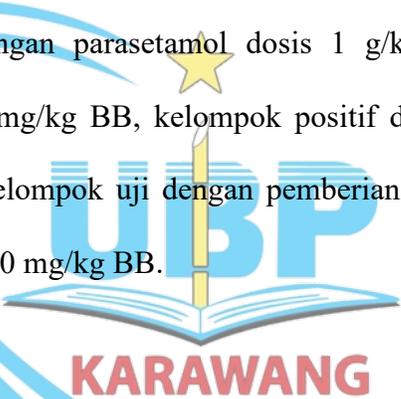


## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Menggunakan desain penelitian *post-test control-only* dengan menggunakan eksperimen laboratorium dan tikus putih jantan galur wistar sebagai hewan uji. Hewan uji dikelompokkan menjadi 6 kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol negatif yang diinduksi dengan parasetamol dosis 1 g/kg BB, kelompok positif silimarin dengan dosis 50 mg/kg BB, kelompok positif dua yang diberi kurkumin dosis 50 mg/kg BB, dan kelompok uji dengan pemberian ekstrak etanol daun cep-  
cepan dosis 100, 200 dan 400 mg/kg BB.

#### 3.2 Sampel

Sampel pada penelitian ini yaitu tikus putih jantan galur wistar kemudian dirandomisasi menggunakan excel dan hewan uji dikelompokkan.

### 3.3 Bahan dan Alat Penelitian

#### 3.3.1 Bahan

Bahan pada penelitian ini antara lain daun kering cep-cepan , paracetamol (PT. Kimia Farma®), obat standar silymarin (Liparin 140 mg®) dan kurkumin, etanol 70%, aquadest, *Pulvis Gummi Arabicum* (PGA), reagen albumin ((*buffer sitrat, bromocresol green* (PT.Sali Polapa Bersama®)), larutan standar ((natrium azida (PT.Sali Polapa Bersama®)), reagen TPR ((natrium hidroksida, kalium natrium tartrat , kalium tartrat ,kupri sulfat (PT.Sali Polapa Bersama®)).

#### 3.3.2 Alat

Alat pada penelitian ini yaitu mortir dan stamper(Onemed®), Pompa Vakum (DOA P504.BN®), corong bushner(Herma®), rotary evaporator(Eyela®), tabung reaksi (Pyrex®), beaker glass (Herma®), batang pengaduk (Rofa®), sonde (Onemed®), handscoon (Sensi latex®), spuit 5 cc (Onemed®), fotometer (Humalyzer 2008®), sentrifugasi (DLAB®), mikropipet (Thermo Scientific®), tabung edta (IVEN®), pipa hematokrit(Marienfeld®), kuvet (Germany®).

### 3.4 Variabel Penelitian

#### 3.4.1 Klasifikasi Variabel

##### a. Variabel bebas

Variabel bebas penelitian ini yaitu ekstrak etanol daun cep-cepan dengan beberapa variasi dosis yang berbeda.

## b. Variabel terikat

Variabel terikat penelitian ini yaitu kadar total protein dan albumin tikus jantan putih galur wistar.

### 3.4.2 Definisi operasional variabel

Berikut tabel definisi operasional variabel pada penelitian ini, yaitu:

**Tabel 3.1.** Definisi Operasional Variabel

<b>No</b>	<b>Variabel</b>	<b>Definisi</b>	<b>Alat ukur</b>	<b>Skala</b>	<b>Hasil ukur</b>
1	Variabel bebas Dosis ekstrak etanol daun Cep-cepan	6 kelompok - perlakuan dengan menggunakan obat silymarin, obat kurkumin, penginduksi dan 3 kelompok terapi ekstrak etanol dengan dosis yang bervariasi.		Nominal	1. K - = Kontrol negative dosis parasetamol 1 g/KgBB 2. Kontrol Positif satu silymarin dosis 50 mg/KgBB. 3. K+ 2 = Kontrol Positif dua Kurkumin dosis 50 mg/KgBB. 4. C5 = kelompok terapi dosis 100 mg/KgBB 5. C10 = kelompok terapi dosis 200 mg/KgBB 6. C15 = kelompok terapi dosis 400 mg/KgBB
2	Variabel terikat				

Total protein	Mengukur protein total yang dilakukan dengan alat fotometer	Fotometer	Interval	1. Rendah 2. Normal
Albumin	Mengukur albumin yang dilakukan dengan alat fotometer	Fotometer	Interval	1. Rendah 2. Normal

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Preparasi Sampel

##### 1. Pembuatan Ekstrak dengan Metode Maserasi

Daun cep-cepan serbuk (2 kg) dimaserasi secara menyeluruh dalam etanol 70% selama 72 jam. Ekstrak cair yang didapat kemudian dikentalkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C untuk menghasilkan konsentrat sekitar 9,87% (bobot tetap ekstrak dibagi bobot simplisia dikalikan 100%). Ekstrak disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan untuk percobaan. Ekstrak etanol kering dilarutkan dalam air suling untuk membuat berbagai dosis (Alkandahri, 2019).

##### 2. Pembuatan Larutan Induksi Parasetamol

Karena sifatnya tidak larut air maka digunakan gom arab untuk membuat larutan suspensi (Depkes R1,1995). Menimbang seksama 1g/KgBB

serbuk parasetamol kemudian dilarutkan dengan PGA 1% dalam beaker glass aduk ad homogen dan diberikan secara oral.

### 3. Pembuatan Larutan Baku Kurkumin

Karena sifatnya tidak larut air maka digunakan gom arab untuk membuat larutan suspensi (Kiso,1985). Menimbang seksama 50 mg/KgBB serbuk baku kurkumin kemudian dilarutkan dengan PGA 1% dalam beaker glass aduk ad homogen dan diberikan secara oral.

### 4. Pembuatan Larutan Baku Silymarin

Menimbang seksama 50 mg/KgBB serbuk baku kurkumin kemudian dilarutkan dengan PGA 1% dalam beaker glass aduk ad homogen dan diberikan secara oral.

### 5. Pengukuran Sampel

Inkubasi sampel selama 5-10 menit. Ukur blanko, sampel, dan larutan standar pada panjang gelombang tertentu. Blanko, sampel, dan larutan standar dianalisis sampai terdapat hasil berupa struk pada instrumen. (Weichselbaum *et al*,1946)

## 3.5.2 Prosedur

### 1. Pengelompokan Perlakuan Pada Tikus

Penelitian ini menggunakan Tikus albino jantan galur wistar sebagai hewan percobaan dengan berat sekitar 200-250 g dan umur 18-20 minggu. Menggunakan hewan uji 18 ekor tikus diacak secara randomisasi menjadi 6

kelompok percobaan yang setaip kelompok 3 ekor tikus. Kelompok pertama yaitu kelompok kontrol negatif yang diinduksi parasetamol dengan dosis 1 g/KgBB, kelompok kontrol positif satu obat standar silymarin dosis 50 mg/KgBB, kelompok kontrol positif dua obat kurkumin dosis 50 mg/KgBB, kemudian kelompok uji pemberian ekstrak etanol daun cep-cepan dengan dosis 100, 200 dan 400 mg/KgBB. Hari ke 1-14 kelompok kontrol negatif hanya diberi minum dan makan ad libitum, kontrol positif satu diberi silymarin 50mg/KgBB, kontrol positif dua diberi kurkumin 50 mg/KgBB, kelompok kontrol negatif yang diinduksi parasetamol dosis 1 g/KgBB, kelompok uji pemberian ekstrak dosis 100, 200 dan 400 mg/KgB. Hari 15-21 semua kelompok perlakuan diberi induksi parasetamol 1 g/KgBB dilanjutkan dengan pemberian obat kurkumin, silymarin dan ekstrak etanol daun cep-cepan.

## **2. Randomisasi Hewan Uji**

Hewan uji ditandai dengan angka 1 sampai 18 pada ekor hewan uji selanjutnya randomisasi hewan uji menggunakan excel dengan rumus  $=\text{RAND}()$ , kemudian di sort berdasarkan angka untuk pengelompokkan hewan percobaan.

## **3. Pengambilan Sampel Darah Hewan Uji**

Pada hari ke-22, sampel darah tikus dibagian sinus orbitalis mata menggunakan tabung hematokrit , kemudian sampel darah dimasukkan ke

dalam tabung EDTA. Selanjutnya darah yang didapat disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan plasma dan serum.

#### 4. Pengukuran Aktivitas Total Protein dan Albumin

##### a. Total Protein

**Tabel 3.2.** Pengukuran Total Protein

Pipet ke dalam kuvet	Larutan Blanko ( $\mu\text{L}$ )	Larutan sampel dan Larutan standart ( $\mu\text{L}$ )
Sampel serum darah - dan Larutan Standart	-	20
Reagen TPR	1000	1000

Diambil sebanyak 20  $\mu\text{L}$  serum darah ke dalam larutan standart dan larutan sampel, sedangkan pada larutan blanko (tanpa sampel) diambil 10  $\mu\text{L}$  aquadest. Kemudian tambahkan 1000 $\mu\text{L}$  pada setiap larutan , kemudian menginkubasi sekitar 10 menit dengan suhu 20-25  $^{\circ}\text{C}$ , selanjutnya mengukur absorbansi sampel. Baca hasil pengukuran total protein pada alat photometer. (Weichselbaum *et al*,1946).

##### b. Albumin

**Tabel 3.3.** Pengukuran Albumin

Pipet ke dalam kuvet	Larutan Blanko ( $\mu\text{L}$ )	Larutan sampel dan Larutan standart ( $\mu\text{L}$ )
Sampel serum darah - dan Larutan Standart	-	10
Reagen TPR	1000	1000

Diambil sebanyak 10  $\mu\text{L}$  serum darah ke dalam larutan standart dan larutan sampel, sedangkan pada larutan blanko (tanpa sampel) diambil 10  $\mu\text{L}$  aquadest. Kemudian tambahkan 1000 $\mu\text{L}$  pada setiap larutan, kemudian dilakukan inkubasi selama 5 menit dengan suhu 20-25  $^{\circ}\text{C}$ . Baca hasil pengukuran total albumin pada alat photometer (Doumas *et al.*, 1971 ; Rodkey, 1964).

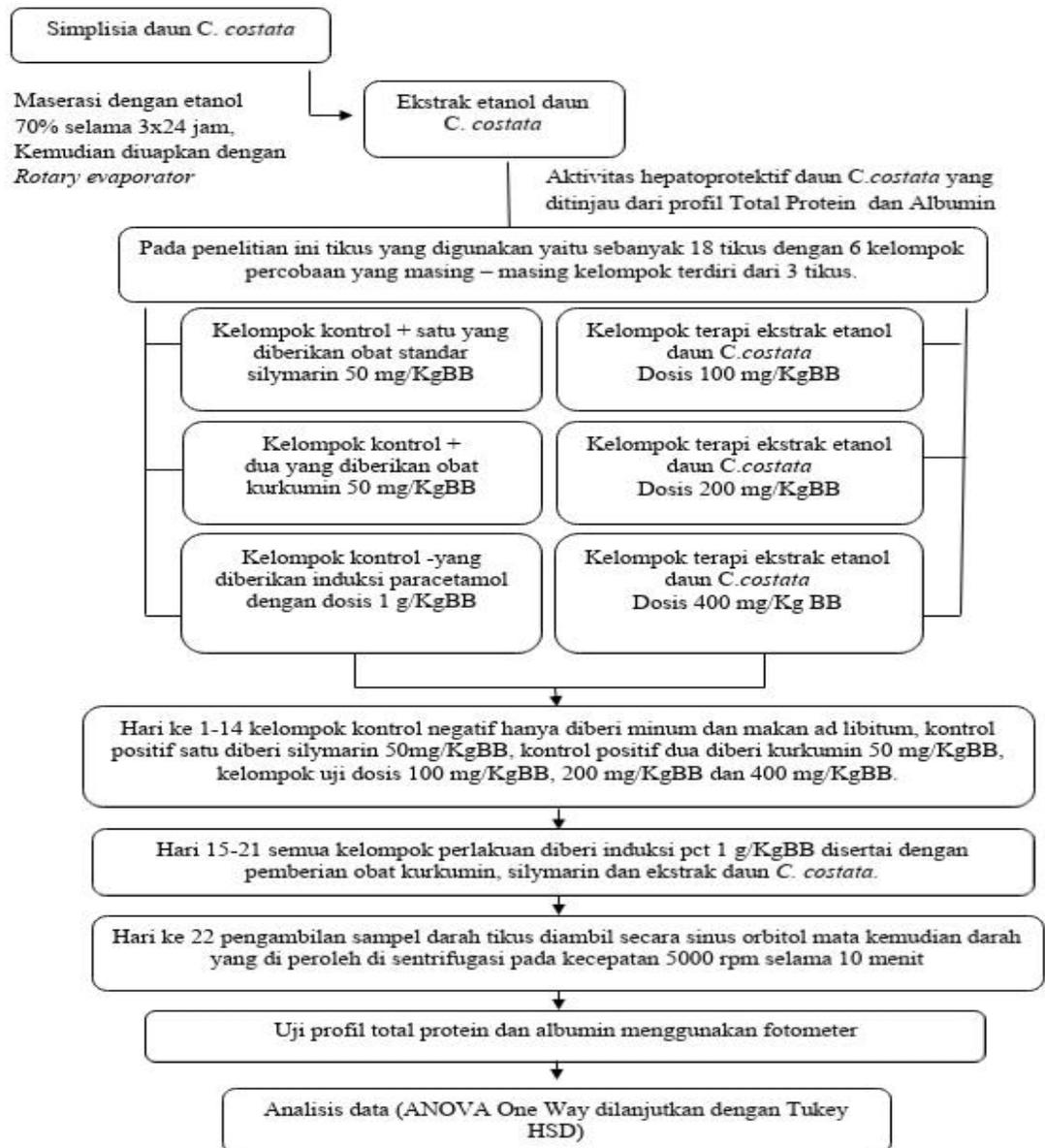
### 5. Cara Kerja Alat Fotometer

1. Klik menu
2. Kemudian klik 99 dan enter untuk memunculkan kode yang akan di uji
3. Kalibrasi fotometer
4. Selanjutnya klik menu kembali, pilih kode sesuai yang ingin diuji (albumin 1, total protein 21) dan enter.
5. Membuat larutan blanko, larutan standart dan larutan sampel kemudian inkubasi selama 5 menit.
6. Semua larutan sudah diinkubasi, kemudian tunggu perintah dari fotometer untuk membaca sampel.
7. Hasil data berupa struk.

### 3.6 Analisis Data

Data yang telah didapat kemudian dianalisis menggunakan ANOVA dilanjutkan dengan Tukey's HSD untuk melihat apakah perbedaan kadar protein total dan albumin antar kelompok bermakna.

### 3.7 Skema Penelitian



Gambar 3.1 Skema Penelitian