**BAB III**

**METODE PENELITIAN**

* 1. **Rancangan Penelitian**

Metode penelitian ini dilakukan secara eksperimental. Eksperimental ini merupakan percobaan dengan meliputi pengumpulan dan pengolahan sampel, karakterisasi, skrining fitokimia, pembuatan ekstrak, dan uji efek antiinflamasi ekstrak dengan metode radang

* + 1. **Variabel Penelitian**

Variabel penelitian ini adalah variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah variabel yang variasinya berpengaruh terhadap variabel lain. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak akar bajakah. Sedangkan variabel terikat adalah variabel penelitian yang diukur untuk mengetahui besarnya efek atau pengaruh dari variabel lain. Variabel terikat pada penelitian ini adalah efek antiinflamasi.

* + 1. **Parameter Penelitian**

Uji karakterisasi simplisia, Skrining Fitokimia, % Radang, % inhubusi radang.

* 1. **Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan Februari sampai dengan bulan Mei 2021 yang meliputi proses skrining fitokimia, karakterisasi simplisia, pembuatan ekstrak, dan uji antiinflamsi di Laboraturium Terpadu FMIPA Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah Medan.

* 1. **Sampel Penelitian**

Sampel yang digunakan adalah akar bajakah *(Spathollobus Littoralis Hassk)*. Yang bagian batangnya atau kayunya diambil dan dijadikan sebagai ekstrak dalam pengujian efek antiinflamasi.

* 1. **Alat dan Bahan** 
     1. **Alat Penelitian**

Alat-alat yang digunakan dalam peneltian ini adalah : Oven, tanur, timbangan, alat perkolator, alat destilasi air, blender, neraca listrik, *rotary evaporator,* aluminium foil, lumpang kayu, penangas air, spatula, kertas perkamen, spuit, pengukur waktu, selang kecil atau penyambung (sonde), plestimometer, timbangan hewan digital, kandang tikus, jarum oral, pipet tetes,dan kertas saring.

* + 1. **Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan adalah ekstrak etanol akar bajakah, etanol 96 %, (E-Merk) : kalium iodida(merck), iodium raksa (II) klorida(merck), bismuth nitrat 40%(merck), asam sitrat (pekat)(merck), akuadest, besi (III) klorida 1%, asam asestat glasial(merck), natrium hidroksida 2N (merck), kloral hidrat (merck), metanol, sebuk magnesium (merck), pewarna makanan, dan air raksa

* + 1. **Hewan Percobaan**

Hewan percobaan yang digunakan untuk uji efek antiinflamsi dari ekstrak etanol akar bajakah adalah Tikus Putih Jantan *( Rattus Novergicus )* yang telah dikondisikan selama 7 hari

* 1. **Determinasi, Pengumpulan, dan Pengolahan Sampel**
     1. **Determinasi Tumbuhan**

Determinasi terhadap tanaman akar bajakah *(Spatholobus Littoralis Hassk)* dilakukan di Herbarium Medenese (MEDA), pusat penelitian biologi, Universitas Sumatera Utara, Medan.

* + 1. **Pengumpulan Sampel**

Pengambilan akar bajakah dilakukan secara purposif , yaitu tanpa membandingkan dengan tumbuhan yang sama dari daerah kalimantan lainnya. Sampel diambil dari kota kalimantan.

* + 1. **Pengolahan Sampel**

Sampel yang digunakan adalah akar bakajah yang telah terlebih dahulu disortasi basah untuk memisahkan dari kotoran atau bahan asing lainnya, selanjutnya sampel ditiriskan lalu dikeringkan sampai benar-benar kering dan bebas air. Setelah dikeringkan kemudian ditimbang berat sampel selanjutnya sampel dihaluskan dengan menggunakan lumpang kayu maka akan diperoleh serbuk dan sisa serat kayu halus digunting kemudian di belender diperoleh masa serbuk. Sebuk yang diperoleh selanjutnya disimpan dalam wadah keing dan tertutup rapat untuk digunakan dalam pengujian.

* 1. **Pemeriksaan Karakterisasi Simplisia**

Pemeriksaan karakterisasi simplisia meliputi : pemeriksaan makroskopik, pemeriksaan mikroskopik, penetapan kadar sari larut dalam air, penetapan kadar sari larut dalam etanol, penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut dalam asam.

* + 1. **Pemeriksaan Makroskopik**

pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap batang akar bajakah *(Spatholobus Littoralis Hassk),* dengan cara memperhatikan warna, bentuk, ukuran, bau, dan rasa.

* + 1. **Pemeriksaan Mikroskopik**

**Pereaksi Kloral Hidrat**

dengan cara menimbang kloral hidrat sebanyak 50 gam dilarutkan dalam 20 ml aquadest didalam aquadest di dalam gelas ukur 100 ml (DepkesRI,1995)

pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap serbuk simplisia akar bajakah *(Spatholobus Littoralis Hassk)*, dengan cara serbuk simplisia ditaburkan atas objek glass yang telah ditetesi dengan kloral hidrat dan ditutupi dengan *deck glass*, kemudian diamati dibawah mikroskop

* + 1. **Penetapan Kadar Air**

Tujuan penetapan kadar air adalah untuk mengetahui kadar air dalam serbuk simplisia akar bajakah agar memenuhi persyaratan mutu simplisia dan tahan lama serta tidak mudah ditumbuhi oleh bakteri dan jamur karena air merupakan media yang tidak baik untuk pertumbuhan bakteri dan jamur.

Kedalam labu alas bulat dimasukan 200 ml toluen dan 2 ml air suling, lalu didestilasi selama 2 jam, biarkan sampai dingin selama 30 menit, selanjutnya volume air dalam tabung penampung dibaca. Selanjutnya kedalam labu dimasukan 5 gram serbuk simplisia yang telah ditimbang seksama, lalu dipanaskan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mendidih, kecepatan tetesan diatur 2 tetes tiap detik hingga sebagian air tesuling, kemudian kecepatan penyulingan dinaikan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendinginan dibilas dengan toluen. Destilasi dilanjutkan selama 5 menit, kemudian tabung penerima dibiarkan menjadi dingin sampai suhu kamar, setelah air dan toluen memisahkan sempurna volume dibaca dengan ketelitian 0,005 ml. Selisih kedua volume air yang dibaca sesuai dengan kandungan air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa. Kadar air dihitung dalam persen (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Air**

Tujuan penetapan kadar sari larut dalam air dilakukan untuk mengetahui zat aktif (sari) yang larut dalam pelarut air, senyawa-senyawa larut dalam air adalah glikosida, gula, gom, protein, enzim, zat warna, dan asam organik.

Ditimbang 5 gram serbuk simplisia dimaserasi selama 24 jam dalam 100 ml air-kloroform (2,5 kloroform dalam air suling sampai 1 liter) dalam labu bersumbat sambil dikocok sesekali selama 6 jam pertama, kemudian biarkan selama 18 jam kemudian disaring, sejumlah 20 ml filtrat pertama diuarkan sampai kering dalam cawan penguap yang berdasar rata yang telah dipanaskan pada suhu 105o C sampai bobot tetap. Kadar dalam persen sari yang larut dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Etanol**

Tujuan penetapan kadar sari larut dalam etanol untuk mengetahui zat aktif yang larut dalm pelarut etanol, senyawa-senyawa larut dalam etanol adalah glikosida, antrakuinon, steroid flavonoid, klorofil dan dalam jumlah sedikit larut lemak dan saponin.

Ditimbang 5,0 gram serbuk simplisia yang telah dikeringkan, lalu di maserasi selama 24 jam dalam 100 ml etanol 96% dalam labu tersumbat sambil dikocok berkali-kali selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring 20 ml filtrat, dan diuapkan sampai kering dalam cawan dangkal dan memiliki dasar rata yang ditara dan sisinya dipanaskan pada suhu 105o C sampai bobot tetap. Kadar sari larut dalam etanol dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Penetapan Kadar Abu Total**

Tujuan penetapan kadar abu untuk mengetahui kadar senyawa logam pada serbuk akar bajakah seperti : logam K (Kalsium), Ca ( Calsium), Na (Natrium), Pb (Timbal), Hg (Raksa).

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia yang ditimbang seksama, dimasukan dalam krus porselin yang telah dipijar dan ditara, lalu diratakan krus porselin dipijar pada suhu 600oC sampai arag habis, didinginkan, dan ditimbang sampai diperoleh bobot tetap, kadar abu dhitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1995).

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

Tujuan penetapan kadar abu tidak larut dalam asam untuk mengetahui senyawa silika yang terdapat di tanah dan pasir pada serbuk akar bajakah.

Cara kerja :

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total ditambahkan dengan 25 ml asam klorida 2N dan didihkan selama 5 menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu,kemudian dicuci dengan air panas.

Residu dan kertas saring yang dipanaskan pada suhu 600OC sampai bobot tetap kemudian didinginkan dan ditimbang. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara. (Depkes RI, 1995).

* 1. **Pembuatan Ekstrak**

Pembutan ekstrak dari serbuk kering simplisia dilakukan dengan cara perkolasi menggunakan pelarut etanol (pa). Sebanyak 10 bagian serbuk simplisia dibasahi dengan 2,5 bagian sampai 5 bagian cairan penyari, lalu dimasukkan kedalam bejana tertutup sekurang-kurangnya selama 3 jam. (FI, 2014)

Selanjutnya masa dipindahkan sedikit demi sedikit ke dalam perkolator sambil ditekan hati-hati, dituangi dengan cairan penyari secukupnya sampai cairan mulai menetes dan diatas simplisia masih terdapat selapis cairan penyari. Lalu perkolator ditutup dan dibiarkan selama 24 jam. biarkan cairan penyari menetes dengan kecepatan 1 ml per menit, cairan penyari berulang-ulang ditambahkan secukupnya hingga selalu terdapat selapis cairan penyari secukupnya di atas simplisia. Hingga diperoleh 80 bagian perkolat peras massa campurkan cairan perasan kedalam perkolat.

Perkolasi dihentikan hingga beberapa tetes perkolat yang terakhir tidak berwarna lagi. Perkolat yang diperoleh dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* suhu tidak lebih 500C (Anief, 2000).

* 1. **Skrining Fitokimia Akar Bajakah**

Skrining fitokimia adalah untuk mengetahui golongan senyawa kimia pada ekstrak etanol akar bajakah meliputi pemeriksaan senyawa golongan flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, dam steroid/triterpenoid (Ditjen POM,1989)

* + 1. **Pemeriksaan Alkaloid**

**Larutan Pereaksi Asam Klorida 2N**

Dipipet asam klorida pekat sebanyak 19,71 ml dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 ml lalu diencerkan dengan aquadest sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

**Larutan Preaksi Bouchardat**

Dilarutkan 2 gram iodium p dan 4 gram kalium iodida p dalam air secukupnya 100 ml (Depkes RI, 1995)

**Larutan Pereaksi Dragendrof**

Dicampur 20 ml bismuth nitrat p dengan 50 ml larutan kalium iodida P 54,4% b/v, diamkan sampai memisah sempurna. Ambil larutan jernih dan encerkan dengan air secukupnya 100 ml. (Depkes RI,1995)

**Larutan Pereaksi Mayer**

1. **Pembuatan Pereaksi**

Ditimbang raksa (II) klorida sebanyak 1,35 gram dilarutkan dengan 60 ml akuades di dalam gelas ukur 100 ml. Pada wadah lain dilarutkan 5 gram kalium iodida dalam 10 ml aquades. Kedua larutan dicampurkan dalam labu ukur 100 ml, lalu diencerkan dengan aquades sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

Serbuk simplisia ditimbang masing-masing sebanyak 0,5 gram, kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml air suling, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat dipakai untuk tes alkaloida sebagai berikut:

1. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Mayer, reaksi positif 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 hitam.
3. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi

Dragendroff, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah atau jingga.

Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau kekeruhan sedikitnya 2 reaksi dari 3 percobaan diatas (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Pemeriksaan Flavonoid**

1. **Larutan Pereaksi Asam Klorida 2N**

Dipipet asam klorida pekat sebanyak 19,71 ml dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 ml lalu diencerkan dengan aquadest sampai garis tanda (Depkes RI,1995).

Sebanyak 10 gram serbuk simplisia ditimbang kemudian ditambahkan 100 ml air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas. Ke dalam 5 ml filtrat ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium,1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Adanya flavonoid ditunjukan dengan timbulnya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Pemeriksaan Saponin**

1. **Larutan Pereaksi Asam Klorida 2N**

Dipipet asam klorida pekat sebanyak 19,71 ml dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 ml lalu diencerkan dengan aquadest sampai garis tanda (Depkes RI,1995).

Sebanyak 0,5 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam 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 2N menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Pemeriksaan Tanin**

1. **Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida 1%**

Ditimbang besi (III) klorida sebanyak 1 gram kemudian dilarutkan dengan aquades dalam labu ukur 100 ml sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

Sebanyak 0.5 gram serbuk simplisia disari 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, 1995).

* + 1. **Pemeriksaan Steroid-Terpenoid**

1. **Larutan Pereaksi Lieberman-Burchard**

Pemeriksaan asam asetat anhidrat sebanyak 20 ml dicampurkan dengan 1 ml asam sulfat pekat dalam gelas ukur ( Depkes RI, 1995).

Sebanyak 1 gram serbuk simplisia di maserasi dalam 20 ml n-Heksan selama 2 jam kemudian disaring filtrat 5 ml diuapkan dalam cawan penguap sampai kering. Kedalam residu ditambahkan 20 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat ( peraksi lieberman dan bouchardat). Terbentuk warna ungu atau merah yang berubah menjadi biru hijau menunjukan adanya steroid/triterpenoid (Harbone, 1987).

* 1. **Pengujian Farmakologi** 
     1. **Penyiapan Hewan Percobaan**

Hewan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih jantan yang sehat sebanyak 25 ekor dengan berat badan 150-200 gram yang dibagi menjadi 5 bagian perlakuan dimana setiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Sebelum perlakuan, hewan percobaan dipelihara terlebih dahulu dalam kandang. Tikus diberi makan pellet, jagung dan air minum, tikus diadaptasi selama dua minggu, kemudian setelah itu digunakan untuk percobaan (Guyton dan Hall,1997)

Rumus federal : (n-1) (t-1)≥15

(n-1) (t-1)≥15

(n-1) (5-1)≥15

(n-1) 4≥15

4n – 4 ≥ 15

4n ≥ 19

n ≥ 4,75 = 5

* + 1. **Pembuatan Induktor Radang**

Karagenan ditimbang sebanyak 100 mg, kemudian dimasukan kedalam labu tentukur 10 ml, dicukupkan dengan larutan NaCl kemudian dibiarkan 24 jam.

* + 1. **Pembuatan Suspensi CMC 0,5% Sebagai Kontrol**

Ditimbang CMC sebanyak 500 mg kemudian ditaburkan di dalam lumpang yang berisi air suling panas sebanyak 1/3 bagian dari bagian air, di diamkan selama 30 menit sampai mengembang bentuk gel. Kemudian digerus kuat hingga diperoleh massa yang transparan, diencerkan dengan sedikit air suling. Ditambahkan air suling 50 ml, kemudian dihomogenkan dengan cara di kocok lalu dipindahkan ke botol.

* + 1. **Pembuatan Suspensi Ekstrak Etanol Akar Bajakah**

Dalam pengujian ini akan digunakan 3 variasi dosis yakni dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 300 mg/kgBB. Dibuat suspensi akar bajakah 2% ekstrak dimasukan kedalam lumpang, kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit suspensi CMC 0,5%, gerus kembali lalu dimasukan kedalam labu tentukur dan dicelupkan volumenya sampai 100 ml

* + 1. **Pembuatan Suspensi Natrium Diklofenak 1%**

Dalam pengujian obat digunakan dosis 100 mg/kgBB. Dibuat suspensi natrium diklofenak 1% 10 mg/ml dimasukan kedalam lumpang, kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit suspensi CMC 0,5%, gerus kembali lalu diamasukan ke dalam labu tentukur dan tambahkan volume 100ml.

* 1. **Prosedur Pengujian Antiinflamasi**

1. Tikus di puasakan 18 jam sebelum pengujian, air minum tetap diberikan
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 pemgukuran di periksa tinggi cairan pada alat dan dicatat sebelum dan sesudah pengukuran
4. Tikus diberi suspensi karagenan 1% secara intraplantar pada telapak kaki kiri dengan volume 0,1 ml
5. Setiap 1 jam volume kaki yang di induksi karagean di ukur dengan alat plestimometer dan volume kaki tikus dicatat, dilakukan pengukuran yang sama di setiap selang waktu 1 jam. Dicatat perbedaan volume kaki. (dilakukan selama 6 jam).
6. Pada menit ke -90 berikan Natrium diklofenak (obat antiinflamsi) sebagai kontrol positif, suspensi CMC sebagai kontrol negatif, ekstrak, dan obat secara oral yang di kelompokan :
7. Kelompok 1 CMC 0,5%
8. Kelompok 2 suspensi natrium diklofenak 1%
9. Kelompok 3 pemberian dosis ekstrak 100 mg/kgBB
10. Kelompok 4 pemberian dosis ekstrak 200 mg/kgBB
11. Kelompok 5 pemberian dosis ekstrak 300 mg/kgBB
12. Dilakukkan pengukuran pada setiap selang waktu 1 jam. Di catat 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.

Pengukuran dilakukan selama 6 jam (30 menit, 60 menit, 90 menit, 120 menit, 180 menit, 240 menit 300 menit, 360 menit). Dan tiap kali pengukuran larutan sel tetap dicukupkan sampai garis tanda atau garis merah bagian atas sel dan pada menu utama monitor ditekan tombol nol, dan kaki kiri tikus dikeringkan sebelumnya (Parmar dan Prakash, 2006).

Volume radang adalah selisih volume telapak kaki tikus setelah dan sebelum disuntikkan karagenan. Pada waktu pengukuran, volume cairan harus sama setiap kali pengukuran, tanda batas pada kaki tikus harus jelas, kaki tikus harus tercelup sampai batas yang dibuat.

* 1. **Perhitungan Persen Radang dan Persen Inhibisi Radang**

Persen radang dapat dihitung dengan rumus di bawah ini (Mansjoer, 2003): Persen Radang (% R) = × 100%

Keterangan :

Vt = Volume radang setelah waktu t

Vo = Volume awal kaki tikus

Persen inhibisi radang dapat dihitung dengan rumus di bawah ini:

Persen inhibisi radang (% IR) = × 100%

Keterangan :

a = persen radang rata – rata kelompok kontrol

b = persen radang rata – rata kelompok perlakuan bahan uji atau obat pembanding

* 1. **Analisis Data**

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan program SPSS 20 yaitu menggunakan analisis variansi (ANOVA) dengan tingkat kepercayaan 95% dilanjutkan dengan uji beda rata-rata Tukey untuk mengetahui kelompok mana yang mempunyai pengaruh sama atau berbeda secara signifikan dengan obat pembanding.