

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium, dengan design penelitian yaitu *post test only control group design*.

3.2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar sebanyak 18 ekor yang dibagi menjadi 6 kelompok percobaan dengan randomisasi menggunakan excel (RAND).

3.3. Bahan dan Alat

3.3.1. Bahan

Tikus putih jantan galur wistar 18 ekor, ekstrak daun cep-cepan, etanol 70%, parasetamol (Holi), PGA, aquadest, silymarin (Liparin), *curcumin* (global merchants), reagen *triglycerides liquicolor* GPO-PAP (Human), reagen *urea liquicolor* (Human), kontrol humatrol N (Human).

3.3.2 Alat

Tabung reaksi (Pyrex), Gelas ukur (Pyrex), *Beakerglass* (Pyrex), Pipa Kapiler Hematokrit (Marienfeld), Tabung eppendorf 1,5 ml (Onemed), Rak tabung, Corong buchner, Kertas saring, Motir, Stamper, Batang pengaduk, Handscone, Sonde oral, Sput, Mikro pipet 5-10 μ l dan 100-1.000 μ l (Dragonlab), *White tip*, *Blue*

tip, Timbangan analitik (Mettler Toledo), Bejana maserasi, Rotaryevaporator, Sentrifugasi (Dlab), dan fotometer (*humalyzer 2000*).

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu pengujian hepatoprotektif yang diberikan kepada tikus meliputi: kelompok I kontrol negatif (induksi parasetamol 1000 mg/kgBB), kelompok II kontrol positif 1 (Kurkumin 50 mg/kgBB), kelompok III kontrol positif 2 (Silymarin 50 mg/kgBB), kelompok IV, V, VI uji dosis ekstrak etanol daun cep-cepan dengan dosis 100, 200, dan 400 mg/kgBB.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar trigliserida (TG) dan urea.

3.4.3 Definisi Operasional Variabel

Berikut ini adalah tabel definisi operasional variabel yang terdapat pada penelitian ini, yaitu:

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil ukur
Variabel Bebas					
1	Uji Hepatoprotektif Ekstrak Daun Cep-cepan (<i>C. costata</i>)	Ekstrak etanol daun cep-cepan yang diberikan peroral kepada tikus percobaan yang dibagi menjadi 6	Pengujian kadar Trigliserida (TG) dan Urea	Nominal	1. K- = Kontrol Negatif parasetamol 1000mg/kgBB 2. K+1 = Kontrol Positif I Kurkumin 50mg/kg BB

kelompok secara acak meliputi: kelompok kontrol negatif (parasetamol) 1000mg/kgBB, kelompok kontrol positif 1 (kurkumin) 50mg/kgbb, kelompok kontrol positif 2 (silymarin) 50mg/kgbb, kelompok uji dosis ekstrak etanol daun <i>C.costata</i> dosis 100, 200, dan 400 mg/kgBB.					3. K+2 = Kontrol Positif II Silymarin 50mg/kg BB 4. D5 = Kelompok Ekstrak Etanol Daun Cep- cepan 100mg/kg BB 5. D10= Kelompok Ekstrak Etanol Daun Cep- cepan 200mg/kgBB 6. D15 = Kelompok Ekstrak Etanol Daun Cep- cepan 400mg/kgBB
Variabel Terikat					
2	Trigliserida (TG)	Pengujian serum darah tikus menggunakan Fotometer	Fotometer	Interval	1. Normal ≤ 150 mg/dL 2. Ambang Batas $\geq 150-199$ mg/Dl 3. Batas Tinggi ≥ 200 mg/dL
3	Urea	Pengujian serum darah tikus menggunakan Fotometer.	Fotometer	Interval	1. Rendah $\leq 13,9$ mg/dL 2. Normal 13,9-28,3mg/dL 3. Tinggi $\geq 28,3$ mg/dL

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Tahap Persiapan Sampel

Daun cep-cepan dikumpulkan dari hutan Tangkahan Taman Nasional Gunung Leuser, Kabupaten Langkat, Sumatera Utara dan diangkut ke Laboratorium Taksonomi Tumbuhan untuk determinasi. Tumbuhan tersebut diidentifikasi sebagai *C. costata* oleh Unit Herbarium Jatinangor, Departemen Biologi, Fakultas MIPA Universitas Padjadjaran.

3.5.2 Proses Ekstraksi

Metode yang dipakai adalah ekstraksi dingin yaitu maserasi dengan pelarut etanol 70%. Simplisia daun cep-cepan yang telah menjadi serbuk ditimbang sebanyak 1 kg dan dimaserasi secara menyeluruh dalam etanol 70% selama 72 jam. Akan diperoleh ekstrak cair menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dan dipekatkan menggunakan *waterbath* pada suhu 70°C hingga didapatkan ekstrak kental. Dihitung presentasi rendemen ekstrak diperoleh (Alkandahri *et al.*, 2019):

$$\text{Rendemen \%} = \frac{\text{Berat hasil ekstraksi}}{\text{Berat bahan yang diekstrak}} \times 100\%$$

Ekstrak disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan untuk percobaan. Ekstrak etanol kering dilarutkan dalam air suling untuk membuat berbagai dosis (Alkandahri *et al.*, 2019).

3.5.3 Pembuatan Induksi

Induksi hepatotoksik yaitu dengan diberikan parasetamol yang disuspensikan dalam PGA 1%. PGA dibuat menjadi larutan PGA 1% dengan cara melarutkan 1 gr

PGA kedalam aquades sampai volume 100 ml lalu aduk sampai homogen. Perbandingan aquadest dengan PGA yaitu 100:1 Suspensi parasetamol dibuat dengan cara melarutkan sejumlah gram parasetamol kedalam larutan PGA 1% ad homogen (Steelynes *et al.*, 2019).

3.5.4 Randomisasi Hewan Uji

Hewan uji diberi tanda dengan angka 1 sampai 18 pada bagian punggung, selanjutnya randomisasi menggunakan excel dengan rumus =(RAND) dan kemudian di sort berdasarkan angka untuk pengelompokkan perlakuan.

3.5.5 Perlakuan pada Tikus

Disiapkan 18 ekor tikus putih jantan galur wistar yang dibagi menjadi 6 kelompok secara acak, setiap kelompok terdiri dari 3 ekor sebagai ulangan, dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 3.2 Perlakuan Pada Tikus

Kelompok	Perlakuan
Kontrol Negatif (K-)	Parasetamol 1000mg/kg BB (sebagai penginduksi)
Kontrol Positif 1 (K+1)	Kurkumin 50mg/kg BB dan diberi parasetamol 1000mg/kg BB (sebagai penginduksi)
Kontrol Positif 2 (K+2)	Silymrin 50mg/kg BB dan diberi parasetamol 1000mg/kg BB (sebagai penginduksi)
Ekstrak Dosis 1 (D5)	Ekstrak Etanol Daun Cep-cepan 100 mg/kg BB dan diberi parasetamol 1000mg/kgBB (sebagai penginduksi).

Ekstrak (D10)	Dosis 2	Ekstrak Etanol Daun Cep-cepan 200 mg/kg BB dan diberi parasetamol 1000mg/kgBB (sebagai penginduksi).
Ekstrak (D15)	Dosis 3	Ekstrak Etanol Daun Cep-cepan 400 mg/kg BB dan diberi parasetamol 1000mg/kgBB (sebagai penginduksi).

Selama 14 hari, semua kelompok kontrol (+) dan kelompok uji dosis diberikan masing-masing perlakuannya secara oral, kecuali kontrol negatif. Pada hari ke 15, semua kelompok perlakuan diberikan induksi parasetamol (oral) dan tetap dilanjutkan pemberian silymarin, kurkumin dan ekstrak etanol daun cep-cepan sampai hari ke 21. Kelompok kontrol negatif diberikan perlakuan pada hari ke 15-21 dan hanya diberikan induksi parasetamol 1000mg/kg BB.

3.5.6 Pengambilan Sampel darah

Pada hari terakhir penelitian (hari ke 22), semua hewan dibius menggunakan klorofom yang disimpan pada wadah tertutup, darah diambil dari orbital mata menggunakan pipa hematokrit. Darah ditampung kedalam tabung eppendorf dengan mengalirkannya secara perlahan melalui dinding tabung, dan kemudian disentrifugasi.

3.5.7 Preparasi Serum

Sampel darah yang telah ditampung dalam tabung eppendorf siap untuk disentrifugasi dengan cara memasukkan tabung yang telah berisi sampel darah kedalam alat sentrifugasi dengan posisi saling berhadapan agar seimbang, kemudian hidupkan alat sentrifugasi dengan menekan tombol on yang berada pada bagian

belakang alat tersebut. Alat sentrifugasi yang digunakan ini memiliki kecepatan yang telah ditetapkan yaitu 7000 rpm dan tunggu selama 5 menit, jika sudah selesai matikan alatnya dan ambil tabung eppendorf di dalam alat sentrifugasi. Serum yang sudah siap akan terpisah diatas darah dan berwarna kekuningan, setelah itu pisahkan serum pada tabung lain agar serum tidak tercampur dengan darah dan tidak rusak. Serum yang diperoleh digunakan untuk menentukan aktivitas kadar trigliserida (TG) dan urea/*blood urea nitrogen* (BUN).

3.5.8 Uji Kadar Trigliserida

Metode yang digunakan GPO-PAP (*Glycerol Phosphate Oxydase-Phenyl Aminophyrazolon*). Pada prinsipnya, trigliserida ditentukan setelah hidrolisis enzimatis dan lipase. Indikatornya adalah kuinoneimin yang terbentuk dari hidrogen peroksida, 4-aminoantipirin dan 4-klorofenol di bawah pengaruh katalitik peroksidase.

Tabel 3.3 Persiapan Sampel dan Reagen Trigliserida

Perlakuan	Blanko (µl)	Standar (µl)	Sampel (µl)
Reagen	1000	1000	1000
Standar	-	10	-
Sampel	-	-	10

(Sumber: Kit Reagen Trigliserida Merk Human)

Siapkan larutan-larutan yang akan diukur pada alat fotometer yaitu larutan blanko, larutan standar, dan larutan sampel. Pipetkan reagen TG kedalam masing-masing tabung sebanyak 1000 µl, pada tabung blanko hanya berisikan reagen saja, pada tabung standar yang sudah berisi reagen ditambahkan 10 µl larutan standar,

dan pada tabung sampel yang sudah berisi reagen ditambahkan 10 μ l serum. Kemudian homogenkan semua tabung, inkubasikan pada suhu 20 - 25°C selama 10 menit atau pada suhu 37°C selama 5 menit. Kemudian ukur absorbansi reagen blanko, standar, dan sampel dengan panjang gelombang 546 nm. Baca hasil pada fotometer, gunakan standar trigliserida yang disertakan dalam kit uji atau AUTOCAL [REF] 13160 untuk prosedur otomatis.

3.5.9 Uji Kadar Urea

Metode yang digunakan yaitu bartelhot, yang pada prinsipnya urea dihidrolisa dalam air dan urease dan membentuk ammonia dan CO₂. Dalam reaksi bartelhot, ion-ion ammonium bereaksi dengan hipoklorit dan salisilat membentuk warna hijau.

Persiapan reagen, dengan mencampurkan reagen enzim sebanyak 1 ml kedalam reagen 1 yang berisi 100 ml. Kemudian siapkan larutan-larutan yang akan diukur pada alat fotometer yaitu larutan blanko, larutan standar, dan larutan sampel.

Tabel 3.4 Persiapan Sampel dan Reagen Urea

Perlakuan	Blanko (μ l)	Standar (μ l)	Sampel (μ l)
Reagen 1	1000	1000	1000
Reagen 2	1000	1000	1000
Standar	-	10	-
Sampel	-	-	10

(Sumber: Kit Reagen Trigliserida Merk Human)

Pipetkan reagen 1 kedalam masing-masing tabung sebanyak 1000 μ l, pada tabung blanko hanya berisikan reagen 1, pada tabung standar yang sudah berisi reagen 1 ditambahkan 10 μ l larutan standar, dan pada tabung sampel yang sudah

berisi reagen 1 ditambahkan 10 μ l serum. Homogenkan semua tabung, inkubasikan pada suhu 20 - 25°C selama 10 menit atau pada suhu 37°C selama 5 menit. Selanjutnya tambahkan reagen 2 sebanyak 1000 μ l kedalam masing-masing tabung blanko, standar dan sampel. dan inkubasikan kembali pada suhu 37°C selama 3 menit. Kemudian ukur absorbansi reagen blanko, standar, dan sampel dengan panjang gelombang 546 atau 578 nm (peningkatan absorbansi sebanding dengan konsentrasi urea dalam sampel). Baca konsentrasi urea, gunakan standar yang disertakan dalam tes kit atau AUTOCAL, [REF] 13160 untuk prosedur otomatis.

3.6 Analisis Data

Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan *software* statistik (SPSS v.16). Pertama uji normalitas, apabila data sudah terdistribusi normal maka dilakukan uji Anova *One Way* dan dilanjutkan dengan *Tukey HSD* (uji beda nyata antar perlakuan).

3.7 Alur Penelitian

