

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan rancangan *pre and post test with controlled group design*.

### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.2.1 Alat

Alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, wadah maserasi, *rotatory evaporator*, cawan penguap, *water bath*, corong pisah, tabung reaksi, pipa kapiler hematokrit, tabung EDTA, mikropipet, sonde oral, *disposable syringe*, digital *centrifuge*, fotometer *Humalyzer*.

#### 3.2.2 Bahan

Bahan Uji : Simplisia daun cep-cepan yang diperoleh dari hutan Tangkahan Taman Nasional Gunung Leuser, Kabupaten Langkat, Sumatera Utara.

Hewan Uji : Tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) usia  $\pm$  3 bulan dengan berat badan sekitar 150 gram - 250 gram sebanyak 24 ekor.

Bahan Kimia : Pelarut etanol 70%, aquadestilata, *n*-heksana, etil asetat, reagen penapisan fitokimia, reagen kolesterol.

Bahan Lainnya : PGA 1%, obat simvastatin, pakan induksi hiperlipidemia kuning telur dan obat propylthiouracil.

### 3.3 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang pada bulan Juli 2021 sampai dengan Agustus 2021.

### 3.4 Prosedur Percobaan

#### 3.4.1 Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan sebanyak 6 kelompok, pengelompokkan hewan uji menggunakan rumus Federer tahun 1963 (Syam *et al*, 2011) yaitu :

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan : t adalah jumlah perlakuan

n adalah jumlah pengulangan tiap perlakuan

Perhitungan :  $(n-1)(6-1) \geq 15$

$$(n-1)(5) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Hewan uji dibagi menjadi 6 kelompok, masing-masing terdiri dari 4 ekor tikus. Kelompok tersebut terdiri dari kelompok kontrol normal, kontrol positif, kontrol negatif, kelompok terapi fraksi air, fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat dengan kriteria:

a. Kriteria Inklusi

- Tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*).
- Usia 2-3 bulan.
- Berat badan 150-200 gram.
- Sehat dan beraktivitas normal.

b. Kriteria Eksklusi

Tikus jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) dengan kondisi stress, sakit dan mati saat penelitian.

Pembagian hewan kelompok uji dapat dilihat pada tabel 3.1.

**Tabel 3.1** Pembagian Kelompok Hewan Uji

No	Kelompok	Jumlah	Perlakuan Hari ke 0-30
1	Kontrol Normal	4	Tidak diberi induksi dan terapi
2	Kontrol Negatif	4	Diberi induksi dan larutan PGA 1%
3	Kontrol Positif	4	Diberi induksi dan simvastatin 10 mg/KgBB
4	Fraksi Air 100 mg/KgBB	4	Diberi induksi dan fraksi air cep-cepan 100 mg/KgBB
5	Fraksi Etil Asetat 100 mg/KgBB	4	Diberi induksi dan fraksi etil asetat cep-cepan 100 mg/KgBB
6	Fraksi <i>n</i> -heksana 100 mg/KgBB	4	Diberi induksi dan fraksi <i>n</i> -heksana cep-cepan 100 mg/KgBB

### 3.4.2 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel menggunakan teknik *simple random sampling*, yaitu sampel diambil secara acak sehingga setiap satuan sampling yang ada memiliki peluang yang sama untuk dipilih ke dalam sampel.

### 3.4.3 Pemberian Induksi Hiperlipidemia

Induksi hiperlipidemia menggunakan kuning telur 10 mL/KgBB dengan volume administrasi oral  $\pm$  2 mL dan obat propylthiourasil 100 mg/KgBB yang disuspensikan pada PGA 2%, volume administrasi oral  $\pm$  1 mL. Pemberian sesuai dengan perhitungan berat badan tikus (Lampiran 9).

### 3.4.4 Pembuatan Ekstrak dan Fraksi Daun Cep-cepan

Serbuk daun cep-cepan sebanyak 1750 gram dimaserasi dalam 15 liter pelarut etanol 70% selama 72 jam atau 3 hari. Ekstrak cair yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sehingga didapatkan ekstrak pekat. Rendemen ekstrak pekat dihitung dengan perhitungan :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Berat simplisia awal yang ditimbang (g)}} \times 100\%$$

Kemudian ekstrak dilarutkan dalam campuran etanol dan air dengan perbandingan (1:3), setelah itu difraksinasi dengan praktisi cair-cair menggunakan etil asetat dan *n*-heksana masing-masing dilakukan 4 kali pengulangan sebanyak 150 mL (4 x 150 mL) menggunakan alat corong pisah dengan cara dikocok kuat berkali-kali secara searah kemudian didapatkan hasil fraksi yaitu fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksana (Alkandahri *et al*, 2019). Fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sedangkan fraksi air dengan cara *freeze dryer* (pengeringan beku) untuk mengeluarkan atau memisahkan hampir sebagian besar air dalam ekstrak. Rendemen fraksi dihitung dengan perhitungan :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat fraksi yang diperoleh (g)}}{\text{Berat ekstrak awal yang ditimbang (g)}} \times 100\%$$

### 3.4.5 Penapisan Fitokimia

Uji kualitatif fitokimia berdasarkan standar metode (Farnsworth, 1966):

#### 1. Pemeriksaa Alkaloid

Sampel dilarutkan dengan ammonia sampai menjadi basa, tambahkan kloroform, gerus kuat. Lapisan kloroform disaring lalu tambahkan HCl 2 N, dikocok kuat hingga terbentuk lapisan. Lapisan asam dipipet, dibagi menjadi tiga bagian. Bagian pertama sebagai pembanding, bagian kedua ditambahkan pereaksi *Mayer*, adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya warna keruh atau endapan putih. Bagian ketiga ditambahkan pereaksi *Dragendroff*, adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya warna keruh atau endapan berwarna kuning sampai jingga.

#### 2. Flavonoid

Dalam tabung reaksi sampel dan aquadest dipanaskan kemudian disaring. Tambahkan serbuk magnesium dan HCl 5 N pada filtrat lalu disaring setelah itu tambahkan amil alkohol, dikocok kuat. Hasil positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah pada lapisan amila alkohol.

#### 3. Pemeriksaan Glikosida

Sampel dilarutkan dengan etanol 70% dan aquadest lalu ditambahkan HCl 2 N. Larutan direfluks selama 1 jam, dinginkan lalu disaring. Filtrat ditambahkan timbal (II) asetat 0,4 M kemudian diaduk, didiamkan lalu disaring. Filtrat difraksi dalam corong pisah dengan larutan kloroform dan isopropanol, kocok hingga terbentuk lapisan.

##### a. Lapisan atas

Lapisan atas merupakan gula ditambahkan dengan aquadest dan pereaksi *Molish*, tambahkan  $H_2SO_4$  secara perlahan melalui dinding tabung reaksi, ikatan gula ditandai dengan terbentuknya cincin

berwarna coklat atau coklat keunguan pada batas antara kedua cairan.

b. Lapisan bawah

Lapisan bawah tidak mengandung gula, ditambahkan pereaksi *Lieberman-Bouchard* menghasilkan warna ungu kemerahan menandakan adanya triterpenoid, sedangkan terbentuknya warna biru hijau atau hijau menandakan adanya steroid.

4. Pemeriksaan Glikosida Antrakuinon

Dalam erlenmeyer sampel dilarutkan dengan etanol kemudian ditambahkan  $H_2SO_4$  2 N lalu dipanaskan. Diamkan sampai dingin lalu masukkan kedalam corong pisah dan ditambahkan 10 mL benzena kocok lalu diamkan hingga terbentuk lapisan. Saring lapisan benzena kemudian ditambahkan 2 mL NaOH 2 N kocok dan diamkan. Terbentuknya warna merah pada lapisan NaOH menandakan adanya glikosida antrakuinon.

5. Pemeriksaan Steroid dan Terpenoid

Sampel dicampur dengan eter, dikocok kemudian didiamkan dan disaring. Filtrat eter diuapkan sedangkan residunya ditambahkan pereaksi *Lieberman-Bouchard*. Terbentuknya warna biru-hijau menandakan adanya steroid sedangkan terbentuknya warna ungu menandakan adanya triterpenoid.

6. Pemeriksaan Saponin

Dalam tabung reaksi sampel dan aquadest dipanaskan selama 15 menit, didinginkan lalu disaring. Filtrat dikocok selama 30 detik secara vertikal. Terbentuknya busa setinggi kurang lebih 1 cm yang tidak hilang selama beberapa menit bahkan setelah ditambahkan HCl menandakan adanya saponin.

7. Pemeriksaan Tanin

Dalam tabung reaksi sampel dan aquadest dipanaskan selama 15 menit lalu disaring. Filtrat diencerkan dengan aquadest sampai warnanya menghilang kemudian ambil 2 mL lalu dan 2-3 tetes  $FeCl_3$

1% ditambahkan hingga menghasilkan warna biru kehitaman atau hijau kehitaman yang menandakan adanya tanin.

#### **3.4.6 Pemberian Larutan PGA 1%**

Timbang 1 gram PGA kemudian dicampur 100 mL aquadest lalu dipanaskan menggunakan *hot plate* agar homogen, setelah itu didinginkan. Perbandingan aquadest dan PGA adalah 100 : 1 dimana dalam 100 mL aquadest terdapat 1 gram PGA (Steleyes *et al*, 2019). Diberikan 1 mL volume administrasi oral, dimana 1 mL mengandung 10 mg PGA (Lampiran 10).

#### **3.4.7 Pemberian Dosis Simvastatin**

Dosis untuk hewan uji diperoleh dari perhitungan dosis manusia yang dikonversi ke tikus. Simvastatin disuspensikan dengan PGA 1% dengan volume administrasi oral adalah  $\pm 0,01$  mL. Pemberian sesuai dengan perhitungan berat badan tikus (Lampiran 11).

#### **3.4.8 Pemberian Dosis Fraksi Daun Cep-cepan**

Pemberian dosis fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksana daun cep-cepan adalah masing-masing 100 mg/KgBB yang disuspensikan dalam PGA 1%. Volume administrasi oral yang diberikan adalah  $\pm 2$  mL. Pemberian sesuai dengan perhitungan berat badan tikus (Lampiran 12).

#### **3.4.9 Pengambilan Darah**

Darah diambil sebanyak 3 kali, yaitu di hari ke-0, hari ke-15 dan hari ke-30. Tikus dipuasakan selama  $\pm 12$  jam sebelum pengambilan darah. Pengambilan darah melalui retro-orbital pleksus dengan menggunakan pipa kapiler hematokrit, darah kemudian ditampung menggunakan tabung EDTA sebanyak 1 mL hingga 1,5 mL, selanjutnya darah disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm untuk mendapatkan plasma darah.

#### 3.4.10 Pengukuran Kadar Kolesterol

Pengukuran kadar kolesterol dilakukan di hari ke-0, hari ke-15, dan hari ke-30 menggunakan alat Fotometer *Humalyzer* 2000 dengan metode CHOD-PAP. Serum darah diambil menggunakan mikropipet sebanyak 10  $\mu$ l kemudian di larutkan dalam reagen 1000  $\mu$ l setelah itu dilakukan pengukuran kadar kolesterol.

#### 3.5 Analisis Data

Data dtampilkan secara deskriptif komparatif dengan menilai hasil pengukuran kadar kolesterol total pada hewan uji dengan kontrol normal, kontrol positif, kontrol negatif, kelompok terapi fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksana. Kemudian analisis data menggunakan program SPSS dengan uji ANOVA dan Tukey untuk melihat perubahan kadar kolesterol sebelum dan sesudah perlakuan dengan  $p < 0,05$ .

