

## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari – Maret 2025 di Laboratorium Farmakologi Farmasi Progam Studi Farmasi S-1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### a. Alat

Spektrofotometer UV-Vis, timbangan analitik (*Ohaus*), rotary evaporator (Biobase), sentrifugasi, autoklaf, water bath (Biobase), oven (Yenako), pH meter, blender (cosmos), corong pisah, spatula, batang pengaduk, botol maserasi, mikropipet, becker glass (*pyrex*), tabung reaksi (*pyrex*), kaca arloji, mortir, stemper, pipet tetes, gelas ukur (*pyrex*) dan rak tabung.

##### b. Bahan

Bahan- bahan yang digunakan adalah Daun kamboja jepang (*Adenium obesum*), metanol, etanol 70%, dektrosa, natrium sitrat, asam sitrat, natrium klorida (NaCl), FeCl<sub>3</sub> 1%, asam sulfat encer, sel darah merah tikus, dinatrium hidrogen fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O), natrium hidrogen fosfat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O), natrium diklofenak, HCl 1 M, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, CH<sub>3</sub>COOH, magnesium, HCL pekat, pereaksi meyer dan aquadest.

### **3.3 Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan penelitian eksperimental semu menggunakan metode stabilitas membran sel darah merah pada tikus putih jantan dengan berbagai konsentrasi ekstrak daun kamboja jepang.

#### **1. Variabel Bebas**

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun kamboja jepang.

#### **2. Variabel Terikat**

Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah stabilitas membran sel darah merah pada tikus putih.

#### **3. Variabel Terkontrol**

Variabel terkontrol yang digunakan dalam penelitian ini adalah tempat pengambilan sampel, metode ekstraksi, suhu inkubasi, waktu inkubasi, larutan, jumlah replikasi, jenis dan sumber sel darah merah.

### **3.4 Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1 Determinasi Tanaman dan Hewan**

Determinasi dilakukan untuk memastikan kebenaran identitas tumbuhan dan hewan yang akan digunakan dan menghindari kesalahan dalam pengambilan bahan. Bahan baku dalam penelitian ini menggunakan daun kamboja jepang yang diperoleh dari Desa Bulakamba, Kabupaten Brebes dengan spesifikasi daun berwarna hijau. Hewan yang digunakan adalah tikus putih jantan yang didapatkan dari peternak hewan tikus putih di Kota Tegal. Determinasi dilakukan di laboratorium Universitas Bhamada Slawi. Determinasi bertujuan untuk

memastikan identitas tanaman yang digunakan dalam penelitian (Tuslinah et al., 2022).

#### **3.4.2 Preparasi Sampel**

Dilakukan dengan cara mencuci bersih daun kamboja jepang sebanyak 2000 gram yang telah dikumpulkan serta melakukan sortasi basah dan kering. Daun kamboja yang telah dicuci bersih dikeringkan dengan tidak terkena sinar matahari secara langsung. Daun kamboja kering selanjutnya diblender agar didapat ukuran partikel yang kecil (Anggoro et al., 2022).

#### **3.4.3 Ekstraksi Sampel Daun Kamboja Jepang**

Pembuatan ekstrak daun kamboja dilakukan dengan metode maserasi. Ditimbang sebanyak 500 gram simplisia daun kamboja kemudian ditambahkan metanol sebanyak 5 L. Setelah itu didiamkan selama 3 hari dan diaduk sesekali. Kemudian hasil disaring menggunakan kain yang tidak begitu rapat (kain flanel putih). Ekstrak yang diperoleh dari proses maserasi dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan diuapkan dengan *waterbath* untuk mendapatkan hasil ekstrak kental dengan suhu 30-40°C (Anggoro et al., 2022).

#### **3.4.4 Penyiapan hewan uji**

##### **a. Pengambilan sampel**

Pengambilan sampel darah tikus dilakukan setelah tikus dipuasakan dari pakan selama 8 jam. Hal ini dilakukan karena eritrosit dan hemoglobin akan mengalami peningkatan apabila dipuasakan selama 17-20 jam. Pengambilan darah dengan cara tikus dikeluarkan dari

kandang dan diberikan anetesi lidocain dengan dosis 10 - 25 mg/kg secara oral kemudian setengah bagian dari ekornya diangkat. Tikus dimasukkan ke sungkup rangkap, kemudian diolesi alkohol 70 %. Dipotong bagian ujung ekor menggunakan gunting bedah yang telah diolesi alkohol 70%. Selanjutnya darah dari ekor tikus dikeluarkan secara perlahan-lahan dengan menekan ekor kearah ujung ekor. Darah ditampung dalam tabung vakutainer EDTA 0.5 mL sampai tanda batas (Pradawahyuningtyas et al., 2020).

#### **b. Pengelompokan hewan uji**

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian adalah tikus (*Rattus Norvegicus*) yang sehat dengan bobot 150-200 gram sebanyak 15 ekor. Dibagi dalam 5 kelompok, masing- masing terdiri dari 3 ekor. Sebelum diberi perlakuan tikus diadaptasi selama  $\pm 7$  hari dengan pemberian pakan standar.

#### **c. Perlakuan terhadap hewan uji**

Tikus dalam kandang kurang lebih selama satu minggu untuk proses aklimatisasi. Hewan uji dibagi dalam 5 kelompok dengan jumlah 3 ekor pada masing-masing kelompok. Kelompok I (kontrol), kelompok II (pembanding) diberikan suspensi natrium diklofenak, kelompok III, IV dan V diberikan ekstrak metanol daun kamboja dengan dosis masing-masing 166,6 mg/kgBB, 222,2 mg/kgBB dan 277,7 mg/kgBB, berikut tabel kelompok uji.

**Tabel 3.1** kelompok hewan uji (Halimu et al., 2017)

| Kel I             | Kel II                       | Kel III                        | Kel IV                         | Kel V                          |
|-------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Pemberian kontrol | Pemberian Natrium diklofenak | Pemberian ekstrak daun kamboja | Pemberian ekstrak daun kamboja | Pemberian ekstrak daun kamboja |
| uji negatif (-)   | kontrol                      | kamboja                        | 222,2mg/kgBB                   | kamboja                        |
|                   | positif (+)                  | 166,6 mg/kgBB                  |                                | 277,7 mg/kgBB                  |

Keterangan : Kel = Kelompok

### 3.4.5 Uji Parameter Ekstrak

#### 1. Organoleptis

Pengujian organoleptis dilakukan untuk mendapatkan hasil dari ekstrak yang meliputi uji warna, bau, rasa, dan bentuk (Maryam et al., 2020).

#### 2. Susut Pengerinan

Ekstrak ditimbang sebanyak 1 g, lalu dipanaskan sampai 30 menit pada 105°C dan ditempatkan dalam krus porselen yang telah ditarer. Sebelum ditimbang, ekstrak dihaluskan dengan mengocok krus porselin sampai membentuk lapisan setebal 5 – 10 mm. Masukkan ke dalam oven, buka tutupnya dan keringkan pada suhu 105°C sampai beratnya tertahan. Dinginkan dengan desikator. Lakukan replikasi sebanyak tiga kali, kemudian dihitung persentasenya. Rumus susut pengerinan, yaitu:

$$\% = \frac{\text{Berat awal} - \text{Berat akhir}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

(Maryam et al., 2020).

### 3. Kadar Air

Uji kadar air dilakukan dengan menggunakan alat *moisture analyzer balance*. Langkah pertama yaitu letakan sampel diatas pan sebanyak 0,5 g. kemudian tutup bagian cover alat dan tekan tombol mulai untuk memulai pengukuran kadar air selama 10 menit. Ketika alat bunyi menandakan kadar air sampel telah konstan (Supriningrum et al., 2021)

### 4. Kadar abu

#### a. Kadar Abu Total

Penetapan kadar abu total dilakukan dengan cara sebanyak 1 gram ekstrak ditimbang (W1, ditempatkan dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditimbang (W0). Kemudian ekstrak dipijarkan sampai arang habis, didinginkan dan ditimbang (W2). Dihitung kadar abu bahan yang telah dikeringkan di udara.

$$\text{Kadar abu total} = \frac{W2 - W0}{W1} \times 100\%$$

Keterangan:

W0 = Bobot cawan kosong (g)

W1 = Bobot cawan awal (g)

W2 = Bobot cawan + ekstrak setelah di abukan (g)

(Maryam et al., 2020).

#### b. Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu, dididihkan dengan 25 ml asam sulfat encer P selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, saring melalui krus kaca

masir atau kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas, pijarkan hingga bobot tetap, timbang. Hitung kadar abu yang tidak larut dalam asam terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{W_3 - C - W_0}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 = bobot cawan kosong

C = bobot kertas saring

W1 = bobot ekstrak awal

W3 = bobot cawan + abu yang tidak larut asam

(Depkes RI, 2000).

### 3.4.6 Skrining Fitokimia

Uji Skrining fitokimia yang dilakukan yaitu :

#### a. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,05 g sampel dimasukkan dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 10 mL larutan HCl 2 N, kemudian disaring. Filtrat selanjutnya diuji dengan beberapa pereaksi meyer sebanyak 4 mL filtrat dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan pereaksi meyer sebanyak 1 mL. Uji positif bila terbentuk endapan putih (Khasanah et al., 2020)

#### b. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,2 g sampel tumbuhan yang telah diekstrak dengan 5 mL etanol dan dipanaskan selama  $\pm$  5 menit didalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambah 3 tetes HCl pekat. Kemudian ditambahkan 0,2 g

bubuk Mg. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah jingga selama 3 menit (Sari et al., 2024).

c. Uji Saponin

Sebanyak 2 g sampel tumbuhan yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan air hangat 10 mL lalu dikocok selama 10 detik, apabila menimbulkan busa ditambahkan HCl 1 N, bila busa yang terbentuk bertahan selama 15 menit busa stabil dengan ketinggian 1-3 cm, maka ekstrak positif (Aristyawan et al., 2024).

d. Uji Tanin

Sebanyak 0,5 g sampel yang telah dihaluskan dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL aquades yang mendidih, kemudian disaring. Filtrat 2-3 tetes  $\text{FeCl}_3$  1%. Sampel mengandung tanin bila terjadi perubahan warna dari warna awal hijau muda menjadi hijau kehitaman (Mailuhu et al., 2017)

### **3.4.7 Uji Aktivitas Antiinflamasi dengan Metode Stabilitas Membran Sel Darah Merah**

a. Pembuatan larutan Alsever

Larutan Alsever Steril dibuat dengan 2 g dekstrosa, 0,8 g natrium sitrat, 0,05 g asam sitrat dan 0,42 g NaCl dilarutkan dalam aquades sampai 100 mL pada suhu ruang. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu  $115^\circ\text{C}$  selama 30 menit (E. K. Sari et al., 2024).

b. Pembuatan larutan Dapar Fosfat 7,4 ( 0,15 M )

Dapar Fosfat pH 7,4 (0,15 M) dibuat dengan 13,35 g dinatrium hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) dilarutkan dalam aquades sampai 500 mL (0,15 M). Selanjutnya 4,14 g natrium dihidrogen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) dilarutkan dalam aquades sampai 200 mL (0,15 M). Kemudian 80,8 mL larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,15 M) dicampurkan dengan 19,2 mL larutan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,15 M) pada suhu ruang. Cek pH dengan pH 7,4 meter. Kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 2 jam (Vinkasari et al., 2023).

c. Pembuatan larutan isosalin

Isosalin dibuat dengan 2,125 g NaCl dilarutkan dalam dapar fosfat pH 7,4 (0,15 M) sampai volume 250 mL pada suhu ruang. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 2 jam (E. K. Sari et al., 2024).

d. Pembuatan larutan hiposalin

Hiposalin dibuat dengan 0,625 g NaCl dilarutkan dalam dapar fosfat pH 7,4 (0,15 M) sampai volume 100 mL pada suhu ruang. Kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit (Pangemanan et al., 2024).

e. Pembuatan suspensi sel darah merah

Suspensi sel darah merah dibuat dengan cara darah tikus yang telah diambil sebanyak 10 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung

centrifuge yang telah berisi larutan alsever steril sebanyak 10 mL. Campuran darah dan larutan alsever steril tersebut kemudian disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 27°C. Supernatan yang terbentuk dipisahkan menggunakan pipet steril. Endapan sel-sel darah yang tersisa kemudian dicuci dengan larutan isosalin dan disentrifugasi kembali. Proses tersebut diulang 4 kali sampai isosalin jernih. Volume sel darah diukur dan diresuspensi dengan isosalin sehingga didapatkan suspensi sel darah merah dengan konsentrasi 10% v/v. Suspensi sel darah tersebut disimpan pada suhu 4°C jika belum digunakan (Sukmawati et al., 2022).

#### **3.4.8 Uji Kuantitatif**

a. Pembuatan larutan induk ekstrak daun kamboja

Larutan induk 1000 ppm disiapkan dengan cara menimbang 100 mg ekstrak kental daun kamboja dan dilarutkan dengan isosalin sampai volumenya 100 mL (Togelang et al., 2022).

b. Pembuatan larutan natrium diklofenak

Larutan induk 1000 ppm disiapkan dengan cara menimbang 100 mg natrium diklofenak dan dilarutkan dengan isosalin sampai volumenya 100 mL (Hastika et al., 2024).

c. Penentuan panjang gelombang

Panjang gelombang serapan maksimum 1 mL dapar fosfat pH 7,4 (0,15 M), 0,5 mL suspensi sel darah merah, 1 mL larutan isosalin sebagai pengganti larutan sampel, dan 2 mL hiposalin, kemudian diinkubasi

pada 37°C selama 10 menit dan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit lalu diukur pada panjang gelombang 500-700 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (E. K. Sari et al., 2024).

d. Penentuan kurva baku standar

Diambil 0,1 g ekstrak dan dilarutkan dengan isosalin dengan tanda batas 100 mL, begitu juga dengan natrium diklofenak diambil 0,1 g dan dilarutkan dengan isosalin dengan tanda batas 100 mL, kemudian masing – masing kedua larutan tersebut dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan menjadi beberapa konsentrasi sebesar 100, 200, 400, 600, 800 dan 1000 ppm. Lalu diukur serapannya pada panjang maksimum yang diperoleh (Hardi et al., 2018).

### 3.4.9 Pengujian Aktivitas Ekstrak terhadap Stabilitas Membran Eritrosit

Untuk mengukur aktivitas antiinflamasi ekstrak terhadap stabilitas membran eritrosit, larutan yang digunakan diantaranya sebagai berikut:

a. Pembuatan larutan uji

Larutan uji (4,5 mL) terdiri dari 1 mL dapar fosfat pH 7,4 (0,15 M), 0,5 mL suspensi sel darah merah, 1 mL larutan ekstrak dan 2 mL hiposalin (Hardi et al., 2018)

b. Pembuatan larutan natrium diklofenak

Larutan kontrol positif terdiri dari 1 mL dapar fosfat pH 7,4 (0,15 M), 0,5 mL suspensi sel darah merah, 1 mL larutan Na diklofenak dan 2 mL hiposalin (Hardi et al., 2018).

c. Pembuatan larutan kontrol uji

Larutan kontrol uji terdiri dari 1 mL dapar fosfat pH 7,4 (0,15 M), 0,5 mL larutan isosalin sebagai pengganti suspensi sel darah merah, 1 mL larutan sampel dan 2 mL hiposalin (Hardi et al., 2018).

d. Pembuatan larutan kontrol negatif

Larutan kontrol negatif terdiri dari 1 mL dapar fosfat pH 7,4 (0,15 M), 0,5 mL suspensi sel darah merah, 1 mL larutan isosalin sebagai pengganti larutan sampel dan 2 mL hiposalin (Hardi et al., 2018).

Setiap larutan di atas kemudian diinkubasi pada 37°C selama 30 menit dan disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit. Cairan supernatan yang didapat diambil dan kandungan hemoglobinnnya diperhitungkan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. % stabilitas membran sel darah merah dapat dihitung dengan rumus, sebagai berikut:

$$\begin{aligned} &\% \text{ Stabilitas larutan uji} \\ &= 100 - \left( \frac{\text{abs lar. uji} - \text{abs lar. kontrol uji}}{\text{abs larutan kontrol negatif}} \right) \times 100\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &\% \text{ Stabilitas natrium diklofenak} \\ &= 100 - \left( \frac{\text{abs lar. natrium diklofenak} - \text{abs lar. kontrol uji}}{\text{abs larutan kontrol negatif}} \right) \times 100\% \end{aligned}$$

### 3.5 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan uji ANOVA, terhadap uji antiinflamasi ekstrak daun kamboja jepang dianalisis dengan bantuan SPSS 25. Uji normalitas dilakukan dengan metode *Shapiro wilk*, dimana jika nilai signifikan  $>0.05$  maka dianggap terdistribusi normal. Selanjutnya, dilakukan uji homogenitas dengan *levene test* jika nilai signifikan  $>0.05$ , maka dianggap homogen. Kemudian analisis dilanjutkan dengan *uji one way anova*. Jika nilai signifikan yang diperoleh  $>0.05$ , maka  $H_0$  diterima dan  $H_1$  ditolak sedangkan jika nilai signifikan  $< 0.05$ ,  $H_0$  ditolak. Sebagai langkah akhir, dilakukan uji post hoc. Uji *post hoc* dilakukan untuk melihat perbedaan bermakna antar kelompok sampel setelah uji *one way anova* menunjukkan hasil yang signifikan.