# BAB III
# METODE PENELITIAN

## 3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian kualitatif dengan dilakukanya Skrining fitokimia dan Desain penelitian post-test control-grup merupakan studi eksperimental laboratorium menggunakan tikus putih Jantan dan betina galur wistar sebagai hewan percobaan. Hewan uji dikelompokkan menjadi lima kelompok perlakuan.

## 3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Ekperimental Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian ini dilakukan selama empat bulan dari bulan April sampai Juli 2023.

## 3.3. Populasi dan Sampel

Sampel yang digunakan adalah Batang Kangkung Pagar (*Ipomoea carnea* Jacq) yang didapatkan dari pengeola ektraksi di Balitro. Tikus Jantan dan betina Galur Wistar ini merupakan populasi dalam penelitian yang akan dilaksanakan Pengujian Toksisitas akut dengan menggunakan Ekstrak etanol batang kangkung pagar dilakukan kepada 5 kelompok Tikus selama 14 hari.

## 3.4. Alat dan Bahan

### 3.4.1. Bahan

Bahan penelitian yang pakai diantaranya Batang kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq), etanol 70%, pulvis Gummi Arabi Ycum (PGA), aquadest, HCl, KOH, FeCl3, Gelatin, Vanillin, Dragendrof, Mayer, Magnesium, Lieberman Buchard. Alumunium foil, sarung tangan latex, Spuit 1 cc, pakan tikus, ekstrak batang kangkung pagar, Hewan uji tikus putih jalur wistar jenis kelamin jantan dan betina.

### 3.4.2. Alat

Tempat makan dan minum, Kandang tikus putih, Timbangan analitik, Rotary evaporator, Wadah maserasi, Corong pisah, Tabung reaksi, Beaker glass, Batang penganduk, kaca arloji, vial, spatula, Sonde.

## 3.5. Variabel penelitian

### 3.5.1. Variabel Bebas

Ekstrak etanol dari batang kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq) merupakan variabel bebas dari penelitian ini.

### 3.5.2. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah nilai toksisitas ektrak etanol batang kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq) pada percobaan dengan tikus putih jalur wistar.

### 3.5.3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada uji coba ini merupakan variabel berbentuk hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar berjumlah 30 ekor jenis kelamin Jantan dan betina yang dibagi dalam 5 kelompok perlakuan dengan pemerian dosis Tunggal bertingkat.

## 3.6. Prosedur Penelitian

### 3.6.1. Derterminasi

Pada proses awal penelitian ini yaitu dilakukan identifikasi dan determinasi tumbuhan batang kangkung pagar dengan mencocokkan cici-ciri morfologis yang terdapat dalam literature. Determinasi dilakukan di Universitas Padjadjaran (UNPAD) merupakan tempat dilakukanya penelitian, tepatnya di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi FMIPA, terhadap sampel tanaman secara utuh dari bagian akar hingga daun.

### 3.6.2. Ekstrak Batang Kangkung

Penyiapan simplisia diawali dengan memanen batang kangkung pagar, dipilih batang kangkung pagar yang masih segar dan lunak. Batang kangkung pagar kemudian dibersihkan dengan air, dirajang sesuai bentuk yang diinginkan kemudian proses pengeringan dibawah sinar matahari. Setelah simplisia kering proses selanjutnya menghaluskan simplisia batang kangkung pagar menjadi serbuk untuk mempermudah saat proses ekstraksi.

Pada penelitian ini dipilih Teknik ekstraksi maserasi sebanyak 3 kali perlakuan menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1:6 yaitu,

500 gram dalam 3000 mL pelarut (12 kali). Pada proses maserasi dilakukan selama 3 hari, persesi simplisia di ekstraksi selama 24 jam dan diaduk setiap 6 jam, setelah 24 jam di maserasi lalu dilakukan proses penyaringan dan serbuk dimaserasi kembali dengan pelarut yang baru, lakukan hal tersebut selama 3 hari. Proses ekstraksi dilakukan dengan alat rotary evavorator dengan suhu 50ºC dan diuapkan dengan

waterbath pada suhu 70ºC. Ekstrak Batang Kangkung Pagar yang dihasilkan warna hijau tua, berteks`tur kental.

%Rendemen = $\frac{Berat\ ekstrak\ yang\ diperoleh}{Berat\ bahan\ yang\ diekstraksi}\ X\ 100\%$

### 3.6.3. Skrining Fitokimia

**a. Identifikasi Alkaloid**

Ekstrak dibasahkan dengan Amonia encer, digerus dalam mortir, di tambahkan beberapa mili CHCl3 sambil terus digerus. Setelah disaring. Filtrat ditambahkan 5 mililiter HCl 2N. Lapisan asam di pisahkan kemudian dibagi menjadi 3 bagian. Tabung pertama diisi dengan asam encer yang berfungsi sebagai control. Tabung kedua diisi dengan 3 tetes reagen Dragendorff dan tabung ketiga ditambahkan 3 tetes reagen Mayer. Munculnya padatan jingga pada tabung kedua dan padatan putih pada tabung ketiga menandakan adanya alkaloid. (Abriyani *et al*., 2021).

**b. Identifikasi Flavonoid**

Di tambahkan sekitar 1 mL ekstrak dan taburi bubuk magnesium secukupnya bersama dengan 10 tetes asam klorida pekat. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan adanya warna merah kehitaman, kuning atau jingga. (Abriyani *et al*., 2021).

**c. Identifikasi Saponin**

Ekstrak dilarutkan dalam aquades yg didihkan kurun waktu 15 menit, Selanjutnya digoyangkan dengan kuat kurun waktu 15 atau 10 detik, jika terbentuk buih yang stabil kurun waktu sekitar 10 menit dan tidak hilang sejumlah kecil HCl 2N dimasukkan, maka sampel positif mengandung saponin (Abriyani *et al*., 2021).

**d. Identifikasi Tanin**

Untuk mengidentifikasi Tanin Filtrat dengan cara hasil pemanasandadi tanin filtrat dengan aquades dimasukan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan $FeCl_3$ 1%, adanya warna kuning jernih, endapan putih menunjukan positif Tanin (Abriyani *et al*., 2021).

**e. Identifikasi Kuinon**

Ekstrak batang kangkung pagar ditimbang 1 gram dan ditambahkan 20 mL lalu disaring, ditempatkan dalam tabung reaksi, kemudian digabungkan dengan larutan KOH 5% . Jika rona kuning hingga merah menunjukkan hasil yang didapatkan positif (Rezeki, 2017).

**f. Identifikasi Monoterpenoid dan Sesquiterpenoid**

Sampel dilarutkan dengan eter digerus, disaring, lalu diuapkan sampai kering, lalu teteskan vanilin 10% dalam H2SO4 pekat. Hasil positif menunjukkan adanya terbentuknya warna–warna ( Rezeki, 2017).

**g. Identifikasi Triterpenoid dan Steroid**

Sampel dilarutkan dengan eter lalu digerus, disaring, lalu diuapkan sampai kering, kemudian diteteskan dengan pereaksi Lieberman-Burchard. Jika hasil positif mengandung triterpenoid ditunjukan dengan adanya warna ungu, dan golongan steroid ditunjukkan dengan warna biru-kehijauan (Abriyani et al., 2021).

### 3.6.4. Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan merupakan tikus putih galur *wistar*, terdiri dari jantan dan betina, tikus putih galur *wistar* diperoleh dari penangkaran khusus untuk tikus penelitian CV Mitra Putra Animal, tikus putih diberikan kandang berupa wadah atau countener besar yang diberi penutup kawat kasa, dalam wadah diberikan sekam kayu halus sebagai alas serta media penyerapan untuk urine dan kotoran, pergantian sekam dilakukan setiap 3 hari sekali agar tikus merasa nyaman dan lebih mudah beradaptasi, dalam wadah diberikan pakan tikus dan air yang diberikan rutin berkala setiap harinya, pemantauan kebersihan dan sanitasi dilakukan efektif dilakukan rutin setiap hari untuk memastikan ketersediaan pakan dan air serta kebersihan kandang tikus untuk kenyaman tikus sebelum dilakukan

penelitian. Hewan uji dibagi menjadi 30 kelompok, masing-masing terdiri dari 6 ekor tikus 3 jantan dan 3 betina. Kelompok tersebut terdiri dari kelompok kontrol normal, kontrol dosis 5000mg kontrol dosis 2000mg, kontrol dosis 1000mg dan kontrol dosis 500mg dan kontrol normal dosis yang digunakan.

Pada penelitian ini menggunakan tikus putih yang digunakan sebanyak 5 kelompok, pengelompokkan hewan uji menggunakan rumus Federer tahun 1963 (Syam et al, 2011)

$(n-1)\ (t-1) \geq 15$

Keterangan :

t adalah jumlah kelompok

n adalah jumlah sampel

Perhitungan : $(n-1)\ (5-1) \geq 15$

$(n-1)\ (4) \geq 15$

$4n-4 \geq 15$

$4n \geq 19$

$n \geq 5$

Hewan uji dibagi menjadi 5 kelompok, penulis menggunakan masing-masing terdiri dari 6 ekor tikus 3 jantan dan 3 betina total tikus yang digunakan 30 ekor. Kelompok tersebut terdiri dari control normal, control dosis 500mg, 1000mg, 2000mg, 5000mg dengan kriteria ;

**a. Kriteria Inklusi**

Tikus putih yang berjenis kelamin jantan dan betina galur *wistar* Tikus putih yang akan di jadikan hewan uji rentan usia 2-3 bulan Bobot tikus putih sebesar 200-250 gram Sehat dan beraktivitas normal.

**b. Kriteria Ekslusi**

Tikus Jantan dan betina galur wistar (*Rattus norvegius*) dengan kondisi strees, sakit dan mati saat penelitian.

Kurang lebih 30 ekor tikus putih jantan galur wistar digunakan dalam pengujian ini, yang kemudian dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor tikus putih jantan dan 3 ekor tikus

putih betina galur wistar. Kemudian dikelompokkan menjadi 1 kandang dengan menggunakan sekam, pakan tikus dan air minum. Dilakukan proses inap selama 24 jam sebelum dilakukan penelitian sebagai masa adaptasi pada tikus. Kemudian di kelompokkan terdiri dari control negatif, kelompok ekstrak batang kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq) dosis 500 mg/kgBB, kelompok ekstrak batang kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq) dosis 1000 mg/kgBB, kelompok ekstrak batang kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq) dosis 2000 mg/kgBB, kemudian kelompok ekstrak batang kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq*)* dosis 5000 mg/kgBB. Selanjutnya diberikan perlakuan secara oral berulang selama 14 hari, lalu analisis jumlah kematian untuk menghitung berapa tikus yang toksik.

### 3.6.5. Tahap Pembuatan Suspensi Ekstrak Batang Kangkung Pagar

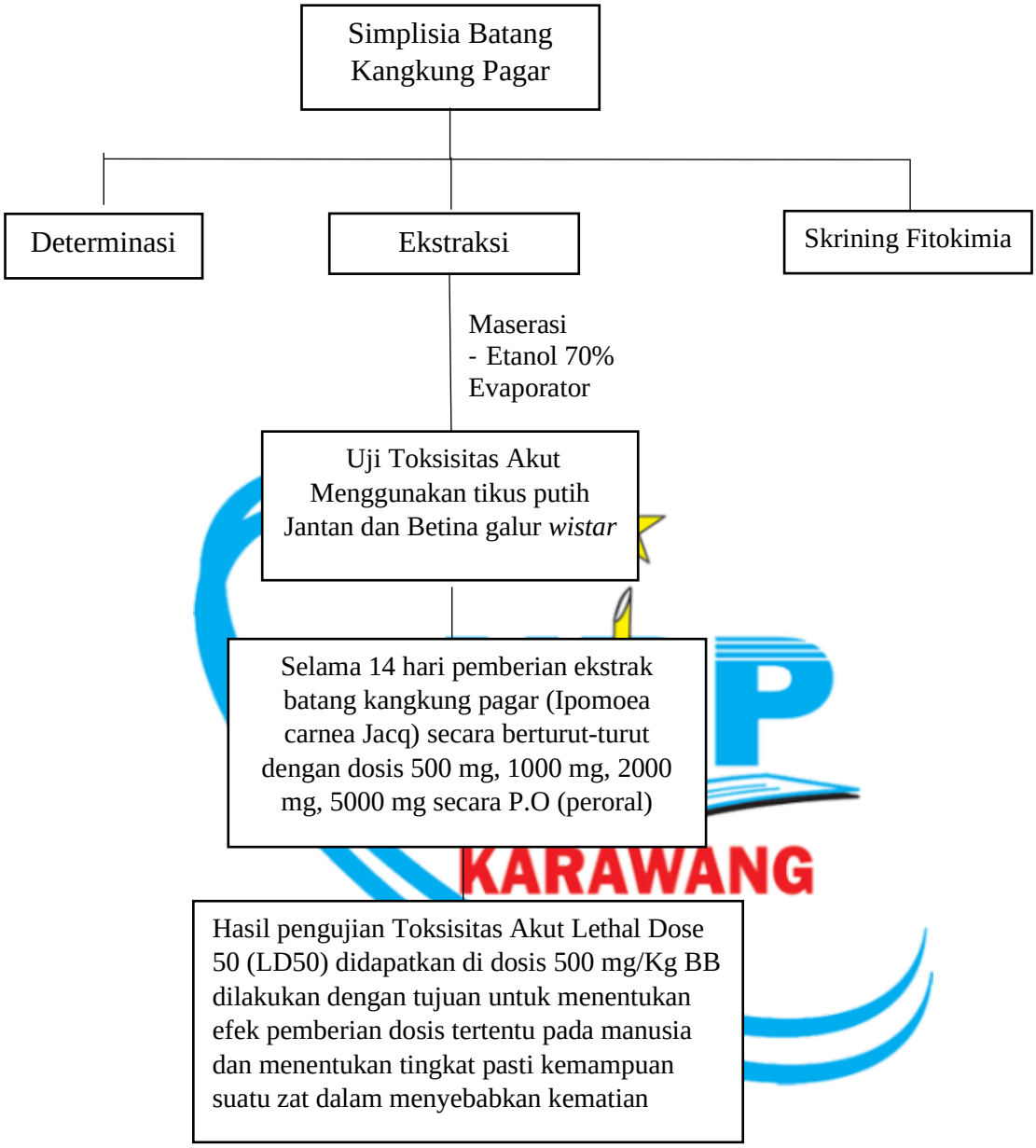
Dalam pengujian ini, tikus putih galur wistar diberikan uji secara lisan dengan menggunakan sonde. Rute oral dihilangkan karena berbeda dengan rute yang biasa dilalui manusia saat menelan obat. Kelebihan etanol pada tanaman kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq) disuspensikan dengan PGA 10%. PGA merupakan sensyawa non-toksik dan non-iritasi, yang menunjukkan bahwa pembawa zat yang bersangkutan tidak berkontribusi terhadap pengujian yang dilakukan saat ini. Setelah menyadari bahwa dosis bobot tikus dapat disesuaikan dengan dosis ekstra yang akan datang, maka dapat melanjutkan.

$$\text{Dosis Ekstrak} = \frac{Berat\ Badan\ Tikus}{1000\ g} \text{ x dosis yang diinginkan}$$

## 3.7. Analisis Data

Data hasil skrining fitokimia yang diperoleh untuk dianalisa di muat dalam bentuk tabel dan hasil penelitian toksisitas ditampilkan rata-rata BB tikus. Pengujian statistika menggunakan aplikasi AatBio $LD_{50}$ dilakukan untuk menentukan perbedaan rata-rata antara kelompok normal dan dosis yang diberikan menggunakan AatBio $LD_{50}$ versus kematian hewan uji perhari.

### 3.8. Diagram Alir Penelitian




**Gambar 3.1** Diagram Alir Penelitian