

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. Untuk pengujian nefroprotektif digunakan induksi gentamisin injeksi dengan dosis sebesar 80 mg/kg.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini menggunakan pipet corong pisah, kertas saring, mortir dan stemper, pompa vakum, corong, *bunshner*, *rotary evaporator*, tabung reaksi, *beaker glass*, batang pengaduk, sonde, *handscon*, spuit 5 cc, mikropipet, tabung EDTA, pipa hematokrit, kuvet.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini menggunakan daun cep-cepan, gentamisin injeksi 80mg, etil asetat, aquadest, PGA 1%, etanol 70% dan 96%, eter, asam sulfat, asam klorida, amil alkohol, benzena, natrium hidroksida, serbuk magnesium, kloroform dan isopropanol, pereaksi *Dragendroff*, mayer, molish, serta pereaksi *Lieberman-Bouchard*.

3.2.3 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan yaitu tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus Galur Wistar*) yang didapatkan dari CV. Mitra Putra Animal Rancaekek Bandung (Lampiran No.10) dengan BB tikus antara 150-250 gr.

3.3 Variabel penelitian

a. Variabel bebas

Variabel bebas yang dilakukan penelitian ini menggunakan fraksi etil asetat daun cep-cepan dengan beberapa kelompok dosis yang berbeda.

b. Variabel Terikat

Variabel terikat yang dilakukan pada penelitian ini kadar kreatinin, ureum, asam urat terhadap tikus putih jantan galur wistar

c. Variabel Terkendali

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

3.3.1 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 dosis Ekstrak daun Cep-cepan	5 kelompok perlakuan dengan menggunakan penginduksi dan 3 kelompok varian dosis Ektrak daun cep-cepan.	-	Nominal	<ol style="list-style-type: none"> 1. K - = Kontrol negatif gentamisin inj 80 mg/kgBB. 2. Kontrol normal menggunakan aquadest. 3. Kelompok ektrak dengan 3 dosis.
2.	Variabel terikat kadar asam urat dan nitrogen urea darah	Mengukur kadar asam urat dan nitrogrn urea darah yang dilakukan dengan alat Spektrofotometer Humalyzer 2000.	Humalyzer 2000	Interval	<ol style="list-style-type: none"> 1. Normal 2. Rendah

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Proses Ekstraksi dan Fraksinasi

Serbuk simplisia daun *C. costata* ditempatkan pada wadah untuk diekstraksi menggunakan metode maserasi yaitu dengan menggunakan etanol 70% selama 3 hari (3x24 jam). Selanjutnya masetar di tumpung dan pelarutnya diupkan dengan *Rotary Evaporator* pada suhu 50°C hingga kental dan kembali dipanaskan pada *waterbath* pada suhu 400°C sehingga didapatkan ekstrak kental. Dihitung presentasi rendemen ekstrak yang diperoleh :

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

Ekstrak daun cep-cepan difraksinasi cai-cair menggunakan pelarut dengan kepolaran yang berbeda yaitu dengan pelarut non polar seperti n-Heksan, pelarut semi polar etil asetat, dan pelarut polar yaitu air. Sejumlah ekstrak di timbang dan larutkan dalam pelarut etil asetat dalam corong pisah lalu didiamkan hingga terjadi pemisahan dan dilakukan secara berulang hingga didapatkan lapisan n-Heksan bening. Fraksi etil asetat kemudian diambil dan dikumpulkan. Residu yang dihasilkan di gunakan untuk fraksinasi pelarut polar yakni air. Residu dikocok dan didiamkan hingga didapatkan lapisan air bening. Kemudian fraksinasi cair dari masing-masing pelarut diuapkan dengan rotary epavator untuk mendapatkan fraksinasi kental. Dihitung presentasi reendemen fraksi yang diperoleh :

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

3.4.2 Perlakuan Hewan Uji

Tikus putih Jantan galur wistar dengan berat sekitar 150-250 gr dan berumur 15-20 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 aquades, kelompok kedua adalah kontrol negatif yang di induksikan gentamisin dengan dosis 80 mg/kg, dilanjutkan dengan kelompok uji yang diberikan fraksi etil asetat daun cep-cepan dengan berbagai dosis 50

gr/kg BB, 100 gr/kg BB dan 200 gr/kg BB. Hari ke-1 sampai hari ke-3 sebelum di induksi hewan uji di beri fraksi etil asetat daun cep-cepan dengan berbagai dosis. Kemudian hari ke-4 sampai hari ke-8 hewan uji induksi dengan gentamisin inj 80 mg/kg secara intraperitoneal dan dilanjutkan pemberian fraksi etil asetat daun cep-cepan dengan berbagai dosis.

3.4.3 Pengambilan Sampel Darah

Pada hari ke-9 tikus diambil darahnya melalui retro-orbital mata. Kemudian dimasukan kedalam tabung EDTA, setelah itu diukur kadar kreatinin, ureum, asam urat menggunakan Kit Aspen Diagnostics private Ltd dan dianalisis dengan alat *spektrofotometer humalyzer* 2000.

Cara menggunakan Kit Aspen Diagnostics private Ltd dan dianalisis dengan alat *spektrofotometer humalyzer* 2000 :

a. Pengukuran kadar kreatinin

Untuk mengukur kadar kreatinin, tambahkan 50 μL sampel darah ke dalam tabung reaksi bersih. Tambahkan 100 μL reagen Asleb Diagnostic privat Ltd (kreatinin) ke dalam sampel darah. Aduk sampel dan reagen dengan baik. Inkubasi sampel selama 15 menit pada suhu 37°C. Baca nilai absorbansi sampel pada *spektrofotometer humalyzer* 2000 pada panjang gelombang 340 nm. Gunakan kurva kalibrasi untuk menentukan kadar kreatinin.

b. Pengukuran kadar ureum

Untuk mengukur kadar ureum, tambahkan 50 μL sampel darah ke dalam tabung reaksi bersih. Tambahkan 100 μL reagen (urea) Asleb Diagnostic privat Ltd ke dalam tabung reaksi tersebut. Aduk sampel dan reagen dengan baik. Inkubasi sampel selama 15 menit pada suhu 37°C. Baca nilai absorbansi sampel pada *spektrofotometer humalyzer* 2000 pada panjang gelombang 340 nm. Gunakan kurva kalibrasi untuk menentukan kadar ureum

c. Pengukuran kadar asam urat

Untuk mengukur kadar asam urat, tambahkan 50 μL sampel darah atau urine ke dalam tabung reaksi bersih. Tambahkan 100 μL reagen (asam urat) Asleb Diagnostic privat Ltd ke dalam tabung reaksi tersebut. Aduk sampel dan reagen dengan baik. Inkubasi sampel selama 15 menit pada suhu 37°C. Baca nilai absorbansi sampel pada *spektrofotometer humalyzer* 2000 pada panjang gelombang 880 nm. Gunakan kurva kalibrasi untuk menentukan kadar asam urat.

3.5 Skrining Fitokimia Fraksi Etil Asetat Daun *C. costata*

Penapisan fitokimia fraksi etil asetat daun *C. costata* sebagai berikut :

3.5.1 Pemeriksaan Alkaloid

Identifikasi alkaloid dilakukan dengan metode Mayer, Wagner dan Dragendorff. 0,5 g serbuk simplisia ditambahkan 20 ml HCl 2N, dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bahagian dan masing masing ditambahkan pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorff (Dasopang, 2017).

3.5.2 Pemeriksaan Flavonoid

Sebanyak 10 g serbuk simplisia di tambahkan 10 ml etanol, direfluks selama 10 menit, di saring panas melalui kertas saring. Filtrat diencerkan dengan 10 ml aquadest. Setelah dingin ditambahkan 5 ml eter minyak tanah, dikocok hati-hati, lalu didiamkan sebentar. kemudian di ambil lapisan etanol, diuapkan pada suhu 400C, sisanya dilarutkan dalam 5 ml etil asetat, disaring. Filtratnya digunakan sebagai larutan uji untuk flavonoid dengan cara sebanyak 1 ml larutan uji diuapkan sampai kering, sisa di larutkan dalam 2 ml etanol 96%, ditambah 0,1 g serbuk magnesium dan 10 tetes klorida pekat (Dasopang, 2017).

3.5.3 Pemeriksaan Glikosida

Glikosida merupakan suatu senyawa metabolit sekunder yang berikatan dengan senyawa gula melalui ikatan glikosida (Andar Subakti, 2018). Kata glikosida memiliki makna, yaitu suatu karbohidrat atau gula yang umumnya bersifat oksidator yang disebut dengan glikon. Sedangkan bukan gula disebut sebagai aglikon. Glikosida adalah senyawa alami yang terdiri dari dua bagian

yaitu bagian karbohidrat dan bagian bukan karbohidrat. Glikosida triterpenoid, steroid, dan flavonoid merupakan bagian glikosida bukan karbohidrat yang paling banyak ditemukan. Sedangkan bagian karbohidrat yang paling banyak ditemukan yaitu glukosa, galaktosa, xilosa, dan arabinosa (Rijai, 2016). Senyawa glikosida dapat diperoleh dari berbagai macam tumbuhan dengan cara mengisolasi. Pemisahan senyawa glikosida ini dapat dilakukan melalui beberapa tahapan, mulai dari skrinning fitokimia, ekstraksi, fraksinasi, dan isolasi. Pada uji skrinning fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa yang terdapat dalam tumbuhan (Fajarullah *et al.*, 2014).

3.5.4 Pemeriksaan Glikosida Antrakuinon

Sedikit sampel ekstrak etanol dimasukan kedalam erlenmeyer ditambahkan etanol sampai terendam, ditambahkan 2 ml larutan FeCl₃ 1% ditambahkan asam klorida pekat sampai pH asam direfluks selama 30 menit setelah mendidih. Setelah dingin, masukan kecorong pisah ditambahkan 10 ml benzen, dikocok ditambah 2 ml larutan NaOH 2 N, didiamkan. Lapisan NaOH bewarna merah menunjukkan adanya glikosida antrakuinon (Dasopang, *et al.*, 2017).

3.5.5 Pemeriksaan Steroid dan Terpenoid

Lapisan kloroform disaring melalui pipet yang berisi norit dan kapas. Hasil saringan dipipet dan dibiarkan mengering pada plat tetes. Setelah kering ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard (2 tetes asam asetat anhidrat ditambah 1 tetes asam sulfat pekat). Apabila terbentuk warna merah berarti positif adanya terpenoid dan warna hijau biru berarti positif adanya steroid (Tombuku, *et al.*, 2022).

3.5.6 Pemeriksaan Saponin

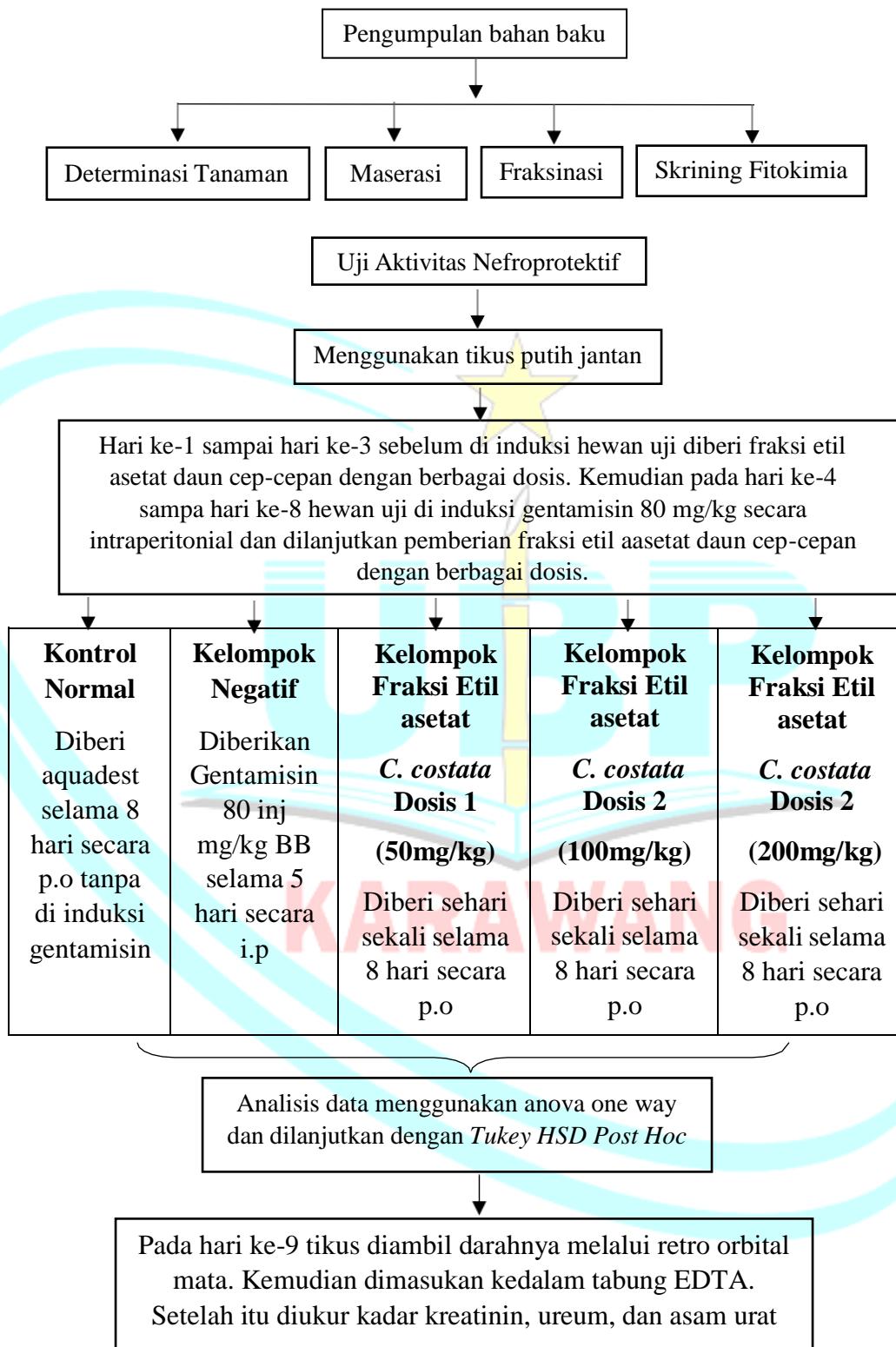
Sedikit sampel ekstrak etanol dimasukan dalam tabung reaksi, ditambahkan aquades panas, didinginkan dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk buih yang mantap selama kurang lebih 10 menit setinggi 1 cm sampai 10 cm dan tidak hilang dengan penambahan 2 tetes asa klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Tombuku, *et al.*, 2022).

3.5.7 Pemeriksaan Tanin

Sebanyak 1 g serbuk simplisia di didihkan selama 15 menit dalam 10 ml aquadest lalu didinginkan dan disaring. Filtrat diencerkan sampai hampir tidak berwarna, lalu ditambahkan 1-2 tetes pereaksi FeCl₃ 1% (Tombuku, *et al.*, 2022).



3.6 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Skema Alur Penelitian

3.7 Analisis Data

Semua data yang didapatkan dalam penelitian ini dinyatakan dalam bentuk rata-rata \pm SEM (*Standar Error Mean*). Perbedaan antara parameter yang diukur di bandingkan dengan menggunakan analisis varian satu arah (*Anova One Way*) dan dilanjutkan dengan uji *Tukey HSD Post Hoc* menggunakan Graphpad prism versi 8.

3.8 Lokasi Penelitian

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

