

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah jenis penelitian eksperimental laboratorium dengan penelitian *posttest control group design* dan rancangan penelitian quasi eksperimental.

3.2 Populasi Dan Sampel

3.2.1 Populasi

Dua puluh empat ekor tikus putih jantan galur wistar dan empat dosis ekstrak selama 14 hari percobaan meliputi 6 kelompok terdiri dari 3 tikus dari setiap kelompok. Kelompok satu yaitu kelompok kontrol negatif satu yang diberikan parasetamol 1000mg/kgBB, kelompok 2 yaitu kelompok kontrol positif 1 yang diberikan kurkumin 50 mg/Kg BB, kelompok tiga yaitu kelompok positif 2 yang berikan silymarin 50 mg/KgBB kelompok empat, lima, enam yaitu kelompok uji ekstrak daun *C.costata* dengan dosis 100, 200 dan 400 mg/KgBB

3.2.2 Sampel

Ekstrak etanol daun Cep – cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A.DC)

3.3 Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi Universits Buana Perjuangan Karawang selama kurang lebih 1 bulan yaitu dari juni sampai Juli 2022.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan adalah bak plastik, penutup kawat, tempat makan tikus, botol minum tikus, bejana maserasi, corong bushner, kertas saring, , gelas kimia, gelas ukur, batang pengaduk, *rotary evaporator*, sonde oral, *handscoon*, spuit 1 cc dan tabung *effendrof*, mikro pipet 100-1000 μL , *blu tip*, tabung reaksi, pipa hematokrit, sentrifugator, *photometer humalyzer 2000*.

3.4.2 Bahan

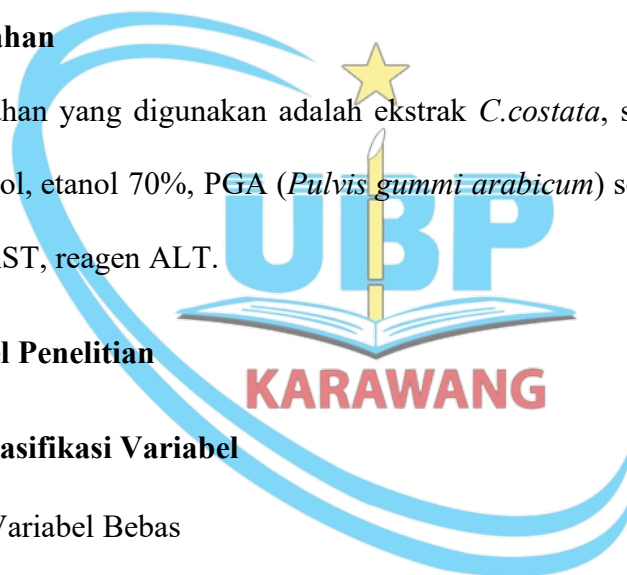
Bahan yang digunakan adalah ekstrak *C.costata*, silymarin, kurkumin, parasetamol, etanol 70%, PGA (*Pulvis gummi arabicum*) serum darah 2000 μL , reagen AST, reagen ALT.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Klasifikasi Variabel

3.5.1.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang terlibat pada penelitian ini yaitu pengujian hepatoprotektif dengan menggunakan ekstrak etanol daun *C.costata* yang diberikan kepada tikus percobaan dengan enam kelompok percobaan meliputi kelompok satu yaitu kelompok kontrol positif satu, kelompok kontrol positif dua, kelompok kontrol negatif, dan kelompok empat, lima dan enam kelompok uji ekstrak daun *C.costata* dengan dosis berbeda-beda.



3.5.1.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pengujian *Aspartarte aminotransferase* (AST) dan *Alanine aminotransferase* (ALT) pada sampel serum darah menggunakan alat fotometer.

3.5.2 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No.	Definisi	Variabel	Alat ukur	Skala	Hasil ukur
Variabel bebas					
1	Dosis ekstrak Etanol daun cep – cepan	menggunakan ekstrak daun yang diberikan kepada tikus percobaan dengan enam kelompok percobaan meliputi kelompok kontrol (+) satu kurkumin 50 mg/KgBB, kontrol (+) dua silymarin 50 mg/KgBB, kelompok kontrol negatif parasetamol	Pengujian kadar <i>Aspartarte aminotransf erase</i> (AST) dan <i>Alanine aminotransf erase</i> (ALT)menggunakan fotometer (humalyzer 2000)	Nomina 1	1. K- (parasetamol 1000 mg/KgBB) 2. K+ (kurkumin 50 mg/KgBB) 3. K+ (silymarin 50 mg/KgBB) 4. Perlakuan 1 (ekstrak etanol daun <i>C. costata</i> Dosis 100 mg/KgBB) 5. Perlakuan 2 (ekstrak etanol daun <i>C. costata</i> Dosis 200 mg/KgBB) 6. Perlakuan 3 (ekstrak etanol

1000 mg/KgBB	daun <i>C. Costata</i>
dan kelompok	Dosis 400
uji dosis 1,2 dan	mg/KgBB)
3	

Variabel terikat

1	Uji <i>Aspartate aminotransferase (AST)</i>	Pengujian serum darah tikus yang diuji menggunakan Fotometer (<i>Humalyzer 2000</i>)	Fotometer (<i>Humalyzer 2000</i>)	Interval	1. Normal 2. Tinggi
2	Uji <i>Alanine aminotransferase (ALT)</i>	Pengujian serum darah tikus yang diuji menggunakan Fotometer (<i>Humalyzer 2000</i>)	Fotometer (<i>Humalyzer 2000</i>)	Interval	1. Normal 2. Tinggi

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Tahap Persiapan Sampel

Satu Kg serbuk daun *C. costata* dimaserasi selama 72 jam dalam etanol 70%. Setelah ekstrak cair diperoleh dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dan untuk mendapatkan ekstrak kental selanjutnya dipanaskan pada *waterbath* pada suhu 40 °C . Simpan Ekstrak pada suhu 4°C

sebelum digunakan untuk percobaan. Untuk membuat berbagai dosis suspensi ekstrak etanol dilarutkan dalam air suling. Dihitung persentase rendemen ekstrak (Maulana Yusuf Alkandahri *et al.*, 2019).

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

3.6.2 Pembuatan Suspensi Kurkumin

PGA dibuat menjadi larutan PGA 1% dengan cara 1 gram PGA kemudian larutkan dalam air sampai volume 100 ml. Larutan ini digunakan sebagai pelarut kurkumin. Suspensi kurkumin dalam PGA 1% dibuat dengan cara melarutkan sejumlah gram kurkumin yang telah ditimbang ke dalam PGA 1% sebanyak 1 ml, suspensi kurkumin dengan volume 1 ml tersebut yang diberikan pada tikus.

3.6.3 Pembuatan Suspensi Silymarin

PGA dibuat menjadi larutan PGA 1% dengan cara 1 gram PGA kemudian larutkan dalam air sampai volume 100 ml. Larutan ini digunakan sebagai pelarut silymarin. Suspensi silymarin dalam PGA 1% dibuat dengan cara melarutkan sejumlah gram silymarin yang telah ditimbang ke dalam PGA 1% sebanyak 1 ml, suspensi silymarin dengan volume 1 ml tersebut yang diberikan pada tikus.

3.6.4 Pembuatan Suspensi Ekstrak Etanol *C.costata*

PGA dibuat menjadi larutan PGA 1% dengan cara 1 gram PGA kemudian larutkan dalam air sampai volume 100 ml. Larutan ini digunakan sebagai pelarut ekstrak etanol daun *C.costata*. Suspensi kurkumin dalam PGA

1% dibuat dengan cara melarutkan sejumlah gram ekstrak etanol daun *C.costata* yang telah ditimbang ke dalam PGA 1% sebanyak 1 ml, suspensi ekstrak etanol daun *C.costata* dengan volume 1 ml tersebut yang diberikan pada tikus.

3.6.5 Pembuatan Suspensi Parasetamol

PGA dibuat menjadi larutan PGA 1% dengan cara 1 gram PGA kemudian larutkan dalam air hingga menjadi 100 ml. Larutan ini digunakan sebagai pembawa parasetamol. Suspensi parasetamol dalam PGA 1% dibuat dengan melarutkan beberapa gram parasetamol yang ditimbang dalam PGA 1% dalam jumlah hingga 1 ml, suspensi parasetamol dengan volume 1 ml tersebut yang diberikan pada tikus.

3.6.6 Pengelompokan Dan Perlakuan Pada Tikus

Pada penelitian ini tikus yang digunakan yaitu tikus putih jantan galur wistar sebanyak 18 tikus dengan 6 kelompok percobaan yang masing – masing kelompok terdiri dari 3 tikus.

Tabel 3.2 Pengelompokan hewan uji

Kelompok	Perlakuan			
I. Kontrol Negatif	Suspensi	parasetamol	dosis	
	1000mg/KgBB diberikan pada hari ke 15 – 21			
II. Kontrol Positif 1	Kurkumin	dosis	50	mg/KgBB
	diberikan pada hari ke 1 – 21			
III. Kontrol positif 2	Silymarin	dosis	50	mg/KgBB
	diberikan pada hari ke 1 – 21			

IV. Ekstrak Dosis 1	Ekstrak <i>C. costata</i> dosis 100 mg/KgBB diberikan pada hari ke 1 – 21
V. Ekstrak dosis 2	Ekstrak <i>C. costata</i> dosis 200 mg/KgBB diberikan selama 21 hari
VI. Ekstrak dosis 3	Ekstrak <i>C. costata</i> dosis 400 mg/KgBB diberikan pada hari ke 1 – 21

Tikus di aklimatisasikan selama 7 hari agar terbiasa dengan kondisi laboratorium. Penelitian dilakukan selama 21 hari. Selama 14 hari tikus diberikan obat sesuai dengan perlakuannya. Yaitu silymarin, kurkumin dan ketiga dosis ekstrak etanol *C. costata*. 7 hari selanjutnya diberikan induksi parasetamol dan tetap dilanjutkan dengan pemberian silymarin, kurkumin dan ketiga ekstrak *C. costata* dan pemberian parasetamol pada kontrol negatif. pada hari ke 22 sampel darah tikus diambil dan dilakukan sentrifugasi agar didapatkan serum darah untuk selanjutnya dilakukan pengujian kadar *Aspartate aminotransferase* (AST) dan *Alanine aminotransferase* (ALT) menggunakan fotometer.

3.6.7 Preparasi Serum

Pada akhir penelitian (hari ke 22), semua hewan uji dibius dengan kloroform dalam wadah tertutup. Pengambilan darah dilakukan melalui orbitalis mata. Darah ditampung didalam tabung *effendrof* dengan mengalirkannya secara perlahan – lahan melalui dinding tabung, lalu disentrifugasi (Pertiwi & Widyaningsih, 2015). selama 5 menit dengan kecepatan 7000 rpm. Bagian serum kemudian dikumpulkan untuk dianalisis menggunakan reagen AST dan ALT menggunakan fotometer.

3.6.8 Pengukuran Kadar AST dan ALT

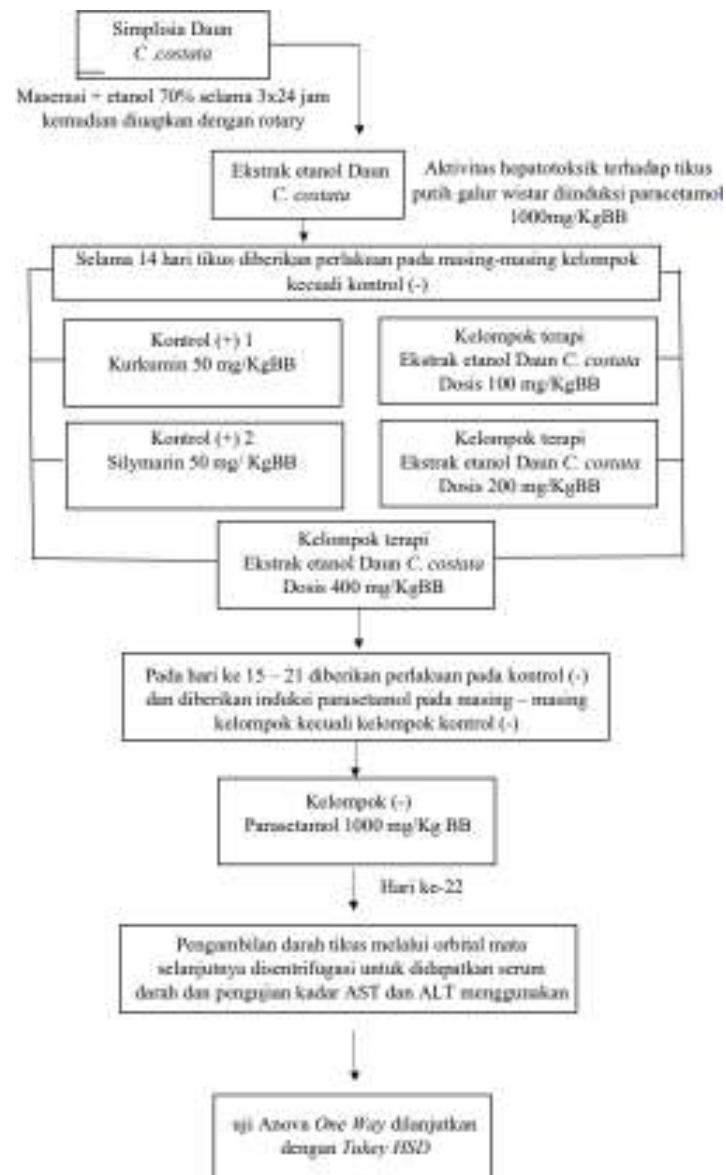
Pemeriksaan AST dan ALT menggunakan reagen AST dan ALT dengan alat *auto chemistry analyzer* dan metode kinetik IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*) dengan prosedur pengujian sebagai berikut :

Tabel 3.3. Persipan larutan untuk pengukuran kadar AST dan ALT

Perlakuan	<i>Working</i> <i>Reagen (mL)</i>	Blanko (μL)	Sampel (μL)
Buffer	8	-	-
Substrat	2	-	-
<i>Working</i> <i>Reagen</i>	-	1.000	1.000
Sampel serum	-		100

Setelah masing masing reagen dicampurkan sampel harus langsung diukur kadar AST dan ALT menggunakan fotometer dengan panjang gelombang 340 nm.

3.7 Skema Penelitian



Gambar 3.1 Skema Penelitian

3.8 Analisis Data

Menggunakan program SPSS v.16 dengan uji Anova *One Way* dengan tingkat kepercayaan 95% dilanjutkan dengan *Tukey HSD* untuk melihat perubahan (penurunan) kadar AST dan ALT pada serum darah.