

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah objek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sukun (*Artocarpus altilis*) yang diperoleh dari Desa Sembungharjo, Kecamatan Pulokulon, Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil yang dilaksanakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sukun (*Artocarpus altilis*) yang diperoleh dari Desa Sembungharjo, Kecamatan Pulokulon, Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*), yang diperoleh melalui proses maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah dosis efektif ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*), yang diberikan kepada mencit dengan metode *carbon clearance*

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini meliputi :

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas adalah variabel yang secara sengaja dimodifikasi untuk melihat bagaimana pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Dalam penelitian ini, variabel bebas yang dimaksud adalah dosis ekstrak etanol dari daun sukun (*Artocarpus altilis*).

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung adalah variabel yang terpengaruh oleh variabel bebas, sehingga menjadi parameter dalam penelitian. Dalam penelitian ini, variabel tergantung yang diamati adalah aktivitas omunosupresan dari variasi dosis dengan parameter induksi fagositosis . perhitungan jumlah total leukosit dan organ limpa

2.3 Variabel terkendali. Variabel terkendali adalah variabel yang dapat memengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dikendalikan atau ditetapkan kriterianya agar hasil penelitian tetap

konsisten dan dapat diulang oleh peneliti lain dengan akurat. Dalam penelitian ini, variabel terkendali mencakup kondisi peneliti, lingkungan laboratorium, serta faktor fisik hewan uji, seperti berat badan, lingkungan hidup, jenis kelamin, galur, dan kondisi tempat tidur.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun sukun (*Artocarpus altilis*) memiliki bentuk tunggal, bertangkai, dan lebar lonjong atau bulat seperti telur. Daun memiliki lekukan sangat dalam dan memiliki diameter yang bervariasi mulai dari 30 cm. Ciri-ciri yang diperhatikan adalah daun sukun yang segar serta bebas dari penyakit.

Kedua, serbuk daun sukun (*Artocarpus altilis*) dihasilkan dengan cara mengeringkan daun sukun (*Artocarpus altilis*) dengan sinar matahari, kemudian menggilingnya hingga menjadi serbuk halus dan menyaringnya menggunakan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun sukun (*Artocarpus altilis*) diperoleh melalui proses penyarian daun sukun (*Artocarpus altilis*) dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Setelah itu, ekstrak tersebut kentalkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40 °C untuk menghasilkan ekstrak yang kental.

Keempat, dosis ekstrak etanol daun sukun (*Artocarpus altilis*) adalah jumlah ekstrak yang dibuat dari daun sukun (*Artocarpus altilis*), yang diberikan kepada mencit secara oral dengan tiga variasi dosis sesuai dengan kelompok uji yang ditentukan.

Kelima, mencit yang juga dikenal sebagai *Mus musculus*, adalah hewan uji berusia 2-3 bulan dengan metode *carbon clearance* dengan volume pemberian 0,2mL/20gBB mencit pada konsentrasi 6,4%.

Keenam, mencit diambil darah melalui ekor dan diukur indeks fagositosis kemudian absorbansi dihitung menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada Panjang gelombang 557 nm.

Ketujuh, dosis efektif yang sudah memberikan efek pada mencit untuk menentukan efek imunosupresan

Kedelapan, dosis optimal yang sudah memberikan efek pada mencit untuk menentukan efek imunosupresan.

C. Alat Dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan adalah timbangan analitik, sput 0,5 mL, sonde oral, kertas saring, kain flanel, beaker glass, tabung reaksi,

Erlenmeyer, batang pengaduk, ayakan no 40, oven, vacuum rotary evaporator, *moisture balance*. Alat yang digunakan untuk perlakuan mencit meliputi: kandang mencit, wadah minuman dan makanan, dan kandang metabolit.

2. Bahan

Bahan yang digunakan antara lain: ekstrak daun sukun, etanol 70%, HCl, aquadest, NaOH, AlCl₃ 10%, serbuk Mg, alkohol, FeCl₃, methanol, EDTA, tinta cina, asam asetat 1%, pereaksi Liberman Burchard, Mayer, Dragendorff, dan CMC-Na.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan berusia sekitar 30 hari dengan berat antara 20-30 gram. Sebanyak 30 ekor mencit tersebut dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, di mana setiap kelompok terdiri dari 5 ekor mencit

D. Jalannya Penelitian

1. Pengumpulan sampel

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Desa Sembungharjo, Kecamatan Pulokulon, Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah. Pada tahap awal penelitian.

2. Determinasi tanaman

Dalam penelitian ini, langkah pertama yang dilakukan adalah menentukan jenis daun sukun. Tujuan dari penentuan ini adalah untuk memastikan keaslian sampel yang akan digunakan dalam penelitian. Proses penentuan daun sukun ini dilakukan UPT Laboratorium Herbal Material Medica Batu.

3. Pembuatan serbuk daun sukun

Daun sukun segar disortir dengan cara memilih yang berkualitas baik, kemudian ditimbang dan dicuci dengan air mengalir. Setelah itu, daun sukun dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil. Selanjutnya, daun tersebut dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di tempat yang tidak terkena sinar matahari langsung. Setelah proses pengeringan selesai, daun sukun dihaluskan menggunakan grinder untuk mengecilkan ukurannya secara mekanis menjadi serbuk yang sangat halus. Proses ini bertujuan agar ekstraksi zat aktif dapat dilakukan secara efektif. Serbuk yang dihasilkan kemudian diayak menggunakan ayakan nomor 40 untuk mendapatkan serbuk dengan tingkat kehalusan yang relatif homogen. Dengan cara ini, luas permukaan partikel menjadi lebih besar, dan kontak

antara serbuk dan pelarut meningkat, sehingga proses ekstraksi dapat berjalan dengan optimal. Setelah itu, serbuk ditimbang dan disimpan dalam wadah yang bersih dan tertutu.

4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun sukun

Penentuan kadar susut pengeringan serbuk daun sukun dilakukan menggunakan alat *moisture balance*. Simplicia yang digunakan harus dalam bentuk serbuk dengan tingkat kehalusan nomor 40. Proses pengeringan dilakukan pada suhu 105°C dengan cara menimbang sebanyak 2 gram serbuk yang telah ditempatkan pada lempeng yang telah ditara. Setelah itu, serbuk diratakan dan ditunggu hingga alat berbunyi (Putri et al., 2023). Menurut kementerian Kesehatan Republik Indonesia tahun 2009 nilai susut penegringan kurang dari 10% dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali

5. Pembuatan ekstrak daun sukun

Simplicia daun sukun yang telah dihaluskan menjadi serbuk diekstraksi menggunakan metode maserasi. Maserasi adalah salah satu teknik ekstraksi tradisional yang melibatkan perendaman bahan baku tanaman obat dalam wadah maserasi dengan pelarut yang sesuai pada suhu kamar selama tiga hari, dengan pengadukan secara berkala. Langkah pertama yang dilakukan adalah menimbang 700 g serbuk daun sukun, kemudian melarutkannya dalam 7 liter pelarut etanol 70%. Serbuk tersebut direndam selama 6 jam sambil sesekali diaduk, lalu dibiarkan selama 18 jam. Setelah itu, maserat dipisahkan menggunakan metode filtrasi. Proses ekstraksi diulang pada ampas saringan dengan menambahkan 4 liter etanol 70%. Selama proses ini, wadah yang digunakan adalah botol kaca gelap dan ditempatkan di tempat yang terlindung dari sinar matahari, agar zat aktif yang sensitif terhadap cahaya atau sinar UV tidak rusak. Semua maserat yang dihasilkan kemudian dikumpulkan dan diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C dengan kecepatan putaran 80 rpm hingga diperoleh ekstrak yang kental (Endah, 2017).

6. Penetapan kadar air daun sukun

Penetapan kadar air pada serbuk daun sukun dilakukan dengan metode Azeotropi menggunakan destilasi toluen. Pelarut yang digunakan adalah toluene yang telah dijenuhkan dengan sedikit air. Pertama, timbang sekitar 5 gram sampel dan masukkan ke dalam labu alas bulat. Tambahkan 200 ml toluen jenuh air, lalu pasang alat destilasi dan panaskan labu tersebut dengan bunsen. Toluken dan air yang menguap

akan didinginkan dan terkumpul di dalam tabung penerima. Pembacaan skala pada tabung penerima dilakukan setelah terjadi pemisahan yang jelas antara air dan toluen, dan kadar air dihitung dalam persentase v/b (Depkes, 2017).

7. Identifikasi kandungan senyawa ekstrak daun sukun

Identifikasi kandungan kimia pada ekstrak etanol daun sukun dilakukan untuk memastikan keakuratan informasi mengenai komponen yang terdapat dalam ekstrak tersebut. Prosedur yang digunakan dalam pengujian ini mengacu pada jurnal penelitian yang relevan (Kimia *et al.*, 2019).

7.1 Uji flavonoid. Sebanyak 2 mL sampel ekstrak daun sukun dipanaskan kurang lebih 5 menit, kemudian tambahkan 0,1 gram logam Mg dan 5 tetes HCl pekat. Hasil positif ditandai warna ungu jingga sampai merah

7.2 Uji alkaloid. Sebanyak 2 mL sampel ekstrak daun sukun dimasukan dalam tabung reaksi 20 ml ditambahkan 5 ml asam klorida encer 1% kemudian diaduk pada penangas air dan disaring. Filtrat (3 ml) dibagi menjadi tiga. Pada bagian pertama, tiga tetes reagen Dragendorff yang baru disiapkan ditambahkan. Hasil positif ditandai endapan orange hingga kecoklatan. Pada bagian kedua 1 tetes reagen Mayer ditambahkan. Hasil positif ditandai endapan berwarna kekuningan. Pada bagian ketiga ditambahkan 1 tetes reagen Wagner. Hasil positif ditandai endapan coklat kemerahan

7.3 Uji tanin. Sebanyak 2 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi berkapasitas 20 ml, kemudian ditambahkan 5 ml air suling. Campuran tersebut dididihkan dan kemudian disaring. Setelah itu, ditambahkan 2 tetes larutan besi klorida. Hasil positif ditandai endapan berwarna hijau.

7.4 Uji steroid/ triterpenoid. Sebanyak 2 mL disampel masukan dalam tabung reaksi berkapasitas 20 ml, ditambahkan 1 ml kloroform dan beberapa tetes Libermann-Bouchard. Hasil positif steroid warna merah kecoklatan, positif triterpenoid coklat-ungu.

7.5 Uji saponin. Sebanyak 2 ml ekstrak dicampurkan dengan aquadest 10 ml dalam tabung reaksi dan dikocok. Hasil positif ditandai buih yang bertahan selama 1 menit.

8. Penentuan dosis

8.1 Dosis metil prednisolone 4%. Dosis metil prednisolone adalah 0,0208 mg/20 g BB mencit (Purkon *et al.*, 2023)

8.2 Dosis carbon clearance. Dosis *carbon clearance* yang digunakan untuk menginduksi mencit adalah 0,1 ml/10 g BB mencit (Hamdin *et al.*, 2019).

8.3 Dosis ekstrak etanol daun sukun. Dalam penelitian ini, dosis yang digunakan diambil dari penelitian sebelumnya, di mana dosis ekstrak daun sukun yang paling efektif adalah 200 mg/ Kg BB tikus. Dosis penelitian dibuat 3 variasi dosis yaitu $\frac{1}{2}$ dosis efektif dari 200mg/KgBB tikus, faktor konversi tikus ke mencit adalah 0,14. Sehingga dosis untuk mencit adalah $20 \text{ mg} \times 0,14 = 140 \text{ mg/Kg BB mencit}$. Dosis efektif 200mg/KgBB tikus, faktor konversi tikus ke mencit adalah 0,14. Sehingga dosis untuk mencit adalah $40 \text{ mg} \times 0,14 = 280 \text{ mg/KgBB mencit}$, dan 2x dosis efektif 200mg/KgBB tikus, faktor konversi tikus ke mencit adalah 0,14. Sehingga dosis untuk mencit adalah $80 \text{ mg} \times 0,14 = 550 \text{ mg/KgBB mencit}$,

9. Pembuatan sediaan uji

9.1 Pembuatan suspensi karbon 6,4%. Ambil 1,6 gram karbon (tinta cina) yang telah dikeringkan, lalu larutkan dalam 25 mL larutan NaCl fisiologis 0,9%.

9.2 Pembuatan suspensi CMC Na 0,5%. Larutkan 500 mg serbuk CMC Na, tambahkan aquades hangat sedikit demi sedikit hingga volume mencapai 100 ml.

9.3 Pembuatan suspensi metil prednisolone 0,004%. Larutan methylprednisolon 0,0208 mg/20gBB untuk mencit dibuat dengan cara menghaluskan satu tablet utuh metilprednisolon, kemudian campurkannya ke dalam larutan Na CMC 0,5% yang dipanaskan hingga mencapai volume 100 mL. Campuran tersebut diaduk hingga homogen, sehingga serbuk metilprednisolon terdispersi dalam Na CMC. Ini digunakan sebagai pembanding (kontrol positif).

9.4 Pembuatan suspensi ekstrak daun sukun 2,5%. Ambil 2,5 gram ekstrak etanol dari daun sukun, lalu larutkan dalam larutan Na CMC 0,5% hingga mencapai volume 100 mL, aduk ad homogen.

9.5 Pembuatan larutan kurva baku. Tinta cina yang telah dikeringkan kemudian ditimbang sebanyak 100 mg dan dilarutkan dalam 100 mL asam asetat untuk membuat larutan dengan konsentrasi 1 mg/mL. Kemudian, larutan tersebut dipipet dalam volume yang berbeda-beda (1, 2, 3, 4, dan 5 mL) dan dicukupkan dengan asam asetat 1% hingga volume 50 mL, sehingga diperoleh larutan dengan kadar karbon yang berbeda-beda (20, 40, 60, 80, dan 100 $\mu\text{g/mL}$). Setiap larutan

tersebut kemudian dicampur dengan darah mencit yang diambil dari ujung vena ekor sebanyak 75 μL . Setelah dihomogenkan, serapan larutan tersebut diukur menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 650 nm. Plot serapan yang diperoleh kemudian digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Sebagai kontrol, digunakan darah mencit putih jantan dan aquadest (Rahman *et al.*, 2017).

10. Perlakuan hewan uji

Sebanyak 30 ekor mencit berumur sekitar 30 hari dan memiliki berat antara 20-30 g. Ditempatkan dalam kandang pada suhu ruangan, diberi pakan berupa pelet dan air tersedia secara bebas. Hewan-hewan ini dibiasakan dengan kondisi percobaan selama 7 hari. Mencit tersebut dibagi menjadi 5 kelompok, di mana setiap kelompok terdiri dari 5 ekor mencit dengan perlakuan yang berbeda-beda sebagai berikut

- Kelompok I : Kelompok negative diberikan CMC 0,5% selama 7 hari
- Kelompok II : Kontrol positif diberikan metilprednisolone 0,0208mg/20 g BB mencit selama 7 hari.
- Kelompok III : Kelompok perlakuan I diberikan ekstrak etanol daun sukun dengan dosis 140 mg/KgBB selama 7 hari.
- kelompok IV : Kelompok perlakuan II diberikan ekstrak etanol daun sukun dengan dosis 280 mg/KgBB selama 7 hari.
- Kelompok V : Kelompok perlakuan III diberikan ekstrak etanol daun sukun dengan dosis 550 mg/KgBB selama 7 hari.

11. Prosedur Uji Aktivitas Fagositosis (*Metode Carbon Clearance*)

Mencit dibagi menjadi 5 kelompok, dimana satu kelompok kontrol diberi NaCMC 0,5% sebagai perlakuan negatif, satu kelompok positif diberi metilprednisolon, dan tiga kelompok lainnya diberi ekstrak etanol daun sukun. Pemberian perlakuan dilakukan secara oral sekali sehari selama 7 hari berturut-turut sesuai dengan dosis yang ditentukan. Pada hari ke-8 sebelum diinduksi masing-masing kelompok perlakuan diambil darah melalui ekor sebagai awal kurva baku (menit ke-0). Kemudian suspensi karbon sebanyak 0,1 mL per 10 gram berat badan disuntikkan secara intravena. Selanjutnya pengambilan darah mencit diambil sebanyak 50 μL pada menit ke-3, 6, 9, 12 dan 15 kemudian ditambahkaan EDTA dan ditambahkan 4 mL asam asetat 1%. Kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer *UV-Visible* pada panjang gelombang 650 nm. Mencit yang telah diuji untuk kebersihan karbon tersebut kemudian dikorbankan untuk diambil dan ditimbang bobot limpanya satu per satu.

12. Perhitungan Konstanta fagositosis dan indeks fagositosis

Konstanta fagositosis (K) dan indeks fagositosis (IF) dihitung menggunakan rumus berikut:

$$K = \frac{\log A(n) - \log A(n-1)}{t(n-1) - t(n)}$$

Keterangan :

K : Konstanta fagositosis

t : Waktu (3, 6, 9, 12, 15 menit)

n : Pengamatan ke-n (n=1, 2, 3, 4)

A : Absorbansi

Perhitungan harga indeks fagositosis dengan rumus sebagai berikut:

$$IF = \frac{\text{Konstanta fagositosis mencit } x}{\text{konstanta fagositosis rata-rata}}$$

Keterangan :

IF : Indeks fagositosis

Mencit X : Mencit yang sudah diperlakukan dan ditentukan harga konstanta fagositosisnya

Nilai indeks fagositosis < 1 : memiliki aktivitas imunosupresan

indeks fagositosis >1 : memiliki aktivitas imunostimulan

13. Perhitungan Bobot Limpa Relatif

Sebelum dibedah mencit dimatikan secara euthansia dengan teknik *cervical dislocation*. Kemudian mencit dibedah untuk diambil limpa yang terletak di sebelah kiri rongga perut. Limpa yang berwarna merah kehitaman ini kemudian dibersihkan dari lemak yang menempel dan dicuci 3x dengan etanol 70% dan dikeringkan menggunakan tisu dapur, sebelum ditimbang menggunakan timbangan analitik (Rahman *et al.*, 2017).

$$\% \text{Bobot limpa relatif} = \frac{\text{bobot limpa (g)}}{\text{bobot badan mencit}} \times 100\%$$

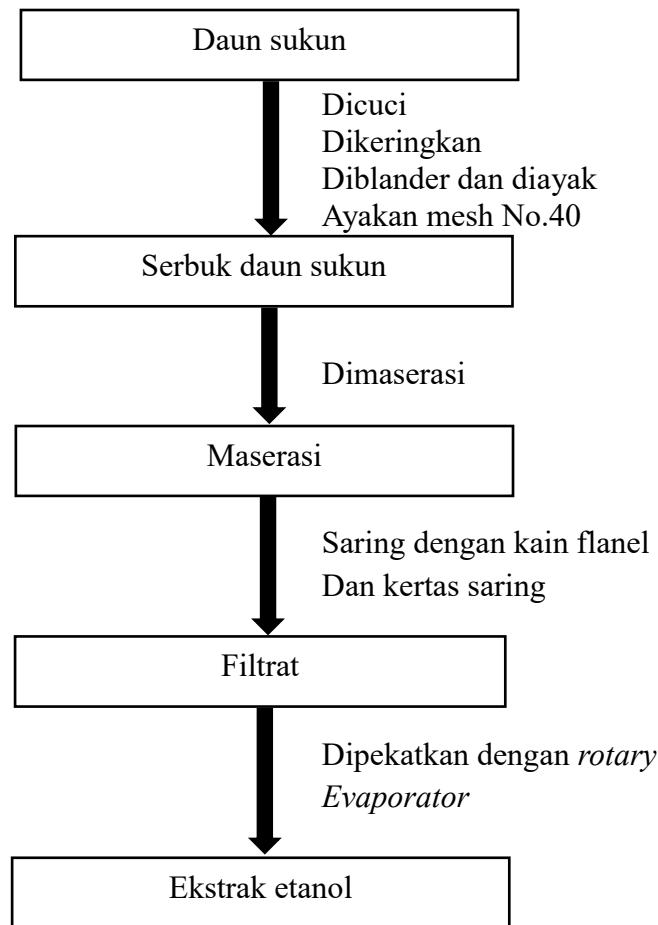
E. Analisis data

Data yang diperoleh dari penelitian ini mencakup konstanta absorbansi, indeks fagositosis dan analisis bobot relatif limpa dianalisis secara statistik menggunakan SPSS 24. Untuk menguji indeks fagositosis dan bobot limpa kedua data tersebut dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Jika data terdistribusi normal dan homogenitas maka dilanjutkan dengan uji ANOVA satu arah untuk mengetahui perbedaan

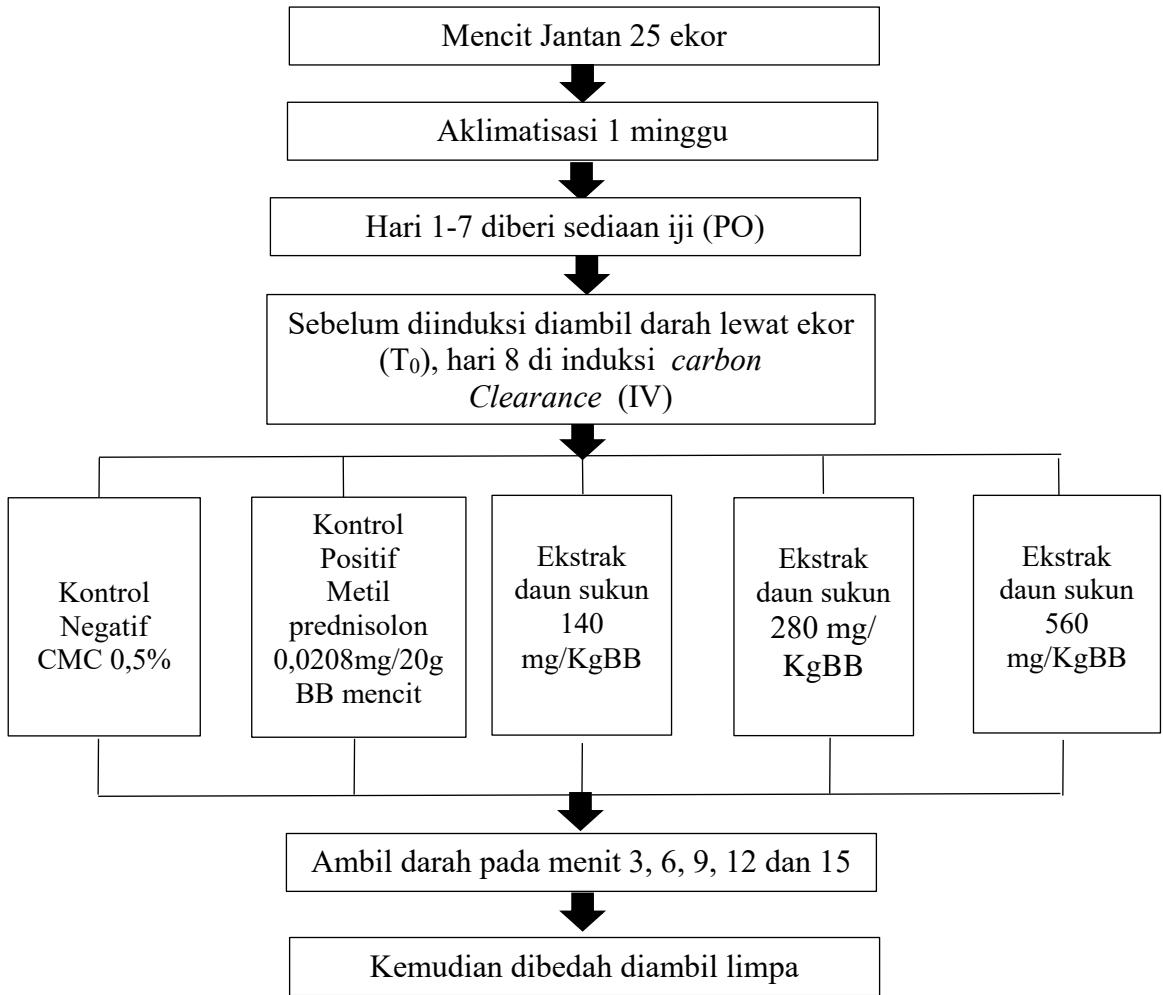
Nilai indeks fagositosis. Tetapi jika data tidak terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji non parametik, kruskall wallis.

F. Skema penelitian

1. Pembuatan ekstrak etanol daun sukun



Gambar 4. Skema pembuatan ekstrak



Gambar 5. Skema uji fagositosis