# BAB III METODE PENELITIAN

Uji Iritasi

## 3.1 Rancangan Penelitian

## Jenis penelitian adalah eksperimental. Penelitian ini meliputi pengumpulan bahan tumbuhan, pengolahan sampel, pembuatan ekstrak, karakteristik simplisia, skrining fitokimia, stabilitas sediaan*patch*, dan pengujian aktivitas sediaan*patch*antiinflamasi terhadap volume udema pada kulit punggungtikus.

### 3.1.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun laban pada sediaan*patch* dengan konsentrasi 5, 7,5, dan 10%. Variabel terikatnya adalah aktivitas sediaan *patch*antiinflamasi ekstrak etanol daun laban terhadap volume udema kulitpunggungtikus yang diukur dengan menggunakan jangka sorong digital.

**3.1.2 Parameter Penelitian**

Parameter pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Parameter uji karakteristik simplisia meliputi : maksroskopik, mikroskopik, kadar air, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, kadar abu total, dan kadar abu tidak larut asam.
2. Parameter uji metabolit sekunder simplisia dan ekstrak etanol daun laban meliputi: Alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid, triterpenoid, dan glikosida
3. Parameter uji stabilitas sediaan berupa: organoleptis, pH, keseragaman bobot, ketebalan *patch*, kelembaban *patch*, ketahanan lipatan *patch,* dan iritasi.
4. Parameter uji aktivitas antiinflamasi formulasi sediaan *patch* ekstrak etanol daun laban terhadap volume udema pada kulitpunggung tikus.

## 3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian

### 3.2.1 Jadwal Penelitian

### Penelitian dilakukan pada bulan Januari-Juni 2024

### 3.2.2 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim Nusantara (UMN) Al-Washliyah Medan.

## 3.3 Bahan dan Alat

**3.3.1 Bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu ekstrak daun laban, Etanol 96% (merck), HPMC (hebei), Propilenglikol (skc), Metil Paraben, Aquades, keragenan, salon pas, dan tikus sebagai hewan uji. Toluen (merck), kloroform (merck), raksa (ll) klorida (pudak),kalium iodida (merck),iodium (pudak), bismuth (ll) nitrat (merck), asam nitrat (merck), alfa-naftol (merck), asam klorida 2 N (merck), asam sulfat 2 N (merck), asetat anhidrida (merck), Besi (III) klorida (merck), Timbal (II) Asetat (merck). Methanol (merck), amil alkohol (merck), serbuk magnesium (merck), n- heksana (merck).

## 3.3.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu timbangan analitik (vibra), oven (b-one), tanur (b-one) ,deksikator (dianrui), rotary evaporator (ika), waterbath (memmert), jangka sorong digital (precise display), dan alat gelas lainnya.

**3.4 Determinasi Sampel**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini diidentifikasi di Laboratorium Herbarium Medanense (MEDAN), Universitas Sumatera Utara..

## 3.5 Pengumpulan dan Pengolahan Sampel

### 3.5.1 Metode Pengumpulan Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun laban yang masih segar dan berwarna hijau. Pengambilan sampel dilakukan secara purposif tanpa membandingkan tumbuhan yang sama dari daerah lain, diambil di daerah Desa Beuringin, Kecamatan Peureulak Barat, Kabupaten Aceh Timur, Provinsi Aceh.

### 3.5.2 Pengolahan Sampel

Sampel daun laban diambil kemudian dicuci dan dikeringkan selama 14 hari. Pengeringan bertujuan untuk agar simplisia tidak mudah rusak dan untuk menghidari pembusukan, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama. Daun laban yang telah kering kemudian dihaluskan hingga berbentuk serbuk dengan menggunakan blender. Semakain kecil ukuran sampel hasil penggilingan maka semakin baik, artinya luas permuakaan sampel semakin luas, dengan permukaan yang luas maka permukaan sampel (simplisia) yang bersentuhan dengan pelarut semakin luas dan dapat memecah dinding sel sehingga pelarut dapat masuk kedalam sel dan mengekstraksi kandungan kimia lebih banyak. Serbuk simplisia yang telah diperoleh sebagian dipisahkan untuk dilakakukan dengan proses ekstraksi(Azhari et al., 2022).

**3.5.3 Karakteristik Simplisia**

Identifikasi simplisia dilakukan dengan memeriksa pemerian dan melakukan pengamatan simplisia yang meliputi penetapan kadar air, penetapan kadar sari larut dalam air, penetapan kadar sari larut dalam etanol, penetapan kadar abu, dan penetapan kadar abu tidak larut dalam asam(Mayasari et al., 2018).

1. **Pemeriksaan Makroskopik**

Pemeriksaan Makroskopik dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, dan bau dari simplisia daun laban *(Vitex pinnata*L*.)* (Handayani et al., 2019)

1. **Pemeriksaan Mikroskopik**

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap serbuk simplisia daun laban (*Vitex pinnata* L*.).* Serbuk simplisia ditaburkan di atas kaca objek dan dibasahi dengan larutan kloralhidrat lalu ditutup dengan kaca penutup, kemudian di fiksasi dan diamati dibawah mikroskop (Handayani et al., 2019)

1. **Penetapan Kadar Air**

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode Azeotropi (destilasi toluen). Alat terdiri dari alas bulat 500 mL, alat penampung, pendingin, tabung penyambung, dan tabung penerima 10 mL. Langkah pertama dilakukan penjenuhan toluen. Sebanyak 200 mL toluen dan 2 mL air suling dimasukkan ke dalam labu alas bulat, dipasang alat penampung dan pendingin kemudian didestilasi selama 2 jam. Destilasi dihentikan dan dibiarkan dingin selama 30 menit, kemudian volume air dalam tabung penerima dibaca dengan ketelitian 0,05 mL. Kemudian ke dalam labu tersebut dimasukkan 5 g serbuk simplisia yang telah ditimbang seksama, labu dipanaskan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mendidih, kecepatan tetesan diatur 2 tetes untuk tiap detik sampai sebagian besar air terdestilasi, kemudian kecepatan destilasi dinaikkan sampai 4 tetes tiap detik. Setelah semua air terdestilasi, bagian dalam pendingin dibilas dengan toluen. Destilasi dilanjutkan selama 5 menit, kemudian tabung penerima dibiarkan mendingin pada suhu kamar. Setelah air dan toluene memisah sempurna, volume air dibaca dengan ketelitian 0,05 mL. Selisih kedua volume air yang dibaca sesuai dengan kandungan air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa. Syarat kadar air pada umumnya tidak lebih dari 10%. Apabila kadar air lebih besar 10% maka simplisia tersebut akan mudah ditumbuhi kapang pada saat penyimpanan(Depkes RI, 1995).

1. **Penetapan Kadar Sari Larut Air**

5 g serbuk simplisia dimaserasi dengan 100 ml kloroforom P (2,5 mL kloroforom dalam 1000 mL aquadest) selama 24 jam menggunakan labu bersumbat sambil sekali-sekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan. Disaring cepat, 20 ml filtrat diuapkan dalam cawan dangkal berdasar rata (yang telah ditara) di atas penangas air hingga kering, sisa dipanaskan pada suhu 105oC hingga bobot tetap (Depkes RI, 1979). Penetapan kadar sari larut air bertujuan untuk mengetahui kadar senyawa kimia yang bersifat polar yang terkandung didalam sampel(Depkes RI, 2000).

1. **Penetapan Kadar Sari Larut Etanol**

5 g serbuk simplisa dimaserasi dengan 100 ml etanol selama 24 jam, menggunakan labu bersumbat sambil sekali-sekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan. Disaring cepat, 20 ml filtrat diuapkan dalam cawan dangkal (Depkes RI, 1979).Penetapan kadar sari larut dalam etanol dilakukan untuk mengetahui kadar senyawa larut dalam etanol baik senyawa polar dan non polar

(Depkes RI, 2000).

1. **Penetapan Kadar Abu Total**

Sebanyak 2 g serbuk dimasukkan kedalam krus porselin yang telah dipijarkan dan ditara, diratakan. Krus dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, pijaran dilakukan pada suhu 500 - 600ºC selama 3 jam kemudian didinginkan dan ditimbang sampai diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang dikeringkan. Penetapan kadar abu total bertujuan untuk mengetahui kandungan mineral setelah pemijaran yang meliputi abu fisiologis yang berasal dari jaringan tanaman itu sendiri yang terdapat didalam simplisia yang merupakan residu dari proses pengekstraksian (Depkes RI, 1979).

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

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, didihkan dengan 25 ml asam klorida encer selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, disaring melalui kertas saring bebas abu, kemudian dicuci dengan air panas, residu dengan kertas saring dipijarkan sampai bobot tetap, kemudian didinginkan dan ditimbang. Kadar abu tidak larut asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan. Penetapan kadar abu tidak larut asam bertujuan untuk menunjukkan jumlah silikat seperti pasir dan tanah yang terdapat pada simplisia dengan cara melarutkan abu total dalam asam klorida (Depkes RI, 1979).

**3.6 Pembuatan Ekstrak Daun Laban (*Vitex pinnata* L.)**

Pembuatan ekstrak menggunakan metode maserasi yaitu dilakukan dengan cara simplisia daun laban diambil sebanyak 500 gram. Kemudian direndam simplisia menggunakan pelarut etanol 96% dengan 75 bagian (3.750 ml) dalam wadah tertutup rapat selama 5 hari terlindungi dari cahaya matahari dan sesekali diaduk kemudian disaring dan diperoleh (maserat 1), ampas yang diperoleh dibilas dengan etanol sehingga diperoleh (maserat 2), kemudian maserat 1 dan 2 digabung ditambahkan etanol hingga 5L, dan didiamkan selama 2 hari, kemudian enap tuangkan sehingga diperoleh ekstrak cair, kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator dengan menggunakan suhu 50oC sampai mendapatkan ekstrak etanol.Kemudian esktrak ini diuapkan kembali di atas waterbath hingga diperoleh ekstrak yang kental(Depkes RI, 1979).

**3.7 Pembuatan Larutan Pereaksi**

**3.7.1 Larutan Pereaksi Bouchardat**

Sebanyak 4 g kalium iodida dilarutkan dalam 20 ml air suling, kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit 2 g iodium dan dicukupkan dengan air suling hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

**3.7.2 Larutan Pereaksi Mayer**

Sebanyak 1,36 g raksa (II) klorida, dilarutkan dengan 60 ml air suling, kemudian pada wadah yang lain ditimbang sebanyak 5 g kalium iodida lalu dilarutkan dalam 10 ml air suling. Kedua larutan dicampurkan dan ditambahkan air suling hingga diperoleh larutan 100 ml(Depkes RI, 1995)

**3.7.3 Larutan Pereaksi Dragendroff**

Sebanyak 8 g bismuth (II) nitrat ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 20 ml asam nitrat pekat. Pada wadah lain ditimbang sebanyak 27,2 g kalium iodide lalu dilarutkan dalam 50 ml air suling. Kemudian kedua larutan dicampurkan dan didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan yang jernih diambil dan diencerkan dengan air suling hingga 100 ml (Depkes RI, 1995)

**3.7.4 Larutan Pereaksi Molish**

Sebanyak 3 g alfa-naftol ditambahkan beberapa tetes etanol kemudian dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N hingga 100 ml(Depkes RI, 1995).

**3.7.5 Larutan Pereaksi Asam Klorida 2 N**

Sebanyak 17 ml asam klorida pekat diencerkan dalam air suling hingga 100 ml(Depkes RI, 1995).

**3.7.6 Larutan Pereaksi Asam Sulfat 2 N**

Sebanyak 5,4 ml asam sulfat pekat diencerkan dengan air suling hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

**3.7.7 Larutan Pereaksi Liberman-Burchard**

Sebanyak 20 bagian asam asetat anhidrida dicampurkan dengan 1 bagian asam sulfat pekat(Depkes RI, 1995).

**3.7.8 Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida 1% (FeCl3)**

Sebanyak 1 g besi (III) klorida dilarutkan dengan air suling hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

**3.7.9 Larutan Pereaksi Timbal (II) Asetat 0,4 M**

Sebanyak 15,17 g timbal (II) asetat dilarutkan dalam air suling bebas karbondioksida hingga 100 ml(Depkes RI, 1995).

**3.8 Skrining Fitokimia**

**3.8.1 Pemeriksaan Alkaloida**

Sampel uji ditimbang sebanyak 0,5 g kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh dipakai untuk uji alkaloida, diambil 3 tabung reaksi, lalu kedalamnya dimasukkan 0,5 ml filtrat. Masing-masing tabung reaksi ditambahkan pereaksi yang berbeda.

1. Tabung reaksi 1: ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer
2. Tabung reaksi 2: ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat
3. Tabung reaksi 3: ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff

Alkaloid positif jika terjadi endapan atau kekeruhan pada paling sedikit dua dari tiga percobaan di atas(Depkes RI, 1979).

**3.8.2 Pemeriksaan Flavonoid**

Sebanyak 0,5 g sampel uji ditambahkan 10ml air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas, kedalam 5 ml filtrat ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium dan 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah. Flavonoida positif jika terjadi warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alcohol(Depkes RI, 1995).

**3.8.3 Pemeriksaan Saponin**

Sampel uji ditimbang sebanyak 0,5 g dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 ml air panas, dinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil dan tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1979).

**3.8.4 Pemeriksaan Tanin**

Sampel uji ditimbang sebanyak 0,5 g, dididihkan selama 3 menit dalam 10ml air suling lalu didinginkan dan disaring . larutan diambil 2 ml ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin(Depkes RI, 1995)

**3.8.5 Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid**

Sebanyak 1 g sampel uji dimaserasi selama 2 jam dengan 20 ml n-heksan, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap. Pada sisa ditambahkan beberapa tetes pereaksi Liebermann-Burchad. Timbulnya warna biru atau biru hijau menunjukkan adanya steroida, sedangkan warna merah, merah muda atau ungu menunjukkan adanya triterpenoida(Harbone, 1987).

**3.8.6** **Pemeriksaan Glikosida**

Sampel uji ditimbang sebanyak 3 g, kemudian disari dengan 30 ML campuran 7 mL bagian etanol 96% dan 3 bagian air suling ditambah dengan 10 mL HCl 2 N. Direfluks selama 30 menit, didinginkan dan disaring. Diambil 20 mL filtrat ditambahkan 25 mL air suling dan 25 ML timbal(Il) asetat 0,4 M, dikocok, lalu didiamkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat disari 20 ML campuran 3 bagian kloroform dan 2 bagian isopropanol dilakukan berulang sebanyak tiga kali, kumpulan sari air diuapkan pada temperatur tidak lebih dari 50oC. Sisanya dilarutkan dalam 2 mL metanol. Kemudian diambil 0,1 mL. Larutan percobaan dimasukkan kedalam tabung reaksi diuapkan di atas penangas air, pada sisa ditambahkan 2 ML air dan 5 tetes pereaksi molish. Kemudian secara perlahan ditambahkan 2 ML asam sulfat pekat melalui dinding tabung, jika terbentuk cincin ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya glikosida (Depkes RI, 1979).

**3.9 Pembuatan Sediaan *Patch* Ekstrak Etanol Daun Laban (*Vitex pinnata* L.)**

**3.9.1 Formula Standar*Patch*Antiinflamasi**

Formula sediaan*patch*dibuat dengan menggunakan formula dasar yang dapat dilihat pada Tabel 3.1

**Tabel3.1** Formula Standar *Patch*Antiinflamasi (Nurpriatna et al., 2024).

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Komposisi | Fungsi | Satuan | F0 | F1 | F2 | F3 |
| Ekstrak biji pepaya | Bahan aktif | g | - | 2,5 | 5 | 10 |
| Na CMC | Basis | g | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Metil paraben | Pengawet | g | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| Propilen glikol | Plasticizer | ml | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Etanol 70% | Pelarut | ml | 40 | 40 | 40 | 40 |
| Aquadest add | Pelarut | ml | 100 | 100 | 100 | 100 |

**3.9.2 Rancangan FormulaSediaan*Patch*Antiinflamasi**

Modifikasi sediaan formula sediaan *patch* antiinflmasi dengan ekstrak daun laban dapat dilihat pada Tabel 3.2

**Tabel. 3.2**Rancangan Formula Sediaan*Patch*Ekstrak Etanol Daun Laban

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Komposisi | Fungsi | Satuan | (K-) | F1 | F2 | F3 | (k+) |
| Ekstrak etanol daun laban | Bahan aktif | g | - | 5 | 7,5 | 10 | Salon pas |
| HPMC | Basis | g | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Metil paraben | Pengawet | g | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| Propilenglikol | Plasticizer | ml | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Etanol 96% | Pelarut | ml | 40 | 40 | 40 | 40 |
| Aquadest add | Pelarut | ml | 100 | 100 | 100 | 100 |

Keterangan:

K- = Kontrol negatif (basis formula sediaan *patch* antiinflamasi )

F1 = Formula sediaan *patch*antiinflamasi ekstrak etanol daun laban 5%

F2 = Formula sediaan *patch* antiinflamasi ekstrak etanol daun laban 7,5%

F3 = Formula sediaan*patch* antiinflamasi ekstrak etanol daun laban10%

K+ = Kontrol positif (salon pas)

**3.9.3 Prosedur Pembuatan Sediaan*patch***

Ekstrak etanol daun lanan dilarutkan dengan 5 ml aquadest dan 10 ml etanol (campuran 1). HPMC dikembangkan dengan aquadest panas dalam mortir di gerus sampai homogen (campuran2).Metil paraben dilarutkan dengan propilenglikol (campuran 3). Masukan campuran 1 kedalam campuran 2, gerus hingga homogen, tambahkan campuran 3 digerus kembali hingga homogen. Tambahkan etanolkedalam campuran dan tambahkan aquadest hingga 100 ml gerus homogen. Kemudian tuangkan ke dalam cawan petri sebanyak ±5gram. Masukkan kedalam oven dengan suhu 50oC selama 6 jam, jika sudah kering masukkan kedalam desikator selama kurang lebih 20 jam. Patch dapat dilepas dari cetakan dan simpan dalam wadah tertutup (Nurpriatna et al., 2024).

**3.10 Evaluasi Sediaan**

**3.10.1 Uji Organoleptis**

Pengujian organoleptis dilakukan secara visual yang meliputi bentuk, bau, warna, dan kondisi permukaan *patch* yang dihasilkan selama 24 jam (Ermawati et al., 2019).

**3.10.2 Uji pH**

*Patch* ditempatkan kedalam cawan porselen yang berisi 5 ml aquadest (pH 6,5) dan biarkan mengembang selama 2 jam pada suhu ruangan dan pH ditentukan dengan meletakkan kertas pH pada permukaan *patch*(Wardani et al., 2024)

**3.10.3 Uji Keseragaman Bobot**

Bobot patch ditimbang masing- masing 3 *patch* dalam tiap formula, kemudian ditentukan nilai bobot rata- ratanya dan %Koefisien variasi. Dapat dikatakan memenuhi syarat apabila nilai % Koefisien variasi tidak boleh lebih dari 5%(Simanullang et al., 2024).

**3.10.4 Uji Ketebalan *Patch***

Pengujian ketebalan matriks *patch* dilakukan dengan cara mengukur ketebalan matriks menggunakan jangka sorong dan dilakukan pada 3 titik yang berbeda dari masing-masing *patch* untuk mengetahui ketebalan rata-rata *patch.*Ketebalan *patch* yaitu tidak boleh lebih dari 1mm (Fuziyanti et al., 2022).

**3.10.5 Uji Kelembapan (*Moisture Content*)**

Pengujian moisture content dilakukan dengan menimbang matriks sebagai bobot awal dan dimasukkan ke dalam desikator selama 24 jam, kemudian ditimbang kembali setelah penyimpanan sebagai bobot akhir. Selisih bobot matriks sebelum dan sesudah dimasukkan ke desikator dihitung sebagai persen moisture content. Nilai rentang yang dikehendaki <10% dengan nilai persen moisture content rendah akan melindungi sediaan *patch* dari kontaminasi mikroba(Nurpriatna et al., 2024). Nilai % moisture Content dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

**3.10.6 Uji Ketahanan Lipat (*Folding Endurance*)**

Uji ketahanan lipat dilakukan secara manual dengan cara melipat *patch* berulang kali pada satu titik yang sama sampai rusak atau dilipat hingga 200 kali.(Kalsum et al., 2023).

**3.10.7 Uji Iritasi**

Uji iritasi dilakukan untuk mengetahui bahwa sediaan yang dibuat dapat menimbulkan iritasi pada kulit atau tidak. Teknik yang digunakan pada uji iritasi ini adalah tempel preventif (patch test) yaitu dengan menempelkan patch di belakang daun telinga atau di tangan pada 10 orang responden. Reaksi iritasi timbul ditandai adanya kemerahan, gatal-gatal, atau bengkak pada bagian kulit yang diberi perlakuan(Tungadi et al., 2024)

**3.11 Pembuatan Induksi Karagenan**

Keragenan 3% dibuat dengan ditimbang sebanyak 1,5 gram keragenan, lalu dimasukkan dalam labu ukur kemudian dicukupkan dengan larutan NaCl 0,9% hingga 50 ml (paputungan et al., 2022)

Keragenan dipilih karena dapat menyebabkan edema melalui tiga fase, yang pertama adalah pelepasan histamin dan serotonin yang berlangsung selama 60 menit, fase kedua adalah bradikinin yang terjadi pada 1,5 jam sampai 2,5 jam setelah diinduksi dan fase ketiga terjadi pada 3 jam setelah diinduksi terjadi pelepasan prostaglandin lalu volume udema maksimal bertahan sampai 6 jam setelah diinduksi (Karim et al., 2022).

**3.11.1 Kriteria Hewan Uji**

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih jantan dengan berat badan 150-300 gram sebanyak 25 ekor terbagi dalam 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus.Hewan yang sehat, ditandai dengan memperlihatkan gerakan yang lincah (Nurkholis et al., 2018).

**3.11.2 Penyiapan Hewan Uji**

Tikus jantan putih (*Rottus novergicus*) diadaptasikan (diaklimatisasi) selama 1 minggu agar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan baru.Tikus jantan putih (*Rottus novergicus*) diberi makan dan minum yang seragam dan dilakukan pengamatan rutin terhadap keadaan umum dan penimbangan berat badan 150-200 gram.

Pengelompokan Hewan Uji Pada percobaan ini hewan uji dikelompokkan menjadi 5 perlakuan yaitu F0, F1, F2, F3, F4 . Berdasarkan rumus federer hewan uji yang digunakan pada percobaan ini adalah sebanyak 25 tikus untuk semua perlakuan. Untuk menghindari hal yang tidak di inginkan pada hewan percobaan ditambahkan 1 ekor tikus tiap perlakuannya. Jadi jumlah hewan yang digunakan pada percobaan ini adalah sebanyak 30 tikus. Adapun jumlah hewan percobaan yang digunakan ditentukan dengan menggunakan rumus federer :

(t-1) (n-1) ≥ 15

**Keterangan :**

t = jumlah kelompok

n = jumlah subjek perkelompok

(5-1) (n-1) ≥ 15

4n-4 ≥ 15

4n ≥ 19

4, 75 = 5 ekor

Jadi jumlah subjek perkelompok yang digunakan adalah 5 (Wahyu et al., 2023)

**3.11.3 Pengujian Antiinflamasi**

1. Pada uji antiinflamasi menggunakan tikus jantansebanyak 25 ekor, tikus dikelompokkan menjadi 5 kelompok untuk tiap kelompok perlakuan. Proses pengujian hewan uji dicukur terlebih dahulu bulu punggungnya dengan pisau cukur, kemudian dioleskan Krim Veet® untuk merontokkan bulu, dibiarkan selama satu hari untuk menghindari adanya inflamasi yang disebabkan oleh pencukuran atau pemberian krim Veet®, sehingga pada saat pengujian inflamasi benar-benar berasal dari penginduksi karagenan.
2. Tikus diukur tebalkulit punggungnya menggunakan jangka sorong. Tebal kulit kemudian dicatat angka sebagai tebal awal (T0) yaitu tebalkulit punggung tikus sebelum diberi perlakuan. Masing-masing punggung Tikus diinduksikan secara subkutan dengan karagenan 3% sebanyak 0,2 ml. Satu jam setelah diinduksikan dengan karagen, setiap kelompok diberi perlakuan secara topikal.Kelompok uji dibagi dalam 5 kelompok dengan pemberian sediaan patch 2X2 cm2

Kelompok I : kontrol negative formula tanpa zat aktif

Kelompok II : diberi patch ekstrak etanol daun laban 5%

Kelompok III : diberi patch ekstrak etanol daun laban 7,5%

Kelompok IV : diberi patch ekstrak etanol daun laban 10%

Kelompok V : kontrol positif diberi salon pas

**3.11.4 Perhitungan Antiinflamasi**

Tebal kulit punggung tikus diukur kembali menggunakan jangka sorong. Perubahan tingkat pembengkakan yang terjadi dicatat sebagai tebalkulit punggung setelah perlakuan pada awal (Tt). Pengukuran dilakukan setiap 1 jam selama 6 jam. Persen penurunan udem dihitung dengan rumus:

**Keterangan:**

Tt : Tebal kulit punggung tikus tiap kelompok setelah diberi perlakuan.

T0 : Tebal kulit punggung tikus tiap kelompok sebelum diberi perlakuan apapun.

Kemudian efek antiinflamasi dievaluasi dengan cara dihitung persen inhibisi menggunakan rumus sebagai berikut dengan memasukkan data dari persen udem pada kontrol negatif dan persen udem pada kelompok perlakuan.

**Keterangan**:

KN : % udem pada kelompok kontrol negatif.

KP : % udempada kelompok perlakuan(Paputungan et al., 2022)

**3.11.5 Analisis Data**

Data hasil pengamatan dikumpulkan dan disajikan dalam bentuk tabel, grafik dan analisis statistik uji one way ANOVA (*Analysis of Variance*). Data %antiinflamasi terhadap waktu dilakukan uji Kolmogorof Smirnov untuk mengetahui data terdistribusi normal atau tidak. Levene Statistic test untuk mengetahui homogenitas variannya. Data yang telah terdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan analisi varian satu jalan (*Oneway Difference*) dengan taraf kepercayaan 95% dan dilanjutkan uji LSD (*Least Significant Difference*) untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan bermakna. Analisis data dikerjakan dengan program SPSS (Buana, 2020).