# BAB III

#  METODOLOGI PENELITIAN

# 3.1 Rancangan Penelitian

# 3.1.1 Variabel Penelitian

### Indikasivariabelutama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% daun sintrong.

Variabel utama kedua penelitian ini adalah efek ekstrak etanol daun sintrong hasil maserasi dengan pelarut etanol 96% terhadap kadar MDA (malondialdehid) pada tikus jantan.

### Klasifikasivariabelutama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yang meliputi variabel bebas, variabel tergantung, variabel terkendali.

Variabel bebas merupakan variabel yang dengan sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel dosis ekstrak etanol 96% daun sintrong.

Variabel tergantung merupakan titik permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian dan akibat dari variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar MDA pada tikus setelah pemberian ekstrak etanol daun sintrong dengan dosis yang berbeda-beda yang diinduksi aloksan.

Variabelterkendali merupakan variabel yang dianggap mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan klasifikasinya agar memperoleh hasil yang tidak tersebar dan penelitian lain dapat mengulangi secara tepat. Variabel terkendali pada penelitian ini adalah metode ekstraksi daun sintrong, kondisi pengukur atau meneliti kondisi fisik hewan uji yang meliputi laboratorium, berat badan, usia, dan zat penginduksi.

# 3.1.2 Parameter Penelitian

### 1. Populasi

Populasiadalahkeseluruhanobjekdalamruanglingkuppenelitian.Populasipadapenelitianiniadalahdaunsintrong.

### 2. Sampel

Sampel yang digunakandalampenelitianiniadalahdaunsintrong yang masihsegar, bewarnahijaudanbebasdarihama yang dipetik.

**3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian**

**1. Jadwal Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan Februari.

**2. Lokasi Penelitian**

Penelitian dilakukan mulai di Laboratorium Farmasi Universitas Sumatera Utara.

**3.3 Bahan**

Bahan yang digunakandalampenelitianiniadalahserbukdaunsintrong (*Crassocephalum crepidioides*), etanol , aquades, karagenan, larutannatriumklorida 0,9%, natriumcmc 0,5 %, natriumdiklofenak, asamkloridapekat, serbuk magnesium, asamklorida 2N, asamsulfatpekat, asamasetatanhidrida, etanol, n-heksan, asamnitrat, bismutnitrat, besi (III) klorida, iodium, kaliumiodida, kloralhidrat, kloroform, merkuri (II) klorida, amilalkohol, timbal (II) asetat, toluena, air raksa.

**3.4 Alat**

Alat-alat yang digunakanpadapenelitianiniadalahalat-alatgelas, plestimometer, blender, hotplate, mortirdanstamfer, neracaanalitik, mikroskop, oven listrik, aluminium foil, pinset, pot plastik, rotary evaporator*,* oral sonde, stopwatch, spuitinjeksiperoraldanintraplantar, tanur, kursporselin, lemaripengeringsampel.

## **3.5 Hewanpercobaan**

Hewanpercobaan yang digunakandalampenelitianiniadalahtikusputihjantan (Rattusnorvegicus) yang berumur 2-3 bulan, denganberat 150-200 g sebanyak 25 ekor yang dibagimenjadi 5 kelompokmasing-masingperlakuanmenggunakan 5 ekor. Tikussebelumnyasudah di adaptasiselama 14 hari.Tikusdipelihara di dalamkandang di berisekamdandiberimakanpeletdan air minum.Selanjutnyadigunakanuntukpercobaan.Rumusmenghitungmenggunakanhewanpercobaan :RumusFederell : (n-1) (t-1) ≥ 15

n = jumlahhewandalamsatukelompok

t = jumlahkelompok

 (n-1) (t-1) ≥ 15

 (n – 1) (5 – 1) ≥ 15

 (n – 1) 4 ≥ 15

 4n – 4 ≥ 15

 4n ≥ 19

 n ≥ 4,75 atau 5

**3.6 Prosedur Penelitian**

### 3.6.1 Determinasidaunsintrong

Determinasitanamandilakukanuntukmengetahuikebenarantanaman yang berkaitandenganciri-cirimorfologi yang adapadatanamansintrongsesuaikepustakaandandibuktikan di FakultasFarmasi Universitas Sumatera Utara.

### 3.6.2 Pengambilansampel

Pengambilan sampel daun sintrong pada penelitian ini dilakukan pada daun yang muda dari Pematangsiantar. Daun sintrong kemudian dibersihkan terlebih dahulu dari kotoran yang menempel pada tubuhnya dengan cara mencucinya dengan air mengalir lalu ditiriskan dan dikeringkan dengan oven.

### 3.6.3 Pembuatanserbukdaunsintrong

Daunsintrong yang sudahdicucidengan air yang mengaliruntukmembersihkankotoranataudebu yang menempelpadadaun.Setelahitudilakukanpengeringandilakukandengan oven selama 2 hari, kemudiandaun yang sudahdikeringkandipotongmenjadilebihkeciluntukmemudahkan proses pembuatanserbukdengan blender, danpotongandaunsintrongselanjutnyadiblenderhinggamenjadiserbukhalus.

**3.6.4PembuatanLarutanPereaksi**

**1.PreaksiBouchardat**

Kaliumiodinditimbangsebanyak 4g, laludilarutkandengan air sulingsecukupnya, kemudianditimbang 2 g iodidadandilarutkankedalamkaliumiodidadidalamlabuterukur 100 ml, kemudiandicukupkanvolumenyadengan air sulinghingga 100 ml (Depkes RI, 1989).

**2.PreaksiDragendrof**

Bismut (II) ditimbangsebanyak 8g, kemudiandilarutkandalam 20 ml asamnitratpekat.Ditimbang 27,2 g kaliumiodida, dandilarutkandalam 50 ml air sulingkemudiandicampurkankedualarutandandiamkansampaimemisahsempurna. Diambillarutanjernihdenganmengunakan pipet tetesdandimasukkandalamlabutentukur 100 ml, kemudiandicukupkanvolumenyadengan air sulinghingga 100 ml, kemudiandisimpandalambotolgelap (Depkes RI, 1989).

**3.Preaksi Mayer**

Raksa (II) ditimbangsebanyak 1,38 g, laludilarutkandalam 60 ml air suling. Kemudianditimbang 5 g kaliumiodida, dandilarutkandalam 10 ml air suling.Kedualarutandicampurkandalamlabutentukur 100 ml dandicukupkanvolumenyadengan air sulinghingga 100 ml (Depkes RI, 1989).

**4. Larutan HCL 2N**

Asamkloridapekatdipipetsebanyak 17 ml, kemudiandiencerkandengan air sulingdidalamlabutentukur 100 ml hinggatandabatas (Depkes RI, 1989).

**5. LarutanKloralhidrat**

Larutkan 50g kloralhidrat*P*dalam 20 ml air (Ditjen Pom,1979).

**6. LarutanNaCL 0,9 %**

NaClditimbangSebanyak 9 g dandilarutkandengan air sulingsteril 1000 ml, sampaigaristanda, dimasukkandalam Erlenmeyer steril yang tertutupkemudiandisterilkandalamautoklafpadasuhu 1210C selama 15 menit (Ditjen POM,1995).

**3.6.5 Karakterisasi Simplisia**

Pemeriksaan yang dilakukan meliputi mikroskopik, makroskopik, penetapan kadar air, penetapan kadar abu total, penetapan kadar sari larut dalam air dan penetapan kadar sari larut dalam etanol, penetapan kadar abu tidak larut asam. (Depkes, 1989).

1. **Pemeriksaan Makroskopik**

Pemeriksaan yang dilakukan dengan mengamati bentuk luar daridaun sintrong.

1. **Pemeriksaan Mikroskopik Simplisia**

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan dengan cara daun sintrong yang segar diiris melintang dan membujur, kemudian diletakkan diatas objek gelas yang telah ditetesi dengan larutan klorahidrat 70% lalu dipanaskan sebentar diatas api Bunsen dan ditutup dengan cover gelas, kemudian diamati dibawah mikroskop.

### Penetapan Kadar Air Simplisia

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode Azeotropi (destilasi toluen). Kedalam labu kering dari alat untuk penentuan kadar air, ditambahkan 200 ml toluene dan 2 ml air suling, lalu didestilasi selama 2 jam. Setelah 2 jam, toluen didinginkan selama 30 menit, kemudian volume air dalam tabung penampung dari alat penentuan kadar air dibaca dengan ketelitian 0,05 ml. Selanjutnya dimasukkan 5g bahan sampel yang telah ditimbang seksama kedalam labu, lalu dipanaskan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mulai mendidih, kecepatan diatur 2 tetes tiap detik. Setelah sebagian besar air terdestilasi, kecepatan tetesan dipercepat menjadi 4 tetes tiap detik (dengan cara menaikkan suhu). Setelah volume tidak bertambah lagi, bagian dalam pendingin dibalas toluene. Destilasi dilanjutkan kembali selama 5 menit, kemudian tabung penerima dibiarkan mendingin sampai suhu kamar. Volume air dibaca setelah air dan toluen memisah campuran. Selisih kedua volume air yang dibaca sesuai dengan kandungan air yang terdapat didalam bahan yang diperiksa. Kadar air dihitung dalam persen terhadap berat sampel yang telah dikeringkan diudara (Depkes RI, 1989).

% kadar air simplisia = $\frac{volume air akhir-volume air awal}{berat sampel}$ × 100%

1. **Penetapan Kadar Sari Dalam Air**

Ditimbang 5 g serbuk yang telah dikeringkan diudara, kemudian dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml air menggunakan labu tersumbat,sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Disaring, lalu diuapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang ditara, panaskan sisa pada suhu 105˚C. Hitung kadar dalam persen sari yang larut dalam air, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Depkes RI, 1989).

Kadar sari larut air = $\frac{\left(berat cawan berisi-berat cawan kosong\right)x pengenceran}{berat sampel}$ × 100%

1. **Penetapan Sari Yang Larut Dalam Etanol**

Ditimbang 5 g serbuk yang telah dikeringkan diudara, kemudian dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol 95% menggunakan labu tersumbat, sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Saring cepat untuk menghindari penguapan pada etanol 95%, lalu diuapkan 20 ml filtrat dalam cawan dangkal berdasarkan rata yang telah ditara, panaskan sisa pada suhu 105˚C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol 95%, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Depkes RI, 1989).

Kadar sari larut air = $\frac{\left(berat cawan berisi-berat cawan kosong\right)x pengenceran}{berat sampel}$ × 100%

1. **Penetapan Kadar Abu Total**

Serbuk yang telah digerus, ditimbang seksama sebanyak 2g, dimasukkan kedalam kurs porselin yang telah dipijar dan ditara, lalu diratakan. Kurs dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, pemijaran dilakukan pada suhu 600oC, didinginkan, ditimbang hingga diperoleh bobot tetap, kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Depkes RI, 1989).

Kadar abu total = $\frac{berat cawan berisi-berat cawan kosong}{berat sampel}$ × 100%

1. **Penetapan Kadar Abu Yang Tidak Larut Asam**

Abu yang diperoleh dalam penetapan kadar abu total dididihkan dalam 25 ml asam klorida encer selama 5 menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkam, disaring melalui kertas saring bebas abu, kemudiandicuci dengan air panas. Residu dan kertas dipijarkansampai bobot tetap, kemudian didinginkan dan ditimbang. Kadar abu yang tidak larut asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Depkes, 1989).

Kadar abu tidak larut asam = $\frac{berat cawan berisi-berat cawan kosong}{berat sampel}$ × 100%

### 3.6.6 PembuatanMaserasi

Masukkan 500 gram daunsintrong (*Crassocephalumcrepidioides*Benth. S. Moor.), dilakukandengancaramaserasimengunakanpelarutetanol 96% carakerja: Masukkanserbuksimplisia (500 g ) kedalamsebuahbejana, kemudiandituangkan (3.750 Ml) cairanpenyarietanollalututupdan di biarkanselama 5 hariterlindungdaricahayamataharisambil di aduk- aduksesekali. Setelah 5 harimaseratdisaringdanampasnya di peras.Cuciampasnyadengan( 2.750 ml ) etanol, laludisaringdandiperas. Maserat 1 dan 2 dicampurkandalamsatubejanaLaludipindahkankedalambejanatertutup, dibiarkan di tempatsejukterlindungdaricahayaselama 2 hari.Enaptuangkandansaring.Lalusetelahitudipisahkanekstrakdanpelarutdengan Rotary Evaporator (Ditjen Pom,1979).

### 3.6.7 PembuatanInduktorRadang (Karagenan 1%)

Ditimbang karagenan sebanyak 1 g, lalu dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 ml, dicukupkan dengan larutan NaCl 0,9% kemudian dibiarkan selama 24 jam.

### 3.6.8 IdentifikasiSkrining Fitokimiapadaekstrakdaunsintrong

1. IdentifikasiAlkaloid

Serbuksimplisiadanekstraketanoldaunmengkududitimbangsebanyak 0,5 g, kemudianditambahkan 1 ml asamklorida 2 N dan 9 ml air suling, dipanaskandiataspenagas air selama 2 menit, didinginkandandisaring. Filtratdipakaiuntuktesalkaloidasebagaiberikut:

1. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Mayer, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning.
2. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Bouchardat, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai kehitaman.
3. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Dragendorff, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan warna merah atau jingga.

Alkaloidadianggappositifjikaterjadiendapanataukekeruhansedikitnya 2 reaksidari 3 percobaandiatas (Depkes RI, 1989)..

### Pemeriksaan Flavonoid

Serbuk simplisia dan ekstrak etanol ditimbang sebanyak 10 g lalu ditambahkan 100 ml air panas, didihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas. Kedalam 5 ml filtrat ditambahkan serbuk magnesium, 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Fransworth, 1996).

### PemeriksaanTanin

Serbuk simplisia dan ekstrak etanol ditimbang sebanyak 0,5 g dan ditambahkan dengan 10 ml air suling lalu disaring Filtratnya diencerkan dengan air sampai tidak berwarna. Larutan diambil sebanyak 2 ml dan ditambahkan 1-2 tetes pereaksi FeCL3 1%. Jika terjadi warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Depkes RI, 1989).

### PemeriksaanSaponin

Serbuk simplisia dan ekstrak etanol ditimbang sebanyak 0,5 g dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan kocok selama 10 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil tidak kurang dari 10 menit, dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1989).

### Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid

Serbuk simplisia dan ekstrak etanol ditimbang sebanyak 5 g, masing-masing dimaserasi dalam 20 ml eter selama 2 jam kemudian disaring. Filtrat sebanyak 5 ml diuapkan dalam cawan penguap sampai kering. Kedalam residu ditambahkan 20 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat (pereaksi Lieberman-Bouchard). Terbentuk warna ungu atau merah yang berubah menjadi biru-hijau menunjukkan adanya steroida/triterpenoida (Harbone, 1987).

## **3.6.****9 ProsedurPengujianAntiinflamasi**

Sebelumpengujianhewanpercobaan di peliharaselama 14 haripadakandang yang mempunyaiventilasi yang baikdanselalu di jagakebersihannya.Hewan yang sehatditandaidenganmemperlihatkangerakan yang lincah (Wirda, 2001).

Prosedurpengujianantiinflamasi :

1. Tikusdipuasakan ± 18 jam sebelumpengujian, air minumtetapdiberikan.
2. Pada hari pengujian ditimbang bobot tikus lalu diberi tanda pada sendi kaki kiri untuk setiap kaki tikus agar pemasukan kedalam air raksa selalu sama
3. Volume kaki tikus diukur dan dinyatakan sebagai volume awal (Vₒ) untuk setiap tikus pada setiap kali pengukuran diperiksa tinggi cairan pada alat dan dicatat sebelum dan sesudah pengukuran
4. Tikus diberi suspensi karagenan 1% secara intraplantar pada telapak kaki kiri tikus dengan volume 0,1 ml. Setiap 1 jam volume kaki yang diinduksi karagenan diukur dengan alat plestimometer dan volume kaki tikus dicatat, dilakukan pengukuran yang sama setiap selang waktu 1 jam, dicatat perbedaan volume kaki, (dilakukan selama 6 jam). Volume awal kaki tikus diukur sebelum diberi perlakuan, dengan menggunakan pletismometer, dengan cara telapak kaki tikus yang telah ditandai sebatas mata kaki dimasukkan (sampai tanda) pada pletismometer .
5. Setelah semua mendapat perlakuan, pengukuran dilakukan lagi pada menit ke-0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 dan 300. Volume radang merupakan selisih volume kaki tikus setelah disuntik larutan karagenin 1% dengan volume kaki tikus sebelum disuntik larutan karagenin.
6. Pada menit ke-90 diberikan Na.diklofenak (obat anti inflamasi) sebagai kontrol positif, suspensi Na.CMC sebagai kontrol negatif dan ekstrak etil asetat daun tekelan diberikan secara oral yang dikelompokkan :
7. Kelompok 1 Natrium diklofenak 25 mg/kgBB
8. Kelompok 2 Na.CMC 0,5%
9. Kelompok 3 ekstrak etanol daun sintrong 50 mg/kgBB
10. Kelompok 4 ekstrak etanol daun sintrong100 mg/kgBB
11. Kelompok 5 ekstrak etanol daun sintrong 200 mg/kgBB
12. Dilakukan pengukuran setiap selang waktu 1 jam. Dicatat perbedaan volume kaki (Vt) (dilakukan selama 6 jam).
13. Hasil pengamatan dibuat dalam bentuk tabel untuk setiap kelompok. Perhitungan persentase kenaikan volume kaki dilakukan dengan membandingkannya terhadap volume awal sebelum penyuntikan karagenan.
14. Untuk setiap kelompok dihitung persentase rata-rata. Kemudian dibandingkan persentase antara kelompok yang diberi obat dengan kelompok pembanding pada waktu yang sama.
15. Perhitungan persentase radang :

% Radang =$\frac{Vt-Vo}{Vo}$x 100%

Dimana : Vt = volume kaki setelah radang

 : Vₒ = volume kaki sebelum radang

Persentase inhibisi radang untuk masing-masing tikus dihitung.

Persen inhibisi radang (%IR) = $\frac{a-b}{a}$ x 100%

Dimana : a= % rata-rata radang kelompok kontrol

b = % rata-rata kelompok perlakuan bahan pembanding