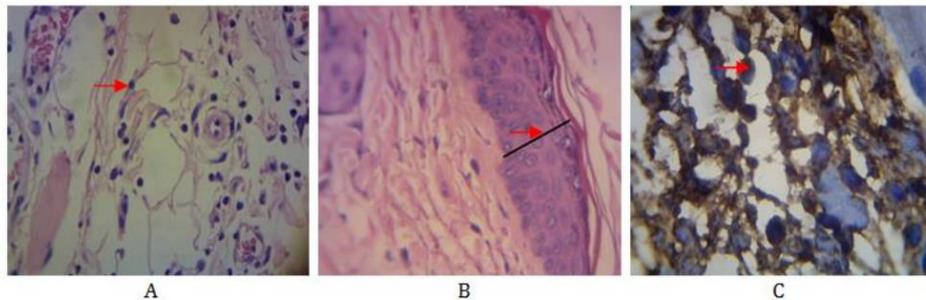
Kelompok ini adalah mencit yang mendapatkan perlakuan induksi inflamasi *crotton oil* 4% 0,1 ml dan gel ekstrak daun bidara (*Zizhipus mauritania linn*) dengan konsentrasi 2,5% (GB 2,5%) dan 5% (GB 5%). Kelompok ini juga terdiri dari mencit yang diberi perlakuan ekstrak mentah daun bidara dengan konsentrasi 2,5% dan 5%

e. Kelompok Gel Kombinasi Ekstrak Daun Tin Dan Bidara

Kelompok ini adalah mencit yang mendapatkan perlakuan induksi inflamasi *crotton oil* 4% 0,1 ml dan gel kombinasi ekstrak daun tin dan daun bidara. dengan konsentrasi 2,5% (GK 2,5%) dan 5% (GK 5%). Kelompok ini juga terdiri dari mencit yang diberi perlakuan ekstrak mentah kombinasi daun tin dan daun bidara dengan konsentrasi 2,5% dan 5%

Prosedur induksi inflamasi dilakukan dengan mencukur bulu punggung mencit dengan luas area 2x2 cm. Kemudian setelah 24 jam, punggung mencit ditetesi dengan 0,1 ml *crotton oil* konsentrasi 4%. Pengolesan gel ekstrak daun tin, gel ekstrak daun bidara, gel kombinasi ekstrak daun tin dan bidara dan pengolesan gel voltaren® sebesar 200mg dilakukan 30 menit setelah penetesan *crotton oil*. Perlakuan ini dilakukan selama tiga hari dengan prosedur perlakuan yang sama. Setelah itu, mencit dikorbankan untuk diambil kulit punggungnya seluas 1x1 cm di area sekitar

perlakuan dan direndam dalam formalin 10% untuk pembuatan preparat histopatologi dengan pengecatan hematoksin eosin (HE) dan imunohistokimia COX-2. Prosedur ini dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dan Laboratorium Patologi Anatomi RS Dr. Sardjito Yogyakarta dan dari hasil pengecatan dapat diukur tebal epidermis dan ekspresi Cox-2 nya (Sugihartini, *et al*, 2017). Hasil pengecatan dapat diketahui setelah sampel dianalisis dibawah mikroskop cahaya (*Olympus*) dengan pembesaran 4 sampai 40 kali yang dilakukan di Laboratorium Histologi FKIK UMY. Analisa jumlah sel radang, ekspresi COX-2 dan tebal epidermis menggunakan software *Toupview*®.

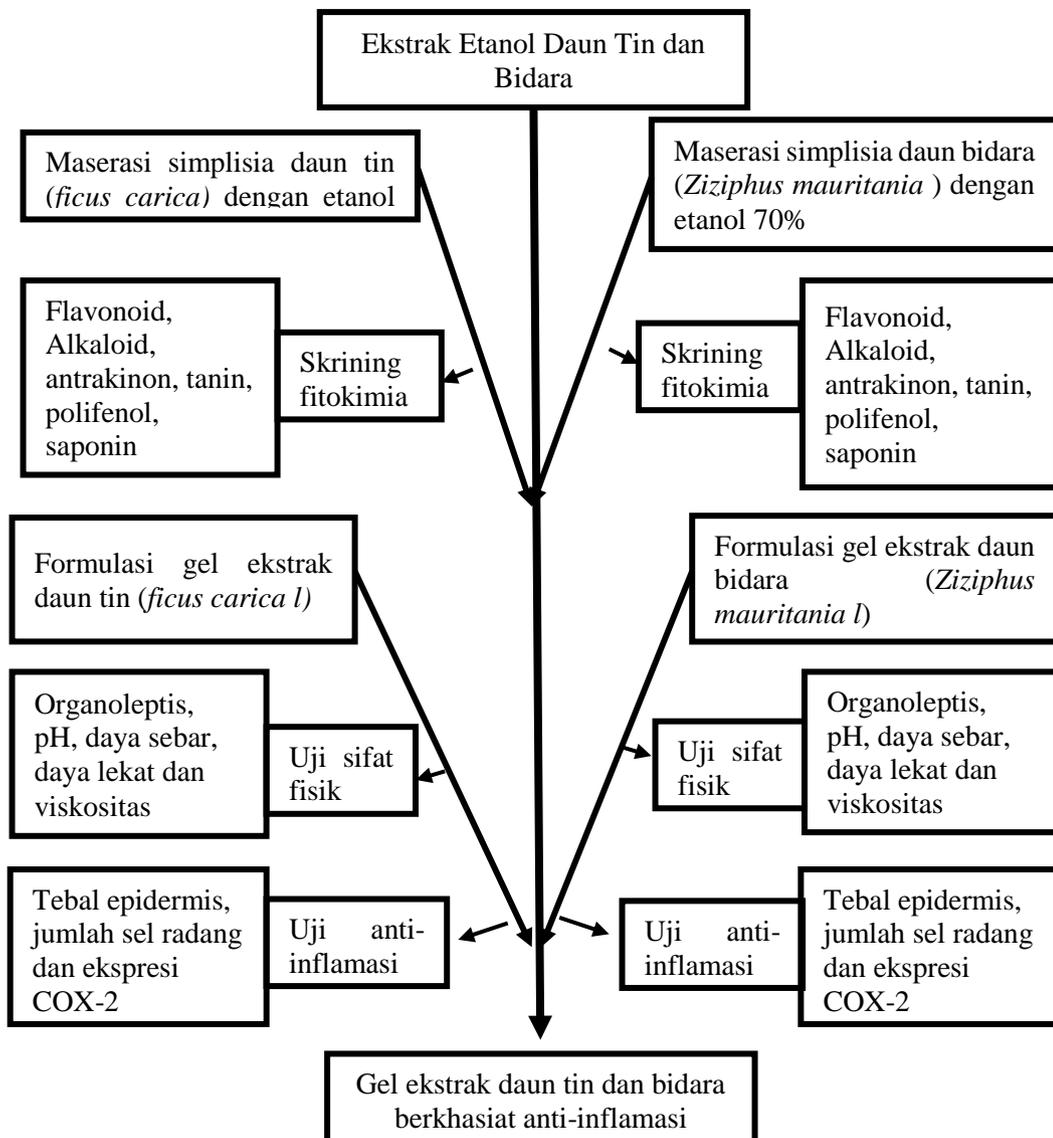


Gambar 7. Gambaran mikroskopis jaringan kulit dengan pengecatan hematoksin eosin (HE) (A) sel radang, (B) ketebalan epidermis dan (C) sel yang mengekspresikan COX-2 dengan pengecatan imunohistokimia (Sugihartini, *et al.*, 2017)

Penghitungan jumlah sel radang, ekspresi enzim COX-2 dan ketebalan epidermis pada preparat histopatologi yang dicat HE dihitung pada tiga bidang dari setiap preparat jaringan kulit mencit. Sel radang diketahui dari bercak yang berwarna kehitaman, ekspresi COX-2 diketahui dari bentuknya yang khas

seperti gagang telepon, dan ketebalan jaringan epidermis dihitung dari selisih jarak lapisan terdalam dan terluar jaringan epidermis kulit mencit. Perhitungan ini dilakukan setelah preparat jaringan kulit diberi perwarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi polyclonal COX-2 dengan metode direct.

G. Skema Langkah Kerja



H. Analisis Data

1. Analisis persentase Rendemen

Ekstrak kental yang diperoleh dari proses ekstraksi dihitung persen rendemennya dengan menggunakan persamaan dibawah ini

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

2. Analisis Statistika

Hasil presentase pengamatan terhadap preparat yang terdiri atas ekspresi enzim COX-2, jumlah sel radang dan ketebalan epidermis pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dianalisis dengan menggunakan seperangkat komputer. Perlakuan diuji dengan metode *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 $p < 0,05$. Alternatif analisis statistika yang digunakan apabila persyaratan *one way* ANOVA tidak terpenuhi adalah metode Kruskal-Wallis dengan *post hoc* Mann Whitney dengan $p < 0,05$.