

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode penelitian experimental dilakukan di Laboratorium Universitas Buana Perjuangan Karawang, menggunakan daun kangkung pagar (*Ipomea carnea* Jacq) yang dibuat menjadi simplisia dan diekstrak menggunakan pelarut bertingkat N-heksan, etil asetat dan etanol, hasil ekstrak dilanjutkan dengan melakukan Skrining Fitokimia untuk menganalisa metabolit sekunder toksik dalam ekstrak etil asetat daun kangkung pagar (*Ipomea carnea* Jacq), penelitian dilanjutkan dengan menganalisa nilai toksis ekstrak menggunakan model hewan uji Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar, tikus putih yang digunakan berjumlah 30 ekor jenis kelamin jantan dan betina, dibagi menjadi 5 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 6 tikus putih yang terdiri dari 3 jantan dan 3 betina. Proses induksi ekstrak etil asetat daun kangkung pagar (*Ipomea carnea* Jacq) dilakukan secara oral melalui sonde melalui mulut tikus putih, pemerian dosis dilakukan dengan menggunakan dosis bertingkat mulai dari kelompok dosis 500 mg, 1000 mg, 2000 mg, 5000 mg, dan kelompok normal, proses induksi dilakukan selama 14 hari berturut-turut hingga didapatkan angka kematian pada hewan uji, hewan uji yang mati dianalisa pada dosis dan hari seberapa tikus tersebut mati. Penelitian dilakukan dengan menganalisa jumlah kematian pada hewan uji tidak dengan analisa histopatologi.

3.2 Populasi dan Sampel

Dalam penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih galur Wistar (*Rattus norvegicus*) dengan kriteria usia 10-12 minggu dan berat rata-rata 200-250 g sedangkan sampel uji toksisitas menggunakan daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq) yang diekstraksi menggunakan pembawa etil asetat.

3.3 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain, Tikus putih galur *Wistar*, pakan tikus jenis pur babi 551 hi-gro, daun kangkung pagar, pelarut Etil asetat, pereaksi untuk skrining, PGA 1%,

3.3.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain wadah maserasi, oven, timbangan analitik, rotary evaporator, kandang tikus dan wadah minum tikus, sonde oral, kaca arloji, gelas kimia.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini ekstrak etil asetat dari daun kangkung pagar (*Ipomea carnea* Jacq)

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan nilai toksisitas ekstrak etil asetat daun kangkung pagar (*Ipomea carnea* Jacq) pada percobaan dengan tikus putih.

3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian merupakan variabel berbentuk hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* berjumlah 30 ekor terdiri dari jantan dan betina yang dibagi dalam 5 kelompok perlakuan masing-masing kelompok berjumlah 6 ekor tikus putih yang diberikan ekstrak dengan dosis tunggal bertingkat.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pembuatan ekstrak Etil Asetat daun Kangkung Pagar (*Ipomea carnea* Jacq)

Pembuatan ekstrak dilakukan menggunakan metode maserasi bertingkat dengan pelarut N-heksan, Etil Asetat, Etanol Daun kangkung Pagar dikumpulkan di kecamatan Pebayuran Kabupaten Karawang, daun kangkung pagar kering

dirajang, kemudian ditimbang 2000 g direndam dengan pelarut pertama N-heksan, etil asetat, etanol hingga simplisia terendam sempurna di dalam inert tertutup rapat dan terhindar dari cahaya matahari atau simpan pada suhu kamar selama 96 jam (4 hari) sambil diaduk sesekali secara konsisten dan kontinu. Ekstrak cair ambil filtratnya dan di pekatkan menggunakan *Rotary evaporator* pada suhu 50°C, kemudian kentalkan diatas waterbath dengan temprature 60°C sambil diaduk hingga didapat ekstrak kental (Tetti, 2014). Lakukan perhitungan hasil rendemen pada hasil ekstrak kental :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental (g)}}{\text{Berat simplisia (g)}} \times 100$$

3.5.2 Pengelompokan Perlakuan Pada Tikus Putih

Hewan uji menggunakan tikus putih galur Wistar berjumlah 30 ekor berat yang digunakan sekitar 200-250 g, terdiri dari jantan dan betina yang dibagi menjadi 5 kelompok dengan masing-masing terdiri atas 6 ekor tikus, 3 jantan 3 betina yang disimpan dalam 1 kandang dengan sekam, pakan hewan dan air, pengelompokan jumlah hewan uji dalam satu kelompok ditentukan menggunakan rumus Federer tahun 1963 (Syam *et al.*, 2011).

Rumus Federer : $(n-1)(t-1) \geq 15$

Keterangan : t adalah jumlah kelompok

n adalah jumlah sampel tiap kelompok

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

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

$$n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 5$$

Perhitungan populasi perkelompok yang dilakukan dengan rumus federer didapatkan jumlah tikus 5 ekor per kelompok, jumlah sampel hewan uji yang

direkomendasikan adalah minimal 5 ekor tikus putih per kelompok, dalam penelitian ini jumlah hewan uji yang digunakan oleh penulis adalah 6 ekor tikus putih sebagai pembulatan karena jenis kelamin yang digunakan dalam satu kelompok terdiri dari 3 jantan dan 3 betina.

Penelitian menggunakan dosis tunggal bertingkat, setiap kelompok diberi dosis berbeda mulai dari normal, 500 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, 2000 mg/kgBB, sampai dosis maksimal 5000 mg/kgBB. Adapun kriteria dalam pengelompokan hewan uji antara lain:

a. Kriteria Inklusi

1. Tikus yang sehat dan aktif
2. Tikus Putih galur Wistar berumur 10-12 minggu
3. Berat badan tikus 200-250 g
4. Hasil penelitian tikus harus mati

b. Kriteria eksklusi

1. Tikus yang tidak mati setelah perlakuan

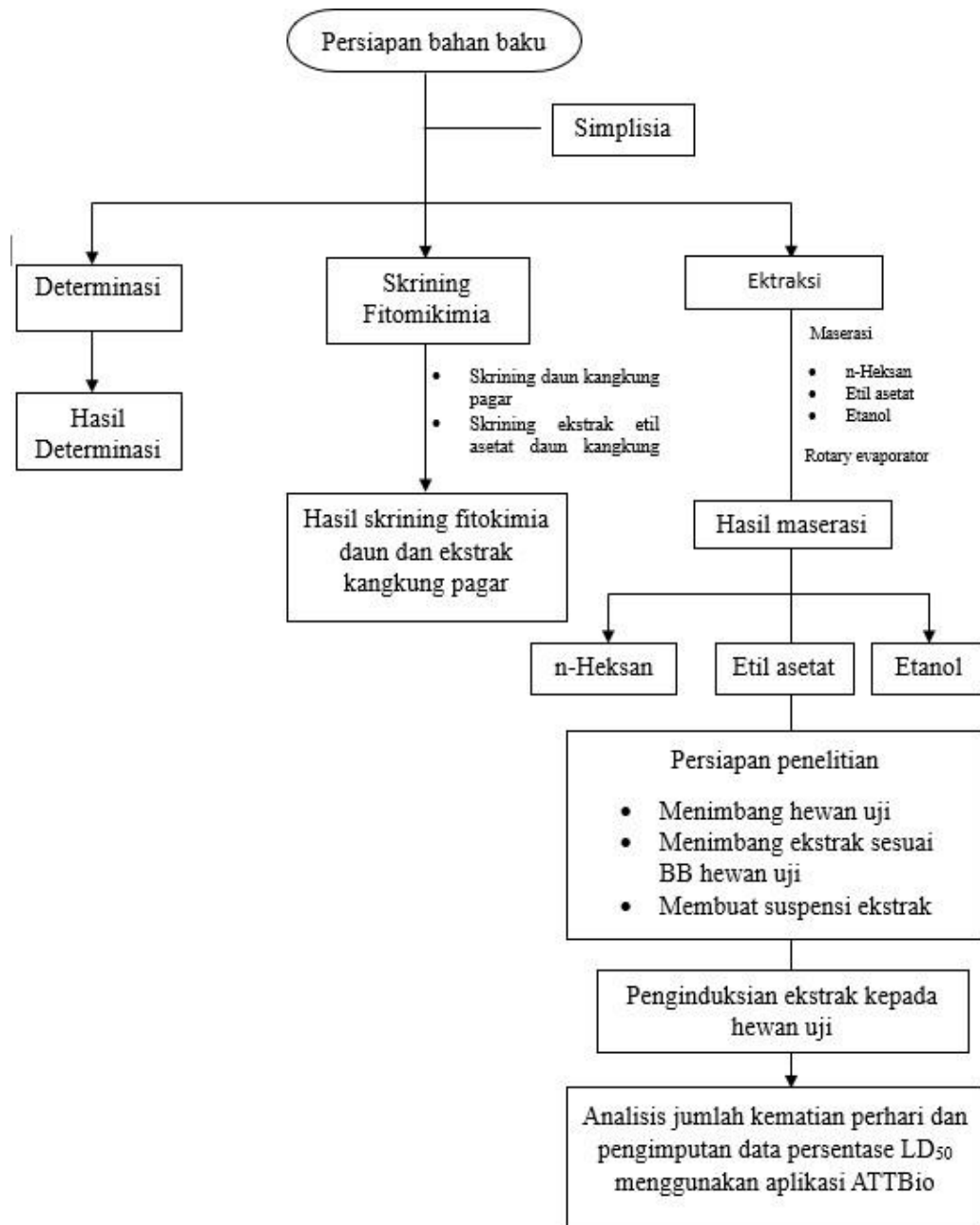
Proses pemerian ekstrak dilakukan dengan pembuatan suspensi ekstrak etil asetat dilakukan dengan menimbang dan melarutkan 1% PGA dengan aquadest setelah terbentuk suspensi ekstrak ditambahkan ke dalam suspensi sampai homogen, induksi dilakukan dengan bantuan sonde secara oral kedalam mulut hewan uji, kemudian dilakukan pengamatan dan observasi selama 14 hari, analisis jumlah kematian hewan uji untuk menghitung toksik.

3.6 Analisis data

Data hasil penelitian disajikan secara deskriptif dengan menganalisa jumlah kematian pada hewan uji setelah dilakukan induksi ekstrak etil asetat daun kangkung pagar, analisis berupa LD50 dari hasil jumlah kematian hewan uji dengan menggunakan aplikasi *AATBio LD50 Calculator*, penentuan LD50 menggunakan aplikasi *ATTBio* dilakukan dengan mengubah jumlah kematian hewan uji kedalam bentuk persentase yang diinput pada aplikasi *ATTBio*.

3.7 Skema Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada **Gambar 3.1**



Gambar 3.1 Alur proses penelitian toksisitas daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq)