

## **BAB III**

### **METEDOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan memakai hewan uji yaitu tikus putih jantan galur wistar sebagai hewan percobaan. Untuk pengujian nefroprotektif digunakan induksi gentamisin injeksi dengan dosis 80 mg/kg BB.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat yang dipakai pada penelitian ini adalah kuvet, pipa hematocrit, tabung EDTA, mikropipet, sentrifugasi, fotometer, sput, handscoon, sonde, batang pengaduk, beaker glass, tabung reaksi, rotary evaporator, corong bushner, pompa vakum, mortar dan stamper

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan yang dipakai untuk penelitian ialah daun cep-cepan, gentamisin injeksi 80 mg dalam bentuk ampul (PT. Kimia Farma), etanol 70 % (Brataco), aquadest (Brataco).

##### **3.2.3 Hewan Uji**

Hewan uji yang di gunakan yaitu tikus putih jantan (*Rattus norvegicus L.*) galur Wistar yang di dapatkan dari Mitra Putra Animal Rancaekek Bandung dengan BB tikus antara 200-300 gr.

#### **3.3 Variabel Penelitian**

##### **3.3.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian dengan menggunakan ekstrak daun cep-cepan dengan beberapa dosis yang berbeda-beda

### 3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian yaitu profil kreatinin ureum asam urat terhadap tikus putih jantan galur wistar.

### 3.3.3 Variabel Terkendali

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

## 3.4 Prosedur Penelitian

### 3.4.1 Proses Ekstraksi dan Fraksinasi

Serbuk simplisia daun *C. costata* ekstraksi dilakukan dengan menempatkan bahan dalam wadah dan menggunakan metode maserasi, yaitu dengan merendamnya dalam air dengan waktu 3 hari (3x24 jam). Setelah proses selesai, maserat dikumpulkan serta pelarutnya dihilangkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C hingga kental dan kembali dipanaskan pada waterbath pada suhu 50°C sehingga didapatkan ekstrak kental. Dihitung persentasi rendemen ekstrak yang diperoleh:

$$\% \text{ Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Rendemen Berat Simplisia}}{\text{Berat Ekstrak yang diperoleh}} \times 100\%$$

Ekstrak air daun cep-cepan dalam Proses fraksinasi cair-cair dilakukan dengan menggunakan pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda, yaitu pelarut non-polar seperti n-heksan, pelarut semi-polar seperti etil asetat, dan pelarut polar berupa air. Sebagian ekstrak ditimbang dan dilarutkan dalam n-heksan di dalam corong pisah, kemudian dibiarkan hingga terbentuk pemisahan lapisan. Proses ini diulangi beberapa kali sampai didapatkan lapisan n-heksan yang jernih, kemudian fraksi n-heksan diambil dan dikumpulkan. Residu yang tersisa digunakan untuk fraksinasi dengan pelarut etil asetat. Residu tersebut ditambah dengan etil asetat, dibiarkan sampai terbentuk lapisan etil asetat, dan diulang hingga lapisan etil asetat terlihat jernih, kemudian dipisahkan. Residu yang diperoleh digunakan untuk fraksinasi dengan pelarut polar, yaitu air. Residu dikocok dan dibiarkan hingga terbentuk lapisan air yang jernih. Kemudian fraksi cair dari masing-masing pelarut diuapkan dengan *rotary epavorator* untuk mendapatkan fraksi

kental

### 3.4.2 Skrining Fitokimia Fraksi Air Daun *C. Costata*

#### Pemeriksaan Alkaloid

Sampel pada proses diawali dengan penambahan ammonia untuk membasakan sampel, diikuti dengan penambahan kloroform, lalu digerus dengan kuat. Lapisan kloroform dipipet dan disaring, kemudian ditambahkan asam klorida 2 N. Campuran tersebut dikocok kuat hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan asam dipipet dan dibagi menjadi tiga bagian. Bagian pertama digunakan sebagai kontrol, bagian kedua diberi pereaksi Mayer jika terbentuk kekeruhan atau endapan putih, menunjukkan keberadaan alkaloid. Bagian ketiga ditambahkan pereaksi Dragendorff jika terbentuk kekeruhan atau endapan berwarna kuning hingga jingga, menunjukkan adanya alkaloid, (Farnsworth, 1966).

#### Pemeriksaan Flavonoid

Warna lapisan amil alkohol diamati setelah campuran dikocok kuat. Setelah proses penyaringan, larutan yang dihasilkan diberi serbuk magnesium dan asam klorida 5 N. Filtrat disaring kembali setelah dipanaskan dengan penambahan air. Senyawa flavonoid teridentifikasi melalui perubahan warna lapisan amil alkohol menjadi kuning hingga merah yang bisa ditarik oleh amil alkohol, (Farnsworth, 1966).

#### Pemeriksaan Glikosida

Sampel ditambahkan campuran etanol 70% dan air (7:3) serta asam klorida 2 N hingga terendam, kemudian direfluks selama 1 jam. Setelah didinginkan, sampel disaring. Filtrat yang dihasilkan dicampur dengan air suling dan timbal (II) asetat 0,4 M, diaduk, dan didiamkan hingga terbentuk endapan yang kemudian disaring. Filtrat selanjutnya dipisahkan menggunakan campuran kloroform dan isopropanol (2:3) dalam corong pisah. Setelah dikocok, akan terbentuk dua lapisan: lapisan atas yang mengandung gula dan lapisan bawah yang mengandung non-gula.

- Lapisan atas

Dengan menambahkan air dan pereaksi Molish, lalu secara perlahan menambahkan asam sulfat pekat melalui dinding tabung, akan

terbentuk cincin berwarna coklat, coklat keunguan, atau ungu pada batas antara kedua cairan. Cincin ini menunjukkan adanya ikatan gula.

- Lapisan bawah

Dengan menambahkan pereaksi Lieberman-Bouchard, jika muncul warna ungu kemerahan, hal ini menunjukkan adanya triterpenoid. Sebaliknya, jika muncul warna biru hijau atau hijau, ini menandakan keberadaan steroid, (*Farnsworth*, 1966).

### **Pemeriksaan Glikosida Antrakuinon**

Dimasukkan ke dalam corong pisah, sampel yang telah didinginkan ditambahkan 10 ml benzena, dikocok, dan didiamkan. Setelah itu, lapisan benzena dipisahkan dan disaring. Kemudian, lapisan benzena dikocok dengan 2 ml larutan natrium hidroksida 2 N dan dibiarkan sejenak. Lapisan natrium hidroksida yang berubah warna menjadi merah menunjukkan adanya glikosida antrakuinon. Sebelumnya, sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer, ditambahkan etanol hingga terendam, dan kemudian dicampur dengan asam sulfat 2 N, lalu dipanaskan sebentar (*Farnsworth*, 1966).

### **Pemeriksaan Steroid dan Terpenoid**

Sampel diberi tambahan eter lalu digerus kemudian dikocok serta diamkan, setelah itu dipipet serta dilakukan penyaringan. Filtrat dilakukan penguapan eternya lalu residunya diberi tambahan pereaksi *Lieberman-Bouchard* dan diamati warnanya. Senyawa steroid ditandai dengan membentuknya warna biru-hijau, sedangkan senyawa triterpenoid ditandai dengan membentuknya warna ungu (*Farnsworth*, 1966).

### **Pemeriksaan Saponin**

Sampel ditambahkan air pada tabung reaksi lalu di panaskan pada penangas air dengan waktu 15 menit, kemudian saring dan dinginkan. Sesudah dingin, filtrat dikocok kuat secara vertikal selama 30 detik. Senyawa saponin ditandai dengan terbentuknya busa setinggi kurang lebih 1 cm yang persisten dengan waktu beberapa menit serta tidak hilang juga sesudah ditambahkan asam klorida atau setelah didiamkan dengan waktu 20 menit (*Farnsworth*, 1966).

### **Pemeriksaan Tanin**

Sampel ditambahkan air, masukkan larutan ke dalam tabung reaksi dan panaskan menggunakan penangas air selama 15 menit, kemudian saring dalam keadaan panas. Filtrat yang dihasilkan diencerkan dengan air suling hingga tidak berwarna. Ambil 2 ml dari larutan tersebut, lalu tambahkan 1 hingga 2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Jika muncul warna biru, hitam, atau hijau kehitaman, ini mengindikasikan adanya tanin (Farnsworth, 1966).

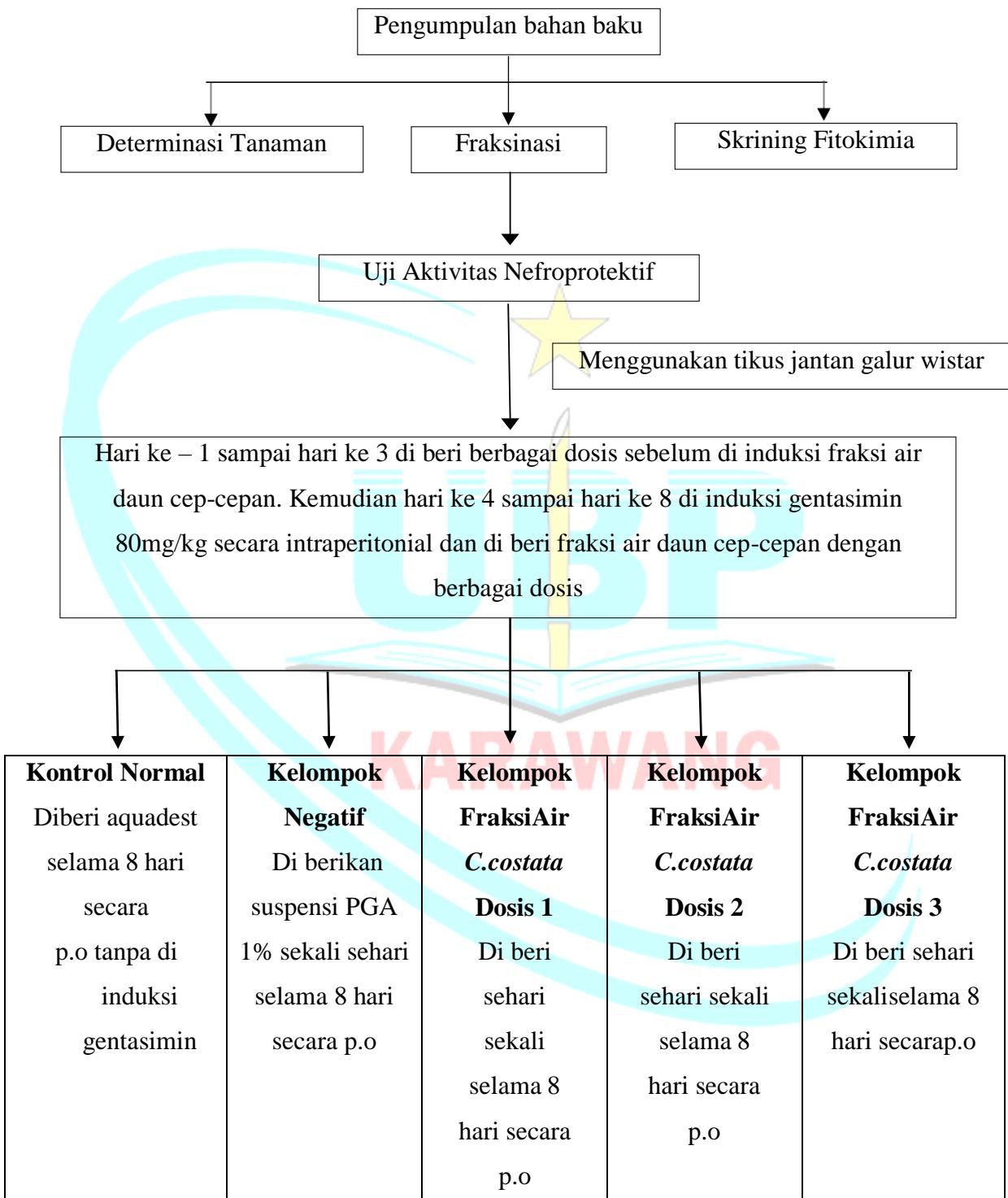
#### **3.4.3 Perlakuan Hewan Uji**

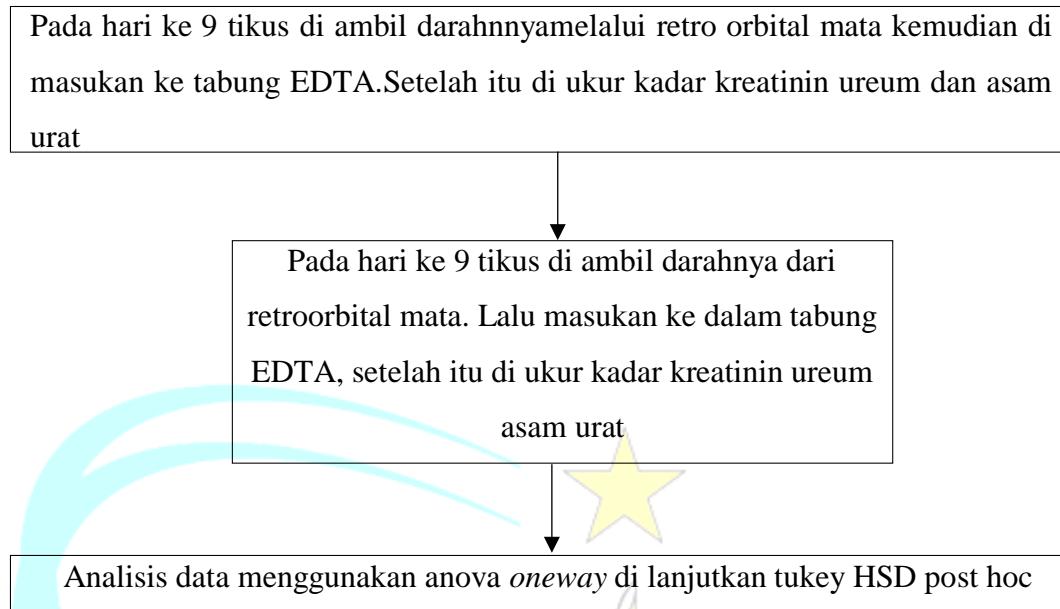
Tikus putih jantan galur wistar dengan berat sekitar 200 gram – 250 gram dan berumur 15 – 20 minggu digunakan sebagai hewan uji pada penelitian ini. Dengan menggunakan hewan uji 20 ekor tikus diacak menjadi 5 kelompok percobaan, diantaranya 4 ekor tikus. Kelompok pertama adalah kontrol normal menggunakan aquadest, kelompok kontrol negatif yang di induksi gentamisin dengan dosis 80 mg/kg BB, dilanjutkan dengan kelompok uji yang diberikan ekstrak daun cep- cepan dengan berbagai dosis. Hari ke-1 sampai hari ke-3 sebelum di induksi hewan uji diberi ekstrak daun cep- cepan dengan berbagai dosis. Selanjutnya dalam hari ke-4 hingga hari ke-8 hewan uji di induksi dengan gentamisin inj 80 mg secara intraperitoneal dan diberikan ekstrak daun cep- cepan dengan berbagai dosis.

#### **3.4.4 Pengambilan Sampel Darah**

Pada hari ke 9 darah tikus di ambil melalui retro-orbital mata. Kemudian di masukan ke dalam tabung EDTA. Setelah itu di ukur kadar kreatinin, ureum dan asam urat menggunakan Kit Aspen Diagnostics privste Ltd dianalisis dengan alat spektrofotometer humalyzerr 200.

### 3.6 Alur Penelitian





**Gambar 3. 1** Alur Penelitian

### 3.7 Analisis Data

Hasil penelitian di tampilkan sebagai nilai rata-rata SEM pengujian statistika menggunakan *oneway* analisis variana (ANOVA) di lakukan untuk menentukan perbedaan nilai rata-rata antara kelompok perlakuan. Kemudian di lakukan pengujian tukey HSD untuk menentukan apakah terdapat perbedaan signifikan ( $p<0,05$  ) pada masing-masing kelompok (Alkandahri et al., 2021 )

### 3.8 Lokasi Penelitian

Penelitian akan dilakukan di laboratorium farmakologi Universitas Buana Perjuangan Karawang, pada bulan Februari sampai Juni 2024.