

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini dilakukan secara eksperimental dimana perlakuan pengujian toksisitas akut oral ekstrak etanol tempuyung (*Sonchus arvensis*) dilakukan dengan *fixed dose method* yang terdiri dari tiga tahap yaitu uji pendahuluan, uji utama dan uji batas. Uji pendahuluan dilakukan selama 24 jam dan uji utama dilakukan selama 14 hari. Parameter dari pengujian toksisitas akut oral ini yaitu gejala klinis yang muncul, indeks massa organ, gambaran nilai LD₅₀ dan makropatologi.

3.2. Bahan dan Alat

3.2.1. Bahan

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah tanaman tempuyung (*Sonchus arvensis*), mencit putih betina galur Balb-C, etanol 70%, CMC-Na, Magnesium reagen *Dragendorf* dan Kloroform.

3.2.1. Alat

Alat yang dipakai pada penelitian ini adalah oven (IKA Oven), blender (Waring), dan ayakan no. 40, batang pengaduk (*pyrex*), penangas air, kertas saring, corong gelas, tabung reaksi (*pyrex*), beaker glass (*pyrex*), corong *buchner*, rotary evaporator. Alat perlakuan pada mencit

kandang mencit, neraca elektrik (*Mettler Toledo*), jarum oral (obsidi medica), *cotton bud*, gunting, pinset, scalpel, dan *pushpin* (kenko).

3.3. Variabel Penelitian

3.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol tempuyung (*Sonchus arvensis*) yang diberikan kepada mencit betina dalam berbagai variable dosis.

3.3.2. Variabel Terkait

Variabel terkait merupakan variabel akibat dari variabel utama. Variabel terikatnya ialah toksisitas akut ekstrak etanol tempuyung (*Sonchus arvensis*) terhadap mencit putih betina galur Balb-C dengan melihat gejala toksik dan gambaran nilai LD₅₀.

3.4. Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian yaitu di Laboratorium Universitas Buana Perjuangan Karawang yang dilaksanakan selama tiga bulan yaitu pertengahan bulan Februari sampai pertengahan bulan Mei, tahun 2022.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Determinasi Tanaman

Determinasi ekstrak etanol tempuyung dilakukan untuk memastikan bahwa tanaman yang dipakai pada penelitian ini sesuai dengan morfologi

tanaman yang ada pada panduan pustaka yang dilakukan di UPT
Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Kota Malang.

3.5.2. Pengambilan Bahan dan Pembuatan Serbuk

Tumbuhan tempuyung diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balittro) Bogor, Jawa Barat. Pemilihan tumbuhan tempuyung dilakukan secara acak tapi tetap sesuai dengan kriteria yaitu tumbuhan yang tidak terlalu tua. Setelah itu dibersihkan pada air mengalir sampai tumbuhan itu bersih. Kemudian tumbuhan tempuyung yang sudah dibersihkan kemudian dikeringkan. Setelah itu simplisia kering akan dihaluskan menggunakan blender setelah itu diayak kemudian ditimbang sesuai kebutuhan.

3.5.3. Pembuatan Ekstrak Etanol Tempuyung

Pembuatan ekstrak etanol tempuyung dilakukan memakai cara maserasi (1:5), yaitu 500 gram bahan : 2,5 liter pelarut, kemudian diaduk terlebih dahulu menggunakan stirer selama 3 jam. Lalu dimaserasi selama 24 jam kemudian disaring menggunakan kertas saring, kemudian dilakukan remaserasi sampai 3 kali pengulangan yaitu jam ke-24, ke-48, dan ke-72. Setelah itu filtrat diuapkan dengan rotary evaporator dan diuapkan kembali di atas *waterbath* agar ekstrak lebih kental.

3.5.4. Identifikasi senyawa ekstrak etanol tempuyung

a. Identifikasi flavonoid.

Flavonoid diuji dengan menambahkan 5 ml aquadest pada ekstrak kemudian dipanaskan, setelah itu saring agar mendapatkan filtrat lalu dinginkan. Kemudian filtrat ditambahkan serbuk magnesium lalu tambahkan 5 ml HCL dan tambahkan amil alkohol tunggu sampai amil alkohol berbentuk warna merah, jingga atau kuning, jika ada maka positif mengandung flavonoid.

b. Identifikasi alkaloid.

Uji alkaloid yaitu dengan menyiapkan 500 mg ekstrak, kemudian ditambahkan 1 ml HCL 2N dan juga tambahkan 9 ml aquadest, kemudian panaskan diatas penangas air selama dua menit, setelah itu dinginkan beberapa saat lalu saring agar mendapatkan filtratnya kemudian bagi menjadi tiga bagian pada tabung reaksi, pada tabung pertama ditambahkan 2 tetes *Dragendroff* jika terdapat endapan coklat sampai kehitaman maka positif mengandung alkaloid. Pada tabung kedua tambahkan 2 tetes larutan *mayer* jika berbentuk endapan putih atau kuning maka positif mengandung alkaloid. Dan pada tabung ketiga tidak dilakukan perlakuan hanya menjadi pembanding saja.

c. Identifikasi Saponin.

Saponin diuji dengan memasukkan 0,5 gram ekstrak kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 ml air panas dinginkan sebentar lalu

kocok dengan kuat selama 10 detik. Jika terbentuk buih setinggi 1 sampai 10 cm dan kemudian ditambahkan HCL 2N satu tetes tapi buih tetap bertahan maka hal itu menunjukkan positif mengandung saponin.

d. Identifikasi tanin.

Identifikasi tanin dilakukan yaitu dengan menambahkan 10 ml aquadest pada 1 gram ekstrak kemudian dipanaskan sampai mendidih selama 5 menit. Setelah itu ditambahkan FeCl_3 1% jika mengalami perubahan warna menjadi biru hijau kehitaman maka positif mengandung tanin.

e. Identifikasi Polifenolat.

Identifikasi polifenolat dilakukan dengan menambahkan ekstrak kemudian 5 ml aquadest kemudian dipanaskan, setelah itu saring untuk mendapatkan filtrat kemudian dinginkan beberapa saat. Setelah itu tambahkan FeCl_3 pada filtrat jika terjadi perubahan warna menjadi biru kehitaman maka positif menunjukkan adanya polifenolat.

f. Identifikasi Kuinon.

Identifikasi kuinon dilakukan dengan menambahkan sebanyak 1 gram ekstrak kemudian tambahkan 10 ml aquades lalu dipanaskan selama 5 menit. Kemudian saring untuk mendapatkan filtrat, filtrat tersebut ditambahkan 2-3 tetes larutan KOH 5%. Jika warna berubah menjadi kuning hingga merah maka positif menunjukkan adanya kuinon.

g. Identifikasi Mono & Sesquiterpenoid.

Identifikasi Mono dan Sesquiterpenoid dilakukan dengan 1 gram ekstrak ditambahkan 5 ml eter kemudian digerus, setelah itu pindahkan kepada cawan penguap tunggu hingga filtrat mengering, jika sudah mengering tambahkan panilin 10% dan H_2SO_4 pekat. Jika terjadi perubahan warna maka sampel tersebut positif mengandung Mono & Sesquiterpenoid.

h. Identifikasi Triterpenoid & Steroid.

Identifikasi Triterpenoid dan Steroid dilakukan dengan sebanyak 1 gram ekstrak ditambahkan 5 ml eter kemudian digerus, setelah itu pindahkan kepada cawan penguap tunggu hingga filtrat mengering lalu ditambahkan 3 tetes H_2SO_4 pekat. Positif jika terjadi perubahan warna.

3.5.5. Penentuan Dosis

Volume pemberian sediaan uji pada mencit maksimal 1 ml (BPOM,2014). Volume pemberian CMC-Na pada mencit ialah 0,3-1 ml. Volume pemberian yang diberikan terhadap hewan uji pada penelitian ini adalah 0,5 ml.

a. Dosis CMC-Na 0,5%.

Dosis CMC-Na 0,5% yang diberikan adalah sebesar 0,5 mL pada kelompok pelarut.

b. Dosis sediaan uji.

Dosis yang digunakan pada penelitian ini menggunakan metode *fixed dose* yaitu dengan dosis 5, 50, 300, dan 2000 mg/kg BB dan dilanjutkan dengan uji batas dengan dosis 5000 mg/kg BB mencit (BPOM, 2014).

3.5.6. Uji Efek Toksisitas

Mencit yang telah diaklimasi selama satu minggu lebih di dalam laboratorium ditimbang dan masing-masing mencit diberikan tanda pada badannya. Mencit yang dipakai pada penelitian ini sebanyak 35 ekor yang masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor mencit. Mencit yang digunakan adalah mencit putih betina berumur 6-8 minggu dengan bobot minimal 20 g yang diperoleh dari Mitra Putra Animal.

- Kelompok Kontrol : Kontrol normal dan kontrol pelarut
- Kelompok Perlakuan : Dosis 5 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, 300 mg/kg BB, dan 2000 mg/kg BB
- Kelompok Batas : Dosis 5000 mg/kg BB

Mencit yang sudah ditimbang dan dikelompokkan akan diberikan sediaan uji yang sesuai dengan dosis yang sudah ditentukan, kemudian diamati selama 24 jam gejala klinis apa yang terjadi jika tidak ada kematian, percobaan dilanjutkan hingga 7-14 hari kedepan untuk mendapatkan data berat badan dari mencit. Gejala klinis dilihat dari perubahan perilaku dari hewan uji yang tidak seperti biasanya.

Pengamatan akan dilanjutkan hingga hari ke-14. Pada saat hari ke-5, hari ke-10 dan hari ke-14 berat badan mencit akan ditimbang lagi untuk memperoleh data bobot organ. Jika 14 hari sudah berlalu dan mencit masih hidup, maka akan dikorbankan dengan cara dislokasi leher, selanjutnya akan dibedah untuk dilakukan pengamatan makropatologi organ. Pada pengamatan makropatologi ini organ yang akan diamati secara makroskopik dan bobonya yaitu meliputi jantung, ginjal, paru-paru, ginjal, hati, lambung dan usus kemudian ditimbang lagi dan dihitung indeks massa organnya. Induk organ mencit dapat dihitung sebagai berikut :
$$\text{Indeks organ} = \frac{\text{berat organ mencit}}{\text{berat badan mencit}}$$

3.6. Analisis Data

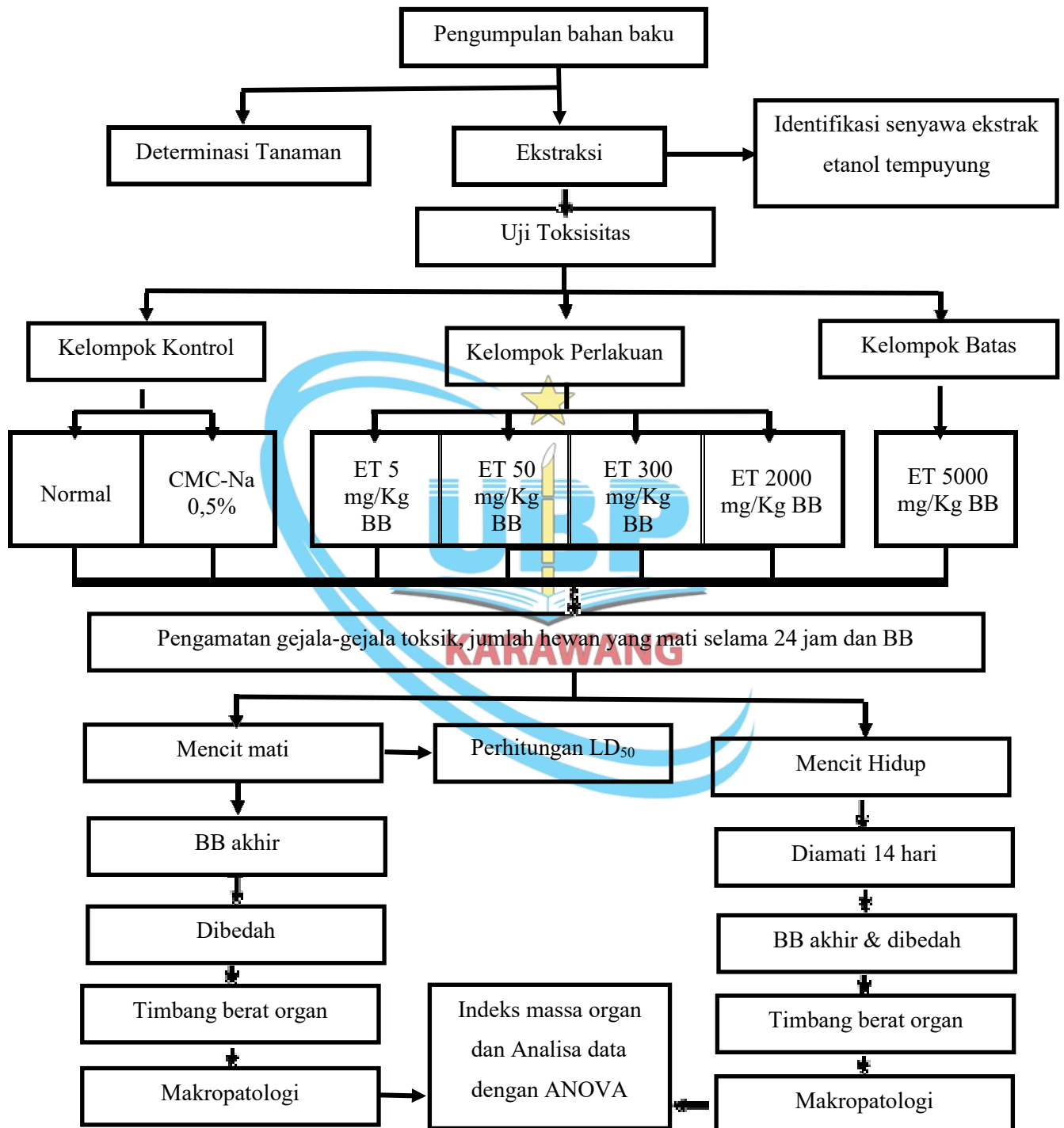
Data yang diperoleh dari penelitian uji toksisitas akut ialah perubahan perilaku, LD₅₀, berat badan, indeks organ, dan makropatologi. Data yang akan dianalisis dengan SPSS adalah berat badan dan indeks organ. Untuk data LD₅₀ akan dianalisis dengan rumus yang sudah ditentukan yaitu menggunakan metode probit. Setelah 14 hari pemberian ekstrak dilakukan pemeriksaan makropatologi pada organ setiap hewan uji yaitu pada kelompok normal, kelompok pelarut dan kelompok hewan uji yang diberikan perlakuan kemudian data yang diperoleh digunakan untuk mengevaluasi ketoksikan pada organ mencit.

Data berat badan mencit dan indeks berat organ mencit yang diperoleh akan diuji kenormalannya dengan uji normalitas *Kolmogorov Smirnov*

kemudian dilanjutkan dengan uji homogenitas *levene statistic*. Kemudian dilanjutkan dengan uji ANOVA jika data tidak diterima $P < 0.05$ maka dilanjutkan dengan *Kruskal Wallis* jika data diterima dengan nilai signifikan $P < 0,05$ maka data dapat diuji dengan *Post-Hoc LSD (Least Significant Difference)* untuk mengetahui perbedaan data antara setiap kelompok uji.



3.7. Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.2 Diagram Alir Penelitian

*Keterangan : ET = Ekstrak Tempuyung