

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Rancangan Penelitian**

Penelitian dilakukan dengan cara riset laboratorium menggunakan hewan uji mencit (*Mus Musculus*) dengan penelitian eksperimental murni, serta penelitian ini juga dilakukan secara riset virtual dengan mengolah data. Penelitian ini bertujuan menguji aktivitas antiinflamasi Ekstrak Daun Bopot (*Tabernaemontana divaricata* L.) Terhadap Mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi Karagenin.

#### **B. Subjek dan Objek**

Subjek penelitian adalah Ekstrak daun bopot (*Tabernaemontana divaricate* L.) yang dibuat di Laboratorium Kimia Bahan Alam Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur. Objek penelitian yaitu aktivitas antiinflamasi ekstrak daun bopot (*Tabernaemontana divaricate* L.) secara in vivo.

#### **C. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini pada bulan Agustus 2022-Januari 2023 di Laboratorium Farmakologi Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur, dan Laboratorium Kimia Bahan Alam Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

#### **D. Definisi Operasional**

##### **1. Ekstrak Daun Bopot (*Tabernaemontana divaricata* L.)**

Ekstrak Daun Bopot (*Tabernaemontana divaricate* L.) Ekstrak daun bopot adalah hasil dari proses fraksinasi yang diperoleh dari Daun Bopot (*Tabernaemontana divaricate* L.) menggunakan pelarut etil asetat.

## 2. Volume Udem Mencit

Volume udem adalah selisih volume telapak kaki mencit sebelum dan sesudah pemberian karagenin.

## E. Karakteristik Hewan Uji

Pada penelitian ini yang perlu diperhatikan adalah karakteristik hewan uji baik dari berat, ukuran dan kesehatannya.

## F. Metode Pengumpulan Data

### 1. Determinasi Tanaman

Pemilihan determinasi merupakan percobaan bertujuan untuk memvalidasi keakuratan spesimen yang digunakan dalam penelitian. Percobaan dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Konservasi Biodiversitas Hutan Tropis, yang terletak di dalam Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman.

### 2. Penyiapan Hewan Uji

Hewan yang digunakan dalam uji adalah mencit (*Mus Musculus*) sebanyak 15 ekor dengan dilakukannya perlakuan. Setiap perlakuan dilakukannya replikasi sebanyak 3 mencit yaitu kontrol positif, kontrol negatif, dosis ekstrak etil asetat daun bopot 250 mg/kgBB mencit, dosis ekstrak etil asetat daun bopot 125 mg/kgBB mencit dan dosis ekstrak etil asetat daun bopot 62,5 mg/kgBB mencit. Sebelum penelitian mencit diadaptasi dalam kandang selama 7 hari. mencit dipuaskan selama 12-18 jam sebelum perlakuan dan tetap diberi minum, guna menyamaratakan keadaan hewan uji dari pengaruh makanan yang dikonsumsi.

### 3. Penyiapan Sampel

Selanjutnya, tanaman bopot yang terkumpul mengalami proses pembersihan dan selanjutnya mengalami pengeringan di lingkungan yang tidak terhalang, tanpa paparan langsung

terhadap radiasi matahari atau aliran udara. Setelah proses pengeringan, daun bopot harus dihancurkan untuk mendapatkan serbuk simplisia.

#### 4. Pembuatan Ekstrak Etil Asetat Daun Bopot (*Tabernaemontana divaricate* L.)

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etil asetat 3:1 selama 5 hari dan dilakukan pengadukan sebanyak 2 kali pada hari ke-2 dan ke-4, serta dilakukannya pengulangan sebanyak 3 kali dengan total keseluruhan selama 15 hari. Kemudian ekstrak tersebut disaring dan pelarut diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu  $\pm 40^{\circ}\text{C}$  sehingga diperoleh ekstrak kental.

#### 5. Perhitungan Rendemen Ekstrak

Penelitian ini melakukan perhitungan rendemen untuk memastikan proporsi ekstrak yang dihasilkan per gram bubuk kering dengan menggunakan teknik ekstraksi yang dipilih. Rumus untuk menghitung persentase rendemen ekstrak dapat diturunkan adalah:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (gram)}}{\text{Bobot serbut kering sebelum diekstraksi (gram)}} \times 100\%$$

#### 6. Pembuatan Larutan CMC Na 0,5%

Sediaan larutan CMC Na 0,5% dibuat dengan menimbang 500 mg CMC Na ke dalam 10 ml aquadest panas kemudian dibiarkan selama kurang dari 15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai gel. Selanjutnya diaduk hingga menjadi massa yang homogen dan diencerkan dalam labu ukur dengan aquadest hingga volume 100 ml (Haryoto, 2010).

#### 7. Pembuatan Larutan Natrium Diklofenak

Larutan Na diklofenak merupakan kontrol positif dimana hal ini mempengaruhi variabel terikatnya. Metodologi pembuatan larutan natrium diklofenak dengan konsentrasi 0,5% karboksimetil selulosa (CMC) adalah sebagai berikut. 20 ml

aquades digunakan untuk melarutkan Na, diikuti dengan penambahan 50 mg natrium diklofenak (Haryoto, 2010).

## 8. Pembuatan Larutan Karagenin

Larutan karagenin digunakan untuk menginduksi kaki mencit agar terjadinya pembengkakan. Larutan karagenin 1% digunakan, dibuat dengan melarutkan 0,5 g karagenin dalam 5 ml larutan garam normal (NaCl 0,9%) melalui penimbangan (Haryoto, 2010).

## 9. Perhitungan Dosis Hewan Uji

### a. Dosis Natrium Diklofenak

Dosis Natrium Diklofenak untuk manusia (dari tabel Laurence & Bacharavh, 1964) = 50 mg (kontrol positif)

Nilai konversi dari manusia ke mencit 20 gram = 0,0026

Dosis untuk mencit 20 gram =  $0,0026 \times 50 \text{ mg} = 0,13 \text{ mg}$

### b. Dosis Na CMC

Na CMC 0,5% (kontrol negatif)

0,5 ml = 20 gram (BB mencit )

## 10. Uji Antiinflamasi

Untuk memastikan asupan yang konsisten, hewan percobaan dipilih sebelumnya dan satu kaki belakang setiap mencit ditandai dengan spidol. Selanjutnya, volume masing-masing kaki belakang diukur dengan menggunakan meteran *Plethysmometer*. Hasil pengukuran dicatat sebagai volume awal (Fitriyani et al., 2011).

Partisi populasi mencit menjadi lima set, masing-masing berisi tiga individu.

- a. Kelompok kontrol positif (Na diclofenak) berjumlah 3 mencit dengan perhitungan dosis yang telah diberikan.
- b. Kelompok kontrol negatif (CMC Na 0,5%) berjumlah 3 mencit dengan perhitungan dosis yang telah diberikan.

- c. Kelompok satu terdiri dari 3 mencit dengan dosis ekstrak etil asetat daun bopot 250mg/KgBB mencit.
- d. Kelompok dua terdiri dari 3 mencit dengan dosis ekstrak etil asetat daun bopot 125mg/KgBB mencit
- e. Kelompok tiga terdiri dari 3 mencit dengan dosis ekstrak etil asetat daun bopot 62,5mg/KgBB mencit

Sebelum pemberian karagenin kaki mencit diukur terlebih dahulu menggunakan *plethysmometer*. Setelah diberikan secara subplantar larutan karagenin 1% pada telapak kaki mencit sebanyak 0,1 ml. Ditunggu 30 menit untuk pengukuran kaki mencit dan pemberian sediaan kontrol positif, kontrol negatif, pemberian sediaan ekstrak konsentrasi 1, 2 dan 3. Penelitian melibatkan pengukuran volume kaki belakang mencit pada tiga interval waktu yang berbeda (60, 90, dan 120 menit) setelah penyuntikan karagenin. Pengukuran volume digital digunakan untuk mendapatkan pengukuran, dimana telapak kaki belakang mencit direndam dalam air sampai terbentuk tanda. Hasil tersebut kemudian didokumentasikan. Data yang dikumpulkan disusun dalam format tabel. (Fitriyani et al., 2011).

#### G. Teknik Analisis Data

Metode ANOVA digunakan untuk melakukan analisis statistik terhadap data yang diamati dengan menggunakan program SPSS versi 26. Agar mengetahui data normalitas, homogen dan apakah memiliki perbandingan yang signifikan dalam suatu data. Serta data tersebut dihitung persen edema dan persen inhibisi dengan rumus:

$$\% \text{edema} = \frac{vt - v0}{v0} \times 100 \text{ (Rahayu, 2022)}$$

vt = volume telapak kaki pada waktu t (setelah diinduksi karagenan).

v0 = volume telapak kaki pada waktu 0 (sebelum diinduksi karagenan).

$$\% \text{inhibisi} = \frac{a - b}{a} \times 100$$

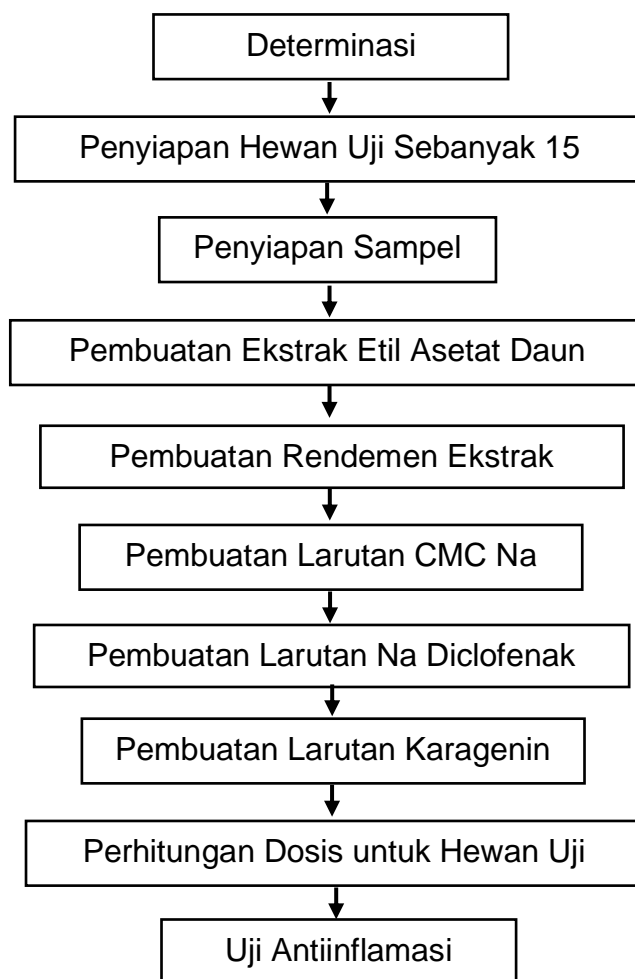
a = % radang rata-rata udem (kelompok kontrol negatif).

b = % radang rata-rata kelompok zat uji.

## H. Etika Penelitian

Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Malik Ibrahim Malang Menyatakan bahwa penelitian ini telah memenuhi syarat atau laik etik dengan nomor: 06/EC/KEPK-FKIK/40/2023.

## I. Alur Jalurnya Penelitian



## J. Jadwal Penelitian

Tabel 1.1. Jadwal Penelitian

No	Kegiatan	September 2022				Oktober 2022				November 2022				Desember 2022				Januari 2023			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1.	Penentuan Lokasi Pengambilan sampel	■																			
2.	Pengambilan Sampel		■	■	■																
3.	Penyiapan Hewan Uji			■	■																
4.	Determinasi sampel				■																
4.	Pembuatan simplisia					■	■	■	■												
6.	Ekstraksi									■	■	■	■								
8.	Uji Antiinflamasi													■	■	■	■				
9.	Penulisan Skripsi																	■	■	■	■