

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Desain penelitian *post test control grup* menggunakan metode eksperimental laboratorium dan tikus putih jantan galur wistar sebagai hewan percobaan. Hewan uji dikelompokkan menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif yang diinduksi gentamisin dosis 80 mg/kgBB, kelompok normal hanya diberikan minum dan kelompok eksperimen dengan dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB ekstrak tumbuhan daun cep-cepan (*Catanopsis Costata* (blume) A.DC) di determinasi di herbarium jatinangor departemen biologi FMIPA universitas padjajaran bandung.

3.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar yang kemudian diacak, dan hewan uji dikelompokkan.

3.3 Bahan dan Alat Penelitian

3.3.1 Bahan

Tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) 20 ekor, daun cep-cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A.DC), gentamisin (Sanbe), etanol 70%, aquadest, PGA 1%.

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 1 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 pada penelitian ini yaitu menggunakan ekstrak daun cep-cepan (*C.costata*) dengan beberapa variasi dosis yang berbeda.

b. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu uji kadar kreatinin serum dan albumin terhadap tikus jantan galur wistar.

c. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu bobot tikus, volume pemberian, jenis kelamin, pakan dan minum.

3.4.2 Definisi operasional variabel

Berikut tabel definisi operasional variabel pada penelitian ini, yaitu:

Tabel 3.1. Definisi Operasional Variabel

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
1.	Variabel Bebas	Ada lima kelompok yang terlibat dalam perlakuan ini, termasuk kelompok kontrol negatif yang diberikan gentamisin dosis 80 mg/kg, kelompok normal hanya diberikan minum dan kelompok eksperimen dengan dosis 100	-	Nominal	Hari ke-1 sampai hari ke -3 sebelum di induksi hewan uji diberi ekstrak daun cep-cepan dengan berbagai dosis. Kemudian pada hari ke-4 sampai hari ke-8

		mg/kg, 200 mg/kg dan 400 mg/kg ekstrak.			hewan uji di induksi dengan gentamisin 80 mg/kg secara i.p dan diberikan ekstrak daun cep-cep dengan berbagai dosis.
2.	Variabel Terikat Kadar kreatinin dan albumin.	Mengukur kadar kreatinin serum dan albumin menggunakan alat spektrofotometer Humalyzer 2000	Spektrofotometer Humalyzer 2000	Interval	1. Rendah 2. Normal
3.	Variabel Terkendali	Faktor yang mempengaruhi yaitu faktor fisiologi dari tikus putih galur wistar			Yang dapat mempengaruhi hasil yaitu bobot tikus, volume pemberian, jenis kelamin, pakan dan minum.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Determinasi Tumbuhan

Pada tahap awal penelitian ini, identifikasi dan karakterisasi daun cep-cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A.DC) dilakukan dengan membandingkan karakter morfologi yang terdapat pada literatur. Tumbuhan daun cep-cepan (*Catanopsis Costata* (blume) A.DC) di determinasi di herbarium jatinangor departemen biologi FMIPA universitas padjajaran bandung.

3.5.2 Preparasi Sampel

1. Pembuatan Ekstrak dengan Metode Maserasi

Daun cep-cepan (5 kg) dimaserasi dalam etanol 70% selama 72 jam. Ekstrak cair yang dihasilkan lalu dikonsentrasikan dengan memanfaatkan penguap rotary pada suhu 50°C. Ekstrak disimpan dalam suhu 4°C sebelum digunakan dalam percobaan. Ekstrak etanol kering dilarutkan dalam air suling untuk menyiapkan dosis yang berbeda (Alkandahri, 2019).

$$\text{Rendemen \%} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisa Kering}} \times 100 \%$$

2. Skrining Fitokimia

Analisis fitokimia ekstrak etanol 70% daun Cep-cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A.DC) dilakukan guna mengetahui suatu metabolit sekunder meliputi alkaloid, flavoniod, tanin, saponin, fenolik, Steroid dan Triterpenoid dan Glikosida Antrakuinon (Alkandahri, 2022).

a. Alkaloid

Ekstrak dibasahi dengan amonia encer, dihancurkan dalam mortir, ditambahkan beberapa mL CHCl₃, dan gerus secara bersamaan. Setelah penyaringan. Ditambahkan 5 mL HCl 2N ke dalam filtrat. Lapisan asam dipisahkan kemudian dibagi menjadi tiga bagian. Asam encer ditambahkan ke tabung reaksi pertama, yang berfungsi sebagai blanko. 3 tetes reagen Dragendorff ditambahkan ke tabung reaksi kedua dan 3 tetes reagen Mayer ke tabung reaksi

ketiga. Terbentuknya endapan jingga pada tabung kedua dan terbentuknya endapan putih pada tabung ketiga menunjukkan adanya alkaloid (Abriyani *et al.*, 2021).

b. Flavonoid

Tambahkan hingga 1 ml bubuk magnesium dan 10 tetes asam klorida pekat ke dalam ekstrak. Kehadiran flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam merah, kuning atau oranye. (Abriyani *et al.*, 2022).

c. Tanin

Sebanyak 3 ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diikuti dengan 5 tetes gelatin 1%, adanya warna kuning muda, endapan putih menunjukkan tanin positif (Abriyani *et al.*, 2021).

d. Saponin

Ekstrak dilarutkan dalam air suling yang dipanaskan selama 15 menit, kemudian diguncang dengan keras selama 10 atau 15 detik, apabila terbentuk buih yang kuat selama sekitar 10 menit dan masih ada setelah ditambahkan beberapa tetes HCl 2N, maka sampel dianggap positif mengandung saponin (Abriyani *et al.*, 2022).

e. Fenolik

Tambahkan 1 ml ekstrak ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 10 tetes larutan FeCl₃ 1%. Bukti positif ditunjukkan dengan munculnya warna merah, biru, ungu, hitam atau hijau (Abriyani *et al.*, 2022).

f. Steroid dan Triterpenoid

Sampel dilarutkan dalam eter kemudian ditriturasi, disaring, kemudian diuapkan sampai kering kemudian ditetesi dengan pereaksi *Lieberman Burchard*. Jika hasil positif mengandung triterpenoid, itu ditunjukkan dengan warna ungu dan kelompok steroid ditunjukkan dengan warna biru-hijau (Abriyani *et al.*, 2021).

g. Glikosida Antrakuinon

Beberapa sampel ekstrak etanol dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer etanol ditambahkan sampai terendam, ditambahkan 2 mL larutan FeCl₃ 1%. Ditambahkan asam klorida pekat pH asam direfluks selama 30 menit setelah memasak. setelah dingin masukkan corong pemisah ditambah 10 mL benzena, kocok tambahkan 2 mL larutan NaOH 2 N, diamkan. Lapisan NaOH berwarna merah adanya glikosida antrakuinon (Dasopang, 2017).

3. Pembuatan Induksi Gentamisin

Ditimbang bobot tikus, setelah didapat disesuaikan dengan dosis induksi gentamisin 80 mg/kgBB. Setelah itu diukur volume larutan gentamisin dan diberikan secara intraperitoneal.

3.5.3 Prosedur

1. Pengelompokan Perlakuan Pada Tikus

Tikus jantan galur wistar dengan berat sekitar 200-250 g dan berumur 10-11 minggu digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian ini. Dengan menggunakan hewan uji 20 ekor tikus diacak menjadi 5 kelompok percobaan, masing-masing 4 ekor tikus. Kelompok pertama adalah kontrol normal menggunakan aquadest, kelompok kontrol negatif yang diinduksi gentamisin dengan dosis 80 mg/kg, dilanjutkan dengan kelompok uji yang diberikan ekstrak daun cepcepan dengan dosis 100 mg/kg, 200 mg/kg dan 400 mg/kg. Hari ke-1 sampai hari ke-3 sebelum di induksi hewan uji diberi ekstrak daun *C.costata* dengan 3 dosis yang berbeda. Kemudian pada hari ke-4 sampai hari ke-8 hewan uji di induksi dengan gentamisin 80 mg/kgBB secara intraperitoneal.

2. Pengambilan Sampel Darah Hewan Uji

Pada hari ke-9 tikus diambil darahnya melalui retro-orbital mata. Kemudian dimasukkan kedalam tabung EDTA, setelah itu diukur kadar kreatinin serum dan albumin menggunakan kit Aspen Diagnostics Private Ltd dan dianalisa dengan alat spektrofotometer Humalyzer 2000.

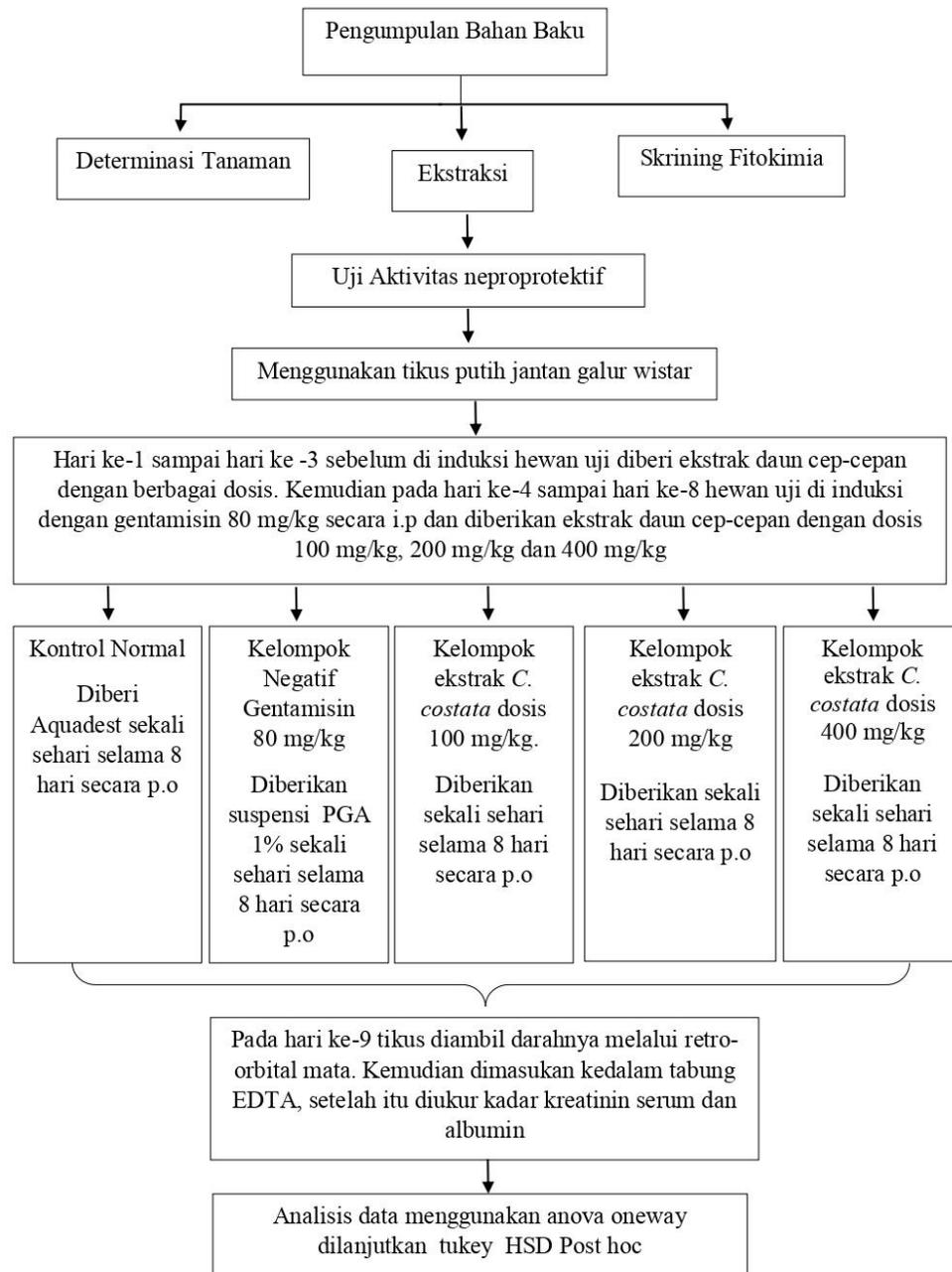
3. Cara Kerja Alat Fotometer

- a. Klik menu.
- b. Kemudian klik 99 dan enter untuk memunculkan kode yang akan di uji.
- c. Kalibrasi fotometer.
- d. Selanjutnya klik menu kembali, pilih kode sesuai yang ingin diuji (kreatinin, albumin) dan enter.
- e. Membuat larutan blanko, larutan standart dan larutan sampel kemudian inkubasi selama 5 menit sedangkan pada albumin di inkubasi selama 1 menit.
- f. Semua larutan sudah diinkubasi, kemudian tunggu perintah dari fotometer untuk membaca sampel.
- g. Hasil data berupa struk.

3.6 Analisis Data

Hasil penelitian ditampilkan sebagai rata-rata \pm SEM. Pengujian statistika menggunakan One ways analisis (ANOVA) dilakukan untuk menentukan perbedaan rata-rata antara kelompok perlakuan. Kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey HSD untuk menentukan apakah terdapat perbedaan signifikan ($p \leq 0,05$) pada masing-masing kelompok.

3.7 Skema Penelitian



Gambar 3.1 Skemea Penelitian