BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental menggunakan hewan uji yaitu tikus putih jantan galur wistar.

3.2 Populasi dan Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun *C. costata* yang diperoleh di sekitar hutan Tangkahan Taman Nasional Gunung Leuser, Kabupaten Langkat, Sumatera Utara yang banyak dihuni oleh suku Karo. Daun *C.costata* ini kemudian dibuat menjadi ekstrak dan dilakukan skrining fitokimia

3.3 Bahan dan Alat yang digunakan

3.3.1 Bahan

Tikus putih jantan galur wistar (*Rattus novergicus*) 28 ekor, ekstrak etanol daun *C. costata*, PGA, aquades, etanol 70 %, simvastatin 10 mg, aquades, pakan tinggi lemak, darah tikus dan peraksi kit Kolesterol.

3.3.2 Alat

Neraca analitik, gelas ukur, gelas kimia, batang pengaduk, sonde oral, spuit, mortir dan stemper, maserator, klem dan statif, tabung reaksi, corong, labu ukur, kaca arloji, *rotary evaporator*, mikropipet, tabung *effendroff*, *photometer Humalyzer 2000*, sentrifugator, kandang tikus, dan tempat minum tikus.

3.4 Lokasi Penelitian dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmasi Universits Buana Perjuangan Karawang selama kurang lebih 2 (dua) bulan yaitu dari bulan Mei sampai dengan Juni 2020.

3.5 Prosedur Percobaan

3.5.1 Penyiapan Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan uji yang dibagi secara acak menjadi 7 kelompok dimana setiap kelompok terdiri dari 4 ekor. Hewan uji diaklimatisasikan terlebih dahulu

selama 7 hari, untuk menyesuaikan diri dengan kondisi dalam penelitian ini. Sewaktu aklimatisasi, hewan uji diberi pakan pelet dan air minum *ad libitium*.

3.5.2 Penyiapan Induksi Hiperlipidemia

Hewan uji yang akan diteliti akan diinduksi menggunakan PTU 1,8 mg/200g BB yang disuspensikan kedalam PGA 1%, dan kuning telur 10 ml/kgBB yang diberikan secara oral selama 15 hari (Tita *et al.,* 2015).

3.5.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun *C. costata*

Ekstraksi dilakukan dengan metode ekstraksi dingin yaitu maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Daun *C. costata* yang telah menjadi serbuk simplisia ditimbang sebanyak 1kg dan dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70%, direndam selama 72 jam. Akan diperoleh ekstrak cair yang kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50˚C dan kembali dipanaskan pada waterbath pada suhu 40^{0}C sehingga didapatkan ekstrak kental. Dihitung persentasi rendemen ekstrak yang diperoleh (Alkandahri *et al,.* 2019).

$$\%\ \text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{Berat bahan yang diekstraksi}}\ 100\%$$

3.5.4 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia ekstrak daun *C. costata* sebagai berikut :

a. Pemeriksaan alkaloida

Sampel dibasakan dengan ammonia, kemudian ditambahkan kloroform, digerus kuat. Lapisan kloroform dipipet dan disaring, kemudian kedalamnya ditambahkan asam klorida 2 N. Campuran dikocok kuat hingga terdapat dua lapisan. Lapisan asam dipipet, kemudian dibagi menjadi tiga bagian. Bagian pertama sebagai pembanding, bagian kedua ditambahkan pereaksi *Mayer*, jika terdapat kekeruhan atau endapan putih menandakan adanya alkaloid. Bagian ketiga ditambahkan pereaksi *Dragendroff*, jika terdapat kekeruhan atau endapan berwarna kuning sampai jingga menandakan adanya alkaloid (Farnsworth, 1966).

b. Pemeriksaan flavonoida

Sampel ditambahkan air lalu dipanaskan dan disaring. Filtrat yang terbentuk ditambahkan dengan serbuk magnesium dan asam klorida 5 N lalu disaring dan ditambahkan amil alkohol, dikocok kuat, lalu diamati warna lapisan amil alkohol

yang terbentuk. Senyawa flavonoid ditandai dengan terbentuk warna kuning hingga merah yang dapat ditarik oleh amil alkohol (Farnsworth, 1966).

c. Pemeriksaan glikosida

Sampel ditambahkan pada kombinasi etanol 96% dengan air (7:3) dan HCl 2N sampai diturunkan, direfluks selama 60 menit, didinginkan dan dipisahkan. Kemudian filtrat tersebut ditambahkan air sulingan dan timbal(II) asetat 0,4 M, dicampur, dibiarkan sampai cepat turun dan diayak. Filtrat diekstraksi dengan kombinasi kloroform dan isopropanol (2:3) dalam saluran isolasi, dikocok hingga membentuk 2 lapisan, yaitu lapisan atas (gula) dan lapisan dasar (bukan gula).

1. Lapisan atas

   Dengan ditambah air dan reagen Molish, kemudian, pada saat itu secara bertahap ditambahkan asam sulfat pekat melalui pembagi silinder, cincin naungan coklat / coklat keunguan / ungu terbentuk pada batas antara dua cairan yang menunjukkan adanya efek gula

2. Lapisan bawah

   Diselesaikan dengan menambahkan reagen Lieberman-Bouchard. Jika terbentuk warna ungu kemerah-merahan menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan jika berbingkai biru hijau/hijau menunjukkan adanya steroid (Farnsworth, 1966).

d. Pemeriksaan glikosida antarkuinon

Sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer ditambah etanol sampai terendam ditambahkan asam sulfat 2 N, dipanaskan sebentar, setelah dingin dimasukkan ke dalam corong pisah ditambahkan 10 ml benzena, dikocok dan didiamkan. Lapisan benzena dipisahkan dan disaring, kocok lapisan benzena dengan 2 ml larutan natrium hidroksida 2 N, didiamkan. Lapisan natrium hidroksida berwarna merah yang menunjukkan adanya glikosida antrakuinon (Farnsworth, 1966).

e. Pemeriksaan steroid dan triterpenoida

Sampel ditambahkan eter sambil digerus lalu dikocok dan didiamkan setelah itu dipipet dan disaring. Filtrat diuapkan eternya lalu residunya ditambahkan pereaksi *Lieberman-Bouchard* dan diamati warnanya. Senyawa steroid ditandai

dengan terbentuknya warna biru-hijau sedangkan senyawa triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna ungu (Farnsworth, 1966).

f. Pemeriksaan saponin

Sampel ditambahkan air pada tabung reaksi lalu dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit kemudian saring dan didinginkan. Setelah dingin, filtrat dikocok kuat secara vertikal selama 30 detik. Senyawa saponin ditandai dengan terbentuknya busa setinggi kurang lebih 1 cm yang persisten selama beberapa menit dan tidak hilang juga setelah ditambahkan asam klorida atau setelah didiamkan selama 20 menit (Farnsworth, 1966).

g. Pemeriksaan tannin

Sampel ditambahkan air pada tabung reaksi lalu dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit, saring panas-panas. Filtratnya diencerkan dengan air suling sampai tidak berwarna. Larutan diambil sebanyak 2 ml dan ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Jika terjadi warna biru atau kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Farnsworth, 1966).

3.5.5 Pembuatan Larutan PGA 1%

Larutan PGA 1% dibuat dengan menimbang serbuk gom arab sebanyak 1 g kemudian dicampurkan dengan 100 ml aquades dengan cara diaduk hingga homogen. Perbandingan aquades dengan PGA adalah 100:1 artinya didalam 100 ml aquades terdapat 1 g PGA.

3.5.6 Pembuatan dan Pemberian Larutan Simvastatin

Simvastatin 10 mg dilarutkan dengan larutan PGA 1% sampai 10 ml. Volume administrasi oral yang diberikan sebanyak 1 mL/tikus. Dosis simvastatin untuk manusia adalah 10 mg, dikonversikan dalam dosis tikus 0,018 didapat 0,18 mg.

3.5.1 Pengambilan Sampel Darah

Tikus dipuasakan ±12 jam sebelum diambil sampel darah. Pengambilan darah dilakukan sebanyak 3 kali, yaitu sebelum induksi, setelah induksi dan setelah pengobatan. Proses pengambilan sampel darah dilakukan dengan cara tikus dijepit bagian leher. Sebisa mungkin hewan uji dikondisikan senyaman mungkin, kemudian dimasukkan pipa kapiler hematokrit pada retro-orbital pleksus. Pipa kapiler hematokrit diputar sampai melukai pleksus, kemudian darah ditampung

pada tube EDTA yang bertujuan untuk proses pengambilan sampel darah. Darah yang diambil dari setiap mata tikus berkisar 0,5-1ml. Darah didiamkan selama 15 menit dan disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 7.000 rpm untuk diperoleh serum darah. Serum darah yang diperoleh dipipet menggunakan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam tabung effendorf lalu diinkubasi pada suhu 37˚C selama 10 menit.

3.5.7 Pengukuran Kadar Kolesterol Total Plasma Darah

Pengukuran kadar kolesterol total tikus dilakukan sebelum induksi (hari ke-0), setelah induksi (hari ke-15) dan setelah pemberian sediaan uji (hari ke-30) menggunakn fotometer dengan gelombang 546 nm.

Pemeriksaan kadar kolesterol total tikus menggunakan metode *CHOD-PAP Enzymatic Colorimeter Test*. Setelah serum dimasukan ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan reagen sesuai dengan tabel di bawah ini:

Tabel 3.1 Persiapan Larutan Untuk Pengukuran Kadar Kolesterol Total

Perlakuan	Blangko µl	Standar µl	Sampel µl
Standar	-	10 µl	-
Sampel	-	-	10 µl
Reagen	1.000 µl	1.000 µl	1.000 µl

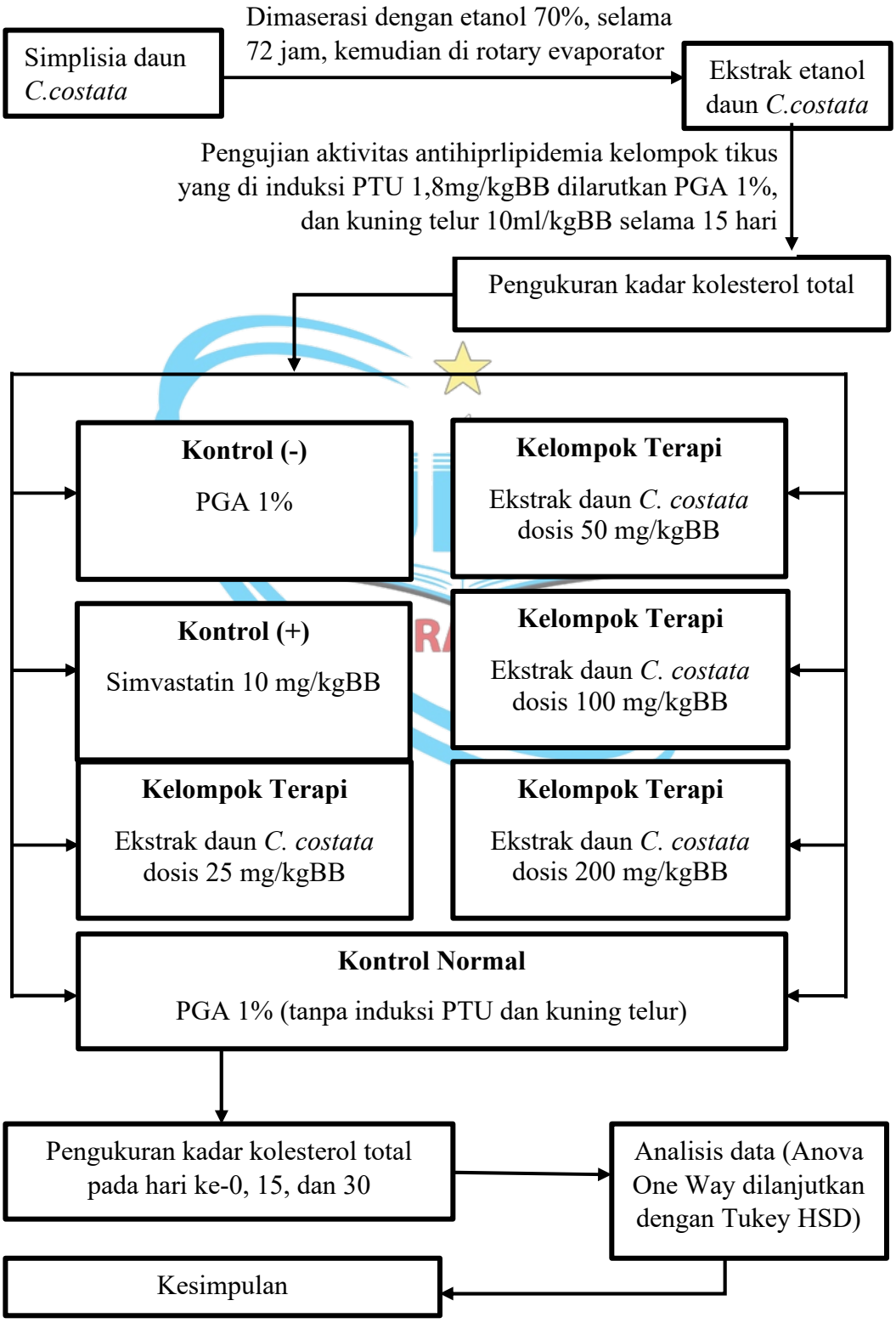
Masing-masing larutan yang telah dibuat dicampurkan dan diinkubasi di dalam tabung effendorf selama 5 menit pada suhu kamar (37ºC). Setelah itu sampel diukur kadar kolesterol totalnya menggunakan *fotometer* pada panjang gelombang 546 nm (Sofian, 2011).

3.6 Analisa Data

Data disajikan secara deskriptif komparatif dengan menilai hasil pemeriksaan kadar kolesterol total antara kelompok normal, kelompok negatif, kelompok positif, kelompok terapi dosis 25 mg/kgBB, 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB, serta dianalisis menggunakan program SPSS v.20 dengan uji Anova One Way untuk melihat perubahan (penurunan) kadar kolesterol darah sebelum dan sesudah perlakuan dengan $p<0,05$, dilanjutkan dengan Tukey HSD

untuk mengetahui letak perbedaan data kadar kolesterol total pada setiap kelompok heawan uji.

3.7 Skema penelitian



Gambar 3. 1 Skema Penelitian

UBP
KARAWANG