

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi ialah obyek yang menjadi sasaran riset. Populasi yang dimanfaatkan pada penelitian ialah daun sungkai (*Peronema canescens*) yang didapatkan dari daerah Kota Palangka Raya, Kalimantan Tengah.

2. Sampel

Sampel ialah unit dari populasi dengan karakteristik yang telah ditentukan dan dapat mewakili populasi pada penelitian. Sampel pada penelitian ini yaitu daun sungkai yang dipetik secara acak dari tanaman sungkai yang tidak terlalu tua, tidak busuk, berwarna hijau, bebas dari hama atau dalam kondisi baik. Pengambilan sampel dilaksanakan pada bulan februari 2023

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel pertama penelitian ialah serbuk ekstrak daun sungkai (*Peronema canescens*). Variabel kedua ialah jumlah leukosit, persentase jenis sel leukosit dan aktivitas fagosit makrofag. Variabel ketiga penelitian ialah melihat variasi dosis ekstrak, yang digavage pada mencit.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang sudah diidentifikasi bisa dikategorikan kedalam bermacam variabel, diantaranya :

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja diubah- ubah agar dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel dalam penelitian ini adalah ekstrak daun sungkai (*Peronema canescens*) dengan berbagaidosis.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung hingga diperlukan kualifikasi agar hasil yang didapat tidak tersebar serta dapat diulang oleh penelitian lain secara tepat. Variabel dalam penelitian ini adalah daun sungkai, pemilihan hewan uji mencit, peralatan yang digunakan, laboratorium, dan prosedur jalannya penelitian.

Variabel tergantung ialah hasil dari variabel utama. Variabel dalam penelitian ini adalah potensi ekstrak etanol daun sungkai sebagai

imunostimulan, yang digavage pada mencit dengan melihat jumlah sel leukosit, persentase jenis sel leukosit yang terdiri dari monosit, limfosit dan neutrofil dan melihat aktivitas fagosit makrofag dengan metode bersihan karbon.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, Daun sungkai (*Peronema canescens*) ialah daun yang masih segar, tidak rusak, berwarna ungu kemerahan hingga hijau didapat dari kota Palangka Raya, Kalimantan Tengah.

Kedua, Serbuk daun sungkai adalah serbuk yang dibuat dari daun sungkai yang diambil, dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel, dikeringkan, dan digiling halus sebelum diayak dengan ayakan mesh 60.

Ketiga, Ekstrak etanol daun sungkai adalah ekstrak kental yang dibuat setelah serbuk daun sungkai dimaserasi dengan pelarut etanol 96%.

Keempat, Leukosit adalah sel darah putih yang berperan melindungi tubuh dari infeksi penyebab penyakit.

Kelima, Persentase jenis sel leukosit adalah hasil akhir dalam bentuk persen dari perhitungan jumlah jenis sel leukosit yang terdiri dari neutrofil, monosit dan limfosit.

Keenam, Pengujian imunostimulan adalah pengujian yang dilakukan secara *in vivo* dengan perlakuan satu kali *gavage*, pada siang hari, dengan rentang waktu 1 hari serta berbagai kelompok perlakuan.

Ketujuh, Dosis efektif adalah dosis obat yang memiliki pengaruh nilai dengan metode dan cara tertentu yang berhasil mendatangkan hasil akhir sesuai target.

Kedelapan, Metode bersihan karbon digunakan untuk menguji sistem imunnon spesifik secara cepat.

Kesembilan, Aktivitas ekstrak etanol daun sungkai sebagai imunomodulator dilihat dari peningkatan indeks fagositosis, total sel leukosit dan persentase jenis sel leukosit.

Kesepuluh, Total sel leukosit adalah jumlah sel leukosit yang terukur oleh alat haemocytometer.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan meliputi tempat untuk melakukan maserasi atau bejana, evaporator, corong, timbangan analitik,

pengaduk, blender, pipet tetes, pipet pengencer, gelas kimia, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tissue gulung, kertas saring, erlenmeyer, *water bath*, corong pemisah, corong kecil, 1 set alat gavage, jarum suntik no 25, pipet haemocytometer, cover glass, kamar hitung, mikroskop, mikropipet, gelas ukur, labu ukur, kertas koran, ayakan nomor 60, timbangan hewan, kandang hewan, spektrofotometer UV-Vis, *stopwatch*, gunting bedah.

2. Bahan

Bahan yang digunakan meliputi daun sungkai, suplemen herbal, etanol 96 %, alkohol, aquades, larutan Turk sebagai reagensia, Na EDTA, larutan NaCl 0,9% fisiologis, tinta cina (*Yamura*), Na CMC, HCl pekat, Mg, FeCl₃, Liberman Burchard, HCl 2%, Mayer dan Dragendorff.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Dengan menggabungkan ciri-ciri makroskopis tanaman dengan sampel daun sungkai, determinasi tanaman digunakan untuk membuktikan dan memastikan kebenaran sampel. Dilakukan kepustakaannya oleh UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Kota Batu, Jawa Timur.

2. Pengambilan bahan

Aktivitas berupa pengambilan bahan yang digunakan yaitu daun sungkai, diambil daun sungkai yang masih segar berwarna hijau segar dari pohonnya sebanyak ± 10 kg di wilayah kota Palangka Raya, Kalimantan Tengah.

3. Pembuatan serbuk

Sebelum digunakan untuk membuat serbuk daun sungkai, daun harus dibersihkan dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan debu. Setelah itu menjemur daun yang terlindung dari sinar matahari sampai daun layu dan rapuh. Langkah selanjutnya pembuatan serbuk dengan menggunakan alat grinding dan diayak dengan mesh nomor 60 untuk mendapatkan serbuk daun sungkai dengan tingkat kehalusan yang relatif seragam, kemudian daun sungkai kering ditimbang. Berat serbuk diukur, dan hasilnya kemudian disimpan di tempat yang gelap dan tertutup (Kemenkes RI, 2009). Tujuan produksi serbuk adalah untuk memperluas partikel material yang bersentuhan dengan larutan filter hingga terjadi filtrasi yang efisien (Depkes RI, 2008).

4. Pembuatan ekstrak

Metode maserasi digunakan untuk membuat ekstrak daun sungkai. Memasukkan serbuk daun sungkai dan etanol 96 % ke dalam maserator dengan perbandingan 1:10, direndam dalam wadah tertutup dalam waktu 2 hari dan terlindungi dari cahaya, sesekali diaduk, lalu menyaring menggunakan kain flanel. Setelah itu menyaring kembali dengan kertas saring yang ditambahkan etanol 96% setengah dari jumlah pelarut pada penyarian pertama dan didapatkan ekstrak cair. Setelah itu dipekatkan menggunakan evaporator untuk menghasilkan ekstrak kental (FHI, 2017), dan ekstrak kental disimpan di tempat gelap menggunakan penangas air. Kemudian ekstrak dihitung rendemennya.

5. Penetapan kadar air serbuk

Penetapan kadar air dengan cara destilasi toluene. Toluene yang digunakan dijenuhkan dengan air terlebih dahulu, setelah dikocok didiamkan, kedua lapisan air dan toluene akan memisah, lapisan air dibuang. Kemudian ditimbang serbuk sebanyak 20 gram dan dimasukkan kedalam labu alas bulat dan ditambahkan toluene yang telah dijenuhkan dengan air. Labu tadi dipanaskan selama 15 menit, setelah toluene mendidih, penyulingan diatur 2tetes/detik dan 4 tetes/detik secara berurutan. Setelah semua air tersuling, pemanasan dilanjutkan selama 5 menit. Membiarkan tabung penerima dalam keadaan dingin mencapai suhu kamar. Volume air dibaca sesudah toluene dan air memisah sempurna (Depkes RI.,2008).

Proses akhir aktivitas ini yaitu menghitung persentase kadar air, menentukan kadar air sesuai persyaratan dengan nilai <10%.

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume air (ml)}}{\text{Bobot sampel}} \times 100\%$$

6. Susut pengeringan ekstrak

Batas maksimum (kisaran) senyawa yang hilang selama pengeringan ditunjukkan dengan penyusutan pengeringan. Selama tiga puluh menit, kurs porselen dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C. Kemudian didinginkan dalam desikator, dan berat di bawahnya diukur (w0). Timbang ekstrak sebanyak 1-2 gram ke dalam krus (w1). Dengan mengocok perlahan wadah, ekstrak tersebut kemudian didistribusikan secara merata. Membuka tutup krus dan masukkan ke dalam oven. Panaskan selama satu jam pada suhu 105 derajat Celcius, dinginkan

dalam desikator, dan timbang sekali lagi. Perlakuan di atas harus diulang sampai tercapai bobot konstan. Hasil penimbangan dicatat, dan kerugian pengeringan ditentukan dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Susut Pengeringan} = \frac{(w1-w0)-(w2-w0)}{w1-w0} \times 100\%$$

Keterangan :

w0 = Bobot krus kosong (g)

w1 = Bobot krus + sampel sebelum dipanaskan (g)

w2 = Bobot krus + sampel setelah dipanaskan (g)

7. Skrining fitokimia ekstrak

7.1 Uji flavonoid. Mengambil sedikit ekstrak daun sungkai berbahan dasar etanol dan campurkan dengan sedikit HCl pekat, amil alkohol, dan serbuk Mg. Kocok campuran dengan cepat dan biarkan komponen terpisah. Lapisan amil alkohol akan berwarna merah, kuning, atau jingga jika reaksi berhasil. Flavon berkisar dari jingga hingga merah, flavonol dari merah hingga merah tua, dan flavonon dari merah tua hingga magenta (Harbone, 2006).

7.2 Uji tanin. Ekstrak daun sungkai ditambahkan ke dalam tabung reaksi dilakukan penambahan 10 ml aquades kemudian dididihkan. Setelah dingin dilakukan penambahan 1-2 tetes reagen besi (III) klorida 1% untuk pengujian. Tanin terjadi jika terdapat transformasi warna filtrat menjadi hijau kehitaman (tanin katekol) atau biru kehitaman (tannin galat) (Harbone, 2006).

7.3 Uji alkaloid. Pengujian dilaksanakan dengan cara ekstrak daun sungkai ditambahkan beberapa tetes HCl 2N serta aquadest. Hasil pencampuran tersebut dipanaskan diatas waterbath selama 2 menit lalu dibiarkan dingin kemudian disaring. Pindahkan masing-masing 3 tetes filtrat, lalu tambahkan 2 tetes Reagent Mayer, adanya alkaloid berupa endapan warna kuning. 2 tetes Reagent Bouchardat, kemunculan alkaloid berupa endapan (Fansworth, 1966).

7.4 Uji terpenoid/steroid. Pengujian dengan cara memasukan ekstrak daun sungkai pada tabung reaksi dan menambahkan asam asetat anhidrat sebanyak 2 tetes selanjutnya dicampur 1 tetes asam sulfat pekat. Steroid muncul jika terdapat perubahan warna hijau-biru, sedangkan triterpenoid jika terdapat transformasi warna merah atau merah keunguan (Fansworth, 1966).

7.5 Uji saponin. Untuk melakukan pengujian, ekstrak daun sungkai dicampur dengan air panas ke dalam tabung reaksi.

Selanjutnya, tabung uji dibiarkan dingin sebelum dikocok dengan kuat selama sepuluh detik. Ini menyebabkan pembentukan buih yang bertahan selama setidaknya sepuluh menit dan memiliki tinggi antara 1-10 cm. Busa tetap ada setelah penambahan bahkan 1 tetes HCL 2N (Depkes RI, 1980).

8. Penyediaan dan pemeliharaan hewan uji

Mencit jantan Swiss Webster yang sehat dan normal, berumur 7 hingga 8 minggu dan beratnya sekitar 30 gram, digunakan sebagai hewan uji. Mencit ini berasal dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta. Kandang mencit dibuat dari baki plastik berlapis kawat yang disikat kawat untuk mencegah penumpukan kelembapan. Di rak terbuka, ada kandang tikus yang ditata. Mencit-mencit itu dibiasakan di ruang penelitian selama kurang lebih seminggu sebelum perawatan agar terbiasa. Mencit diberi makan pelet standar dan dibiarkan minum secukupnya.

9. Pembuatan sediaan

9.1 Pembuatan suspensi suplemen herbal. Dalam penelitian ini, suplemen dengan dosis 0,065 g digunakan. Tambahkan 0,5 g CMC Na ke dalam mortar berisi 10 ml air panas, timbang, dan tunggu hingga mengembang. Setelah itu ditambahkan 0,33 mg serbuk suplemen herbal sambil CMC Na diaduk terus. Selain itu, dicampur terus menerus hingga homogen dan terbentuk massa yang kental, kemudian, pada saat itu, tambahkan air sulingan hingga volume yang ideal.

9.2 Pembuatan suspensi ekstrak etanol daun sungkai. Untuk penelitian ini, suspensi ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens*) dibuat dalam dosis 50 mg/kgBB, 75 mg/kgBB, dan 100 mg/kgBB. Timbang 0,5 g CMC Na dan tambahkan ke dalam mortar berisi 10 mililiter air panas. Tunggu hingga mengembang. Setelah itu, CMC Na terus diaduk, dan dosis etanol yang diekstraksi dari daun Sungkai ditambahkan. Selain itu, dicampur terus menerus hingga homogen dan terbentuk massa yang kental, kemudian, pada saat itu, tambahkan air sulingan hingga volume yang ideal.

9.3 Pembuatan suspensi karbon. Sebanyak 1,6 g tinta cina yang telah dikeringkan, disuspensikan dengan Na CMC 0,5% (b/v) dalam 25 ml larutan natrium klorida fisiologis 0,9 % hingga diperoleh konsentrasi 64 mg/ml (6,4%). Proses ini digunakan untuk membuat suspensi karbon (Aldi *et al.*, 2016).

10. Pembuatan kurva baku karbon

Tinta cina yang telah dikeringkan dan ditimbang sebanyak 25 mg sebelum dicampur dengan 25 ml asam asetat 1% hingga mencapai konsentrasi 1000 ppm. Larutan dipipet dengan porsi 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, dan 0,6 ml, kemudian ditambahkan asam asetat 1% hingga volume 10 ml. Dengan cara ini, kadar karbon diperoleh 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm. Setelah memipet 4 mililiter dari masing-masing kadar tersebut, ditambahkan 25 mikroliter darah mencit yang sebelumnya telah ditampung pada tube yang berisi Na EDTA. Gunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengukur adsorben dalam kisaran 500 hingga 800 nm setelah homogenisasi. Kurva kalibrasi dibuat dari plot adsorben yang mengandung karbon yang diperoleh. Hanya darah tikus dan aquadest yang digunakan untuk blanko.

11. Perlakuan ekstrak etanol daun sungkai dengan metode bersihan karbon

Pada uji *in vivo*, 25 ekor mencit putih galur swiss Webster (*Mus musculus*) jantan dipisahkan menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu: kontrol positif 6,5 mg/Kg BB, mencit kontrol negatif diberi Na CMC 0,5%, dan kelompok perlakuan diberi ekstrak etanol daun Sungkai 50 mg/KgBB, 75 mg/KgBB, dan 100 mg/KgBB. Menggunakan sonde lambung untuk mencit, perawatan diberikan secara oral. perlakuan satu kali sehari selama 24 jam. Pada hari kedelapan sebelum penyuspensian karbon, darah diambil melalui intravena dan ditampung dalam tube yang berisi Na EDTA. Kemudian, 25 mikroliter darah diambil dan ditambahkan 1% asam asetat, sampel divorteks untuk memungkinkan sel darah lisis. Pada menit 0, darah ini digunakan sebagai blanko. Setelah itu, suspensi karbon diinjeksikan secara intravena dan pengambilan darah kembali dilakukan pada menit kelima dan lima belas, dengan prosedur yang sama dilakukan pada blanko. Selanjutnya, serapannya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis.

12. Penentuan nilai indeks fagositosis

Pengambilan darah yang telah dilakukan sebanyak dua kali, diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 636 nm untuk mendapatkan nilai absorbansi. Nilai absorbansi ini digunakan untuk menghitung konstanta fagositosis dengan rumus $\ln OD_1$ dikurang $\ln OD_2$ yang kemudian dibagi waktu pengambilan sampel darah. Nilai konstanta fagositosis telah didapatkan, kemudian menghitung nilai indeks fagositosis untuk mengetahui kecepatan pembersihan karbon yang diberikan sediaan uji

dibandingkan dengan hewan coba pada kelompok kontrol. Nilai indeks fagositosis dihitung menggunakan rumus nilai konstanta fagositosis mencit yang sudah diberi perlakuan dan sudah ditetapkan harga konstantanya dibagi dengan nilai konstanta mencit kontrol negatif.

13. Penentuan total sel leukosit dengan *haemocytometer*

Dalam menghitung jumlah keping darah putih (leukosit) tidak memerlukan darah dalam jumlah yang berlebihan. Malole (1989) menyatakan bahwa sayatan pada ujung ekor dapat mengambil sedikit darah. Untuk diferensiasi darah, ini biasanya dilakukan satu kali.

Sampel darah leukosit diambil dengan menggunakan kaca penutup yang telah disiapkan dan ruang hitung. Setelah itu, mata ditusuk untuk diambil darahnya. Area yang akan diambil darahnya perlu dibersihkan dengan disinfektan. Setelah tanda mencapai 0,5, darah ditarik ke dalam pipet *hemocytometer*. Bekerjalah dengan cepat untuk mencegah darah menggumpal di dalam pipet. Larutan Turk digunakan untuk mengencerkan darah dengan pipet hingga tanda 101. Larutan Turk dan darah dikocok bersama hingga membentuk angka 8 dan kemudian didiamkan selama lima menit. Hemositometer menguji larutan dalam pipet. Untuk membiarkan leukosit mengendap, ruang hitung dibiarkan tanpa pengawasan selama 2 sampai 3 menit. Dilakukan pengamatan perbesaran 40X. Empat bidang di luar kotak hitung leukosit, masing-masing dengan luas $1 \times 1 \text{ mm}^2$, adalah tempat dilakukannya hitung leukosit.

14. Penentuan persentase jenis sel leukosit

Penentuan persentase jenis sel leukosit ini dengan cara membuat preparat apusan darah dengan obyek gelas terlebih dahulu. Untuk memeriksa darah yang ada, tangkai gelas atau pipet sempit digunakan untuk mengambil sedikit tetes darah di dekat tepi gelas. Kemudian, kaca penutup diletakkan di atas kaca objek utama, sehingga darah menyebar di antara kedua kaca. Selanjutnya, kaca penutup diusap dengan cara yang sama, menariknya ke samping. Apusan darah dilepaskan dan dikeringkan di udara. Setelah kering, sampel darah difiksasi dengan metanol selama lima menit sebelum dikeringkan. Selain itu, apusan darah diwarnai dengan Giemsa 10% selama 60 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dengan posisi diagonal dan dikeringkan di udara.

Menggunakan minyak emersi, preparat ulas darah yang telah diwarnai diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000X. Noda darah dilihat di bawah mikroskop setelah diendam dalam minyak

dan diperbesar dengan 1000X. Jumlah limfosit, neutrofil, dan monosit dalam seratus leukosit dihitung dengan penghitung darah. Setiap jenis leukosit dapat diidentifikasi melalui ukuran, warna, granulasi sitoplasma, bentuk kromatin, jumlah inti, dan bentuk inti. Nilai absolut leukosit dapat dihitung dengan mengalikan nilai relatif dengan jumlah leukosit (Sastradipraja et al. 1989).

Perhitungan jenis sel leukosit dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Persentase sel leukosit} = \frac{n}{t} \times 100\%$$

Keterangan :

n : jumlah sel eosinofil/neutrophil batang/neutrophil segmen/limfosit/monosit

t : waktu yang diperlukan untuk menentukan setelah menit ke 20

E. Analisis Hasil

Indeks fagositosis, total sel dan jenis sel leukosit merupakan beberapa hasil pengujian dari berbagai parameter yang dianalisis dengan menggunakan program SPSS (*Statistical and Product Service Solution*) versi 12. Dalam analisis data ini, normalitas data masing-masing variabel ditetapkan terlebih dahulu, kemudian digunakan *One Way ANOVA* untuk analisis statistik. Uji ANOVA berusaha untuk menentukan apakah hasilnya signifikan ($P \leq 0,05$). Analisis dilanjutkan dengan uji *Tukey* jika nilai F hitung lebih besar dari F tabel pada tingkat kepercayaan 95%, yang bertujuan untuk mengetahui signifikansi perbedaan hasil setiap kelompok perlakuan.