

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan hewan uji berupa Tikus Putih Jantan galur Wistar sebagai hewan percobaan dan untuk pengujian hepatoprotektif digunakan parasetamol sebagai penginduksi dengan dosis 1000 mg/kg.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan yaitu tempat makan tikus, bak plastik, botol minum tikus, penutup kawat, corong buchner, timbangan analitik, timbangan tikus, kertas saring, kaca arloji, corong pisah 1 liter, wadah maserasi (toples), batang pengaduk, spatula, mortir dan stamper, rotary evaporator, freeze dryer, gelas ukur, vial, handscoon, sonde oral, spuit 1 cc, tabung EDTA, pipa hematokrit, *photometer humalyzer* 2000 dan sentrifugator.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan yaitu fraksi air daun *C. costata*, silymarin 50mg, parasetamol 1000mg, etanol 70%, PGA (*Pulvis gummi arabicum*), reagen AST, reagen ALT dan reagen albumin, eter, asam sulfat, asam klorida, amil alkohol, benzena, natrium hidroksida, serbuk magnesium, kloroform dan isopropanol, pereaksi Dragendroff, mayer, serta pereaksi Lieberman-Bouchard.

3.2.3 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan yaitu tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* L.) galur wistar yang didapatkan dari CV. Mitra Putra Animal Rancaekek Bandung dengan berat badan tikus antara 150-250 gram.

3.2.4 Penginduksi

Pada penelitian kali ini obat yang digunakan sebagai penginduksi tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* L.) galur Wistar yaitu menggunakan parasetamol sebanyak 1000 mg/kg.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Klasifikasi Variabel

3.3.1.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan pada penelitian kali ini yaitu Fraksi air daun *C. costata* dengan menggunakan beberapa dosis kelompok yang berbeda

3.3.1.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pengujian *aspartate aminotransferase* (AST), *alanine aminotransferase* (ALT) dan albumin pada sampel serum darah menggunakan alat fotometer.

3.3.1.3 Variabel Terkendali

Variabel Terkendali yang digunakan pada penelitian ini yaitu bobot tikus, volume pemberian, jenis kelamin, hewan uji dan makanan.

3.3.2 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	6 kelompok perlakuan		Nominal	1. K - = Kontrol negative dosis pct
	Dosis ekstrak etanol daun Cep- cepan	dengan menggunakan obat silymarin, obat kurkumin, penginduksi dan			2. Kontrol Positif satu silymarin dosis 50 mg/kgBB
		3 kelompok terapi fraksi air dengan dosis yang bervariasi.			3. C5 = kelompok terapi dosis 1
					4. C10 = kelompok terapi dosis 2
					5. C15 = kelompok terapi dosis 3

2	Variabel terikat ALT dan AST Albumin	Mengukur kadar enzim hati yang ada di dalam darah. Mengukur albumin yang dilakukan dengan alat fotometer	Fotometer Interval	Interval	1. Rendah >40 U/L Rendah >37 U/L 2. Normal <40 U.L Normal <37 U/L 1. Rendah 3,5 g/dL 2. Normal 3,8-5,1 g/dL
---	--------------------------------------	--	--------------------	----------	--

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Preparasi Sampel

1. Pembuatan Ekstrak dengan Metode Maserasi

Siapkan 1,5 kg serbuk simplisia daun *C. costata* dan tempatkan pada wadah untuk perlakuan ekstraksi menggunakan metode maserasi yaitu dengan pelarut etanol 70% dalam waktu 3x24 jam. kemudian maserat tersebut ditampung dengan alat *rotary evaporator* untuk diuapkan pelarutnya dengan suhu 50°C hingga kental dan kembali dipanaskan pada *waterbath* pada suhu 40°C sehingga dihasilkan ekstrak kental. Dihitung persentasi rendemen ekstrak yang diperoleh:

$$\% \text{ Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\%$$

2. Pembuatan Fraksi Air Daun *C. Costata*

Ekstrak etanol daun cep-cepan dilakukan proses ekstraksi lanjutan dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut sesuai dengan tingkat kepolaran diantaranya: pelarut polar yakni air, pelarut semipolar yaitu etil asetat, dan pelarut non polar yaitu n-heksan. Ditimbang 250 gram ekstrak etanol daun *C. costata*, dan dilarutkan dalam 150 ml aquadest dan pelarut etanol 450 ml kemudian dimasukkan kedalam corong pisah 1 liter di kocok sesekali, kran atas dibuka untuk mengeluarkan gas, kocok sampai 4x pengulangan tunggu hingga terpisah fase air dan etanol

pada saat fraksinasi. Kemudian diambil fase air dan dibuat dalam bentuk fraksi air serbuk menggunakan alat *freeze dryer*. Dihitung persentase rendemen fraksi yang diperoleh:

$$\% \text{ Rendemen fraksi} = \frac{\text{Berat fraksi yang diperoleh}}{\text{Berat ekstrak}} \times 100\%$$

3. Pembuatan Suspensi Silymarin

PGA dibuat menjadi larutan PGA 1% dengan cara menimbang 1 gram PGA kemudian larutkan dengan air hingga volume 100 ml. Larutan ini digunakan sebagai pelarut silymarin. Suspensi silymarin dalam PGA 1% dibuat dengan melarutkan sejumlah 50mg silymarin yang telah ditimbang kedalam PGA 1% sebanyak 1 ml, suspensi silymarin dengan volume 1 ml tersebut yang diberikan pada tikus.

4. Pembuatan Suspensi Fraksi Air Daun *C.costata*

Ditimbang bobot tikus, setelah didapat disesuaikan dengan dosis ekstrak etanol daun *C.costata* menggunakan 3 perbandingan dosis, lalu ditimbang fraksi air daun *C.costata* dimasukkan kedalam beaker glass lalu dilarutkan dengan PGA 1% aduk sampai larut dan diberikan secara oral pada tikus.

5. Pembuatan Larutan Penginduksi Parasetamol

Ditimbang bobot tikus, setelah didapat disesuaikan dengan dosis induksi parasetamol 1000 mg/kgBB, karena sifatnya tidak larut air maka menggunakan PGA 1% untuk melarutkannya (Depkes RI, 1995). Serbuk parasetamol selanjutnya dilarutkan dengan PGA 1% didalam beaker glass aduk hingga homogen dan diberikan secara oral.

3.4.2 Pengelompokan dan Perlakuan Pada Tikus

Sebelum pengujian, tikus putih Jantan galur wistar diaktimisasi selama seminggu, dipelihara pada kondisi yang sama, lalu dikasih makan dan minum. Tujuannya agar hewan uji beradaptasi dengan lingkungan baru dan menghindari stress dengan diberikan perlakuan yang sama. Pada penelitian ini

tikus yang digunakan yaitu tikus putih Jantan galur wistar sebanyak 20 ekor dibagi dengan 5 kelompok, dan setiap perkelompoknya terdiri dari 4 tikus.

Tabel 3. 2 Pengelompokan Hewan Uji

	Kelompok	Perlakuan
I.	Kontrol Negatif	Suspensi parasetamol dosis 1000mg/kg diberikan pada hari ke 15-21
II.	Kontrol Positif	Silymarin dosis 50 mg/kg diberikan pada hari ke 1-21
III.	Fraksi Air Dosis 1	Fraksi air <i>C. costata</i> dosis 50 gram diberikan pada hari ke 1-21
IV.	Fraksi Air Dosis 2	Fraksi air <i>C. costata</i> dosis 100 gram diberikan pada hari ke 1-21
V.	Fraksi Air Dosis 3	Fraksi air <i>C. costata</i> dosis 200 gram diberikan pada hari ke 1-21

Penelitian ini dilakukan selama 21 hari, selama 14 hari tikus diberi obat yang sesuai dengan kontrol perlakuannya yaitu silymarin, dan ke-3 dosis fraksi air daun *C. costata* selama tujuh hari selanjutnya diberikan induksi obat parasetamol, silymarin, dan ke-3 ekstrak. Begitupun pada hari ke-22 sampel darah tikus diambil dan untuk dilakukan sentrifugasi agar bisa didapatkan serum darah dan dilanjutkan pada pengujian kadar AST (*aspartate aminotransferase*), ALT (*alanine aminotransferase*) dan albumin.

3.4.3 Pengambilan Sampel Darah

Pada hari ke-22, seluruh hewan uji di bius menggunakan eter disimpan diwadah tertutup. Pengambilan darah diambil melalui orbitalis mata. Darah ditampung didalam tabung EDTA dengan mengalirkannya secara perlahan-lahan ke dinding tabung, lalu setelah itu disentrifugasi (Pertiwi & Widyaningsih, 2015). Selama 5 menit menggunakan kecepatan 7000rpm. Bagian serum kemudian dikumpulkan untuk di analisis menggunakan reagen AST, ALT dan Albumin menggunakan Fotometer (Humalyzer 2000).

3.4.4 Pengukuran Kadar AST dan ALT

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

Tabel 3. 3 Persiapan larutan untuk pengukuran kadar AST dan ALT

Perlakuan	Working Reagen (mL)	Blanko (μL)	Sampel (μL)
Buffer	8	-	-
Substrat	2	-	-
Working Reagen	-	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.

3.4.5 Pengukuran Albumin

Tabel 3. 4 Pengukuran Albumin

Pipet ke dalam kuvet	Larutan Blanko (μL)	Larutan sampel dan Larutan standart (μL)
Sampel serum darah dan Larutan Standart	-	10
Reagen TPR	1000	1000

Diambil sebanyak 10 μL serum darah ke dalam larutan standart dan larutan sampel, lalu pada larutan blanko (tanpa sampel) diambil 10 μL aquadest, dan selanjutnya ditambahkan 1000μL pada setiap larutan. Kemudian dilakukan inkubasi selama 5 menit dengan suhu 20-25°C. Baca hasil pengukuran albumin menggunakan alat fotometer.

3.5 Determinasi

Determinasi pada tumbuhan mempunyai arti digunakan untuk mengetahui kebenaran dari sampel. Pernyataan nomenklatur mencakup nama tumbuhan, nama latin tumbuhan, bagian tumbuhan yang dipakai, dan nama tumbuhan

Indonesia (Maryam *et al.*, 2020). Daun *C. costata* di determinasi di herbarium jatinangor Departemen Biologi FMIPA Universitas Padjajaran Bandung.

3.6 Skrining Fitokimia Fraksi Air Daun *C. costata*

Penapisan fitokimia ekstrak dan fraksi air daun *C. costata* sebagai berikut:

1. Pemeriksaan Alkaloid

Sampel dibasakan dengan ammonia, lalu menambahkan kloroform, digerus kuat. pipet dan saring lapisan kloroform, lalu penambahan asam klorida 2 N. Campuran kocok kuat sampt terbentuk dua lapisan, pipet lapisan asam lalu dibagi menjadi tiga bagian. Pembanding pada bagian pertama, lalu ditambahkan pereaksi *Mayer* pada bagian kedua, menandakan adanya alkaloid, jika terdapat kekeruhan atau endapan putih. Pada bagian ketiga, pereaksi *Dragendroff* ditambahkan, Adanya alkaloid ditandai dengan kekeruhan atau endapan berwarna kuning sampai jingga (Farnsworth, 1966).

2. Pemeriksaan Flavonoid

Tambahkan air pada sampel lalu panaskan dan saring. Lalu menambahkan serbuk Mg dan asam klorida 5 N pada filtrat lalu disaring kembali dan tambahkan amil alkohol, kocok kuat, dan pada mengamati warna lapisan amil alkohol yang terbentuk. Senyawa flavonoid menimbulkan tanda dengan terbentuk warna kuning hingga merah yang dapat ditarik oleh amil alkohol (Farnsworth, 1966).

3. Pemeriksaan Steroid dan Terpenoid

Tambahkan eter kedalam sampel sambil digerus lalu kocok dan diamkan setelah itu pipet dan saring. Filtrat diuapkan eternya, lalu penambahan pereaksi *Lieberman-Bouchard* pada residunyadan dan diamati warnanya. Menandakan adanya senyawa steroid dengan terbentuknya warna biru-hijau sedangkan senyawa triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna ungu (Farnsworth, 1966).

4. Pemeriksaan Saponin

Sampel ditambahkan air pada tabung reaksi lalu panaskan diatas penangas air selama 15 menit kemudian saring dan dinginkan. Setelah dingin, filtrat dikocok kuat secara vertikal selama 30 detik. Tanda adanya Senyawa saponin yaitu dengan terbentuknya busa setinggi kurang lebih 1 cm yang persisten selama

beberapa menit dan tidak hilang juga setelah ditambahkan asam klorida atau setelah didiamkan selama 20 menit (Farnsworth, 1966).

5. Pemeriksaan Tanin

Sampel ditambahkan air pada tabung reaksi lalu panaskan dalam penangas air selama 15 menit, saring panas-panas. Filtratnya dilarutkan dengan air suling sampai tidak berwarna. Diambil sebanyak 2 ml larutan tadi dan menambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Jika terjadi warna biru atau kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Farnsworth, 1966).

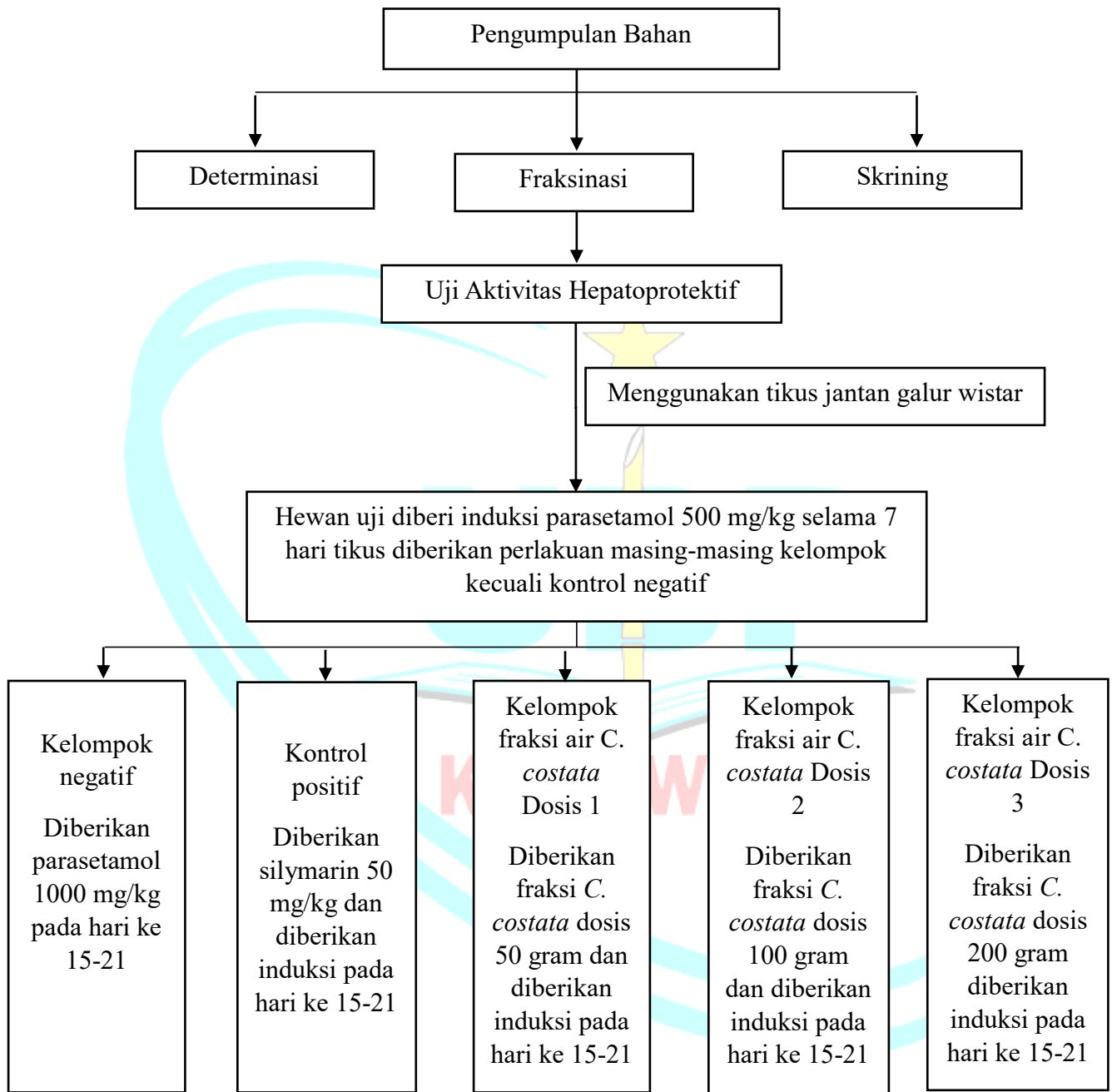
3.8 Analisis Data

Hasil penelitian yang didapatkan ditampilkan dalam bentuk rata-rata $\pm$ SEM (*Standar Error Mean*). Pengujian perbedaan antara parameter yang diukur dibandingkan dengan menggunakan analisis varian satu arah (ANOVA), dan dilanjutkan dengan uji Tukey *HSD post Hoc* untuk menentukan apakah terdapat ragam relevan ($p < 0,05$) pada tiap-tiap anggota menggunakan Graphpad prism versi 8 (Alkandahri *et al.*, 2021).

3.9 Lokasi Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium farmakologi Universitas Buana Perjuangan Karawang pada bulan Juni sampai Juni 2024.

3.10 Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Alur Penelitian