

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan percobaan yang dilaksanakan di lingkungan laboratorium, dengan model hewan coba berupa tikus jantan galur Wistar. Penelitian ini membagi subjek menjadi lima kelompok yang diberi perlakuan yang berbeda-beda. Kelompok kontrol negatif diberikan induksi gentamisin dengan dosis 80 mg/kg, sedangkan kelompok eksperimental menerima tiga dosis berbeda dari senyawa yang sama, yaitu 50, 100, dan 200 mg/kg. Terdapat pula kelompok kontrol positif yang diberikan perlakuan normal

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Penelitian ini menggunakan alat laboratorium berupa mortir dan stamper, corong, *coong pisah*, *rotary evaporator*, tabung reaksi, *beaker glass*, batang pengaduk, sonde, *handscon*, spuit 1 cc, mikropipet, tabung EDTA, pipa hematokrit, kuvet.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa etanol 70% daun cepcepan, gentamisin injeksi, n-heksan, aquadest, PGA 1%.

3.2.3 Hewan Uji

Tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus L.*) Galur Wistar sebagai hewan uji yang didapatkan dari CV. Mitra Putra Animal Rancaekek Bandung dengan BB tikus antara 150-300 g.

3.3 Variabel penelitian

a. Variabel bebas

Variabel bebas yang dilakukan penelitian ini menggunakan fraksi n-heksan 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 hewan uji.

c. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol 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:

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 ekstrak daun cep-cepan.	-	Nominal	1. Kelompok gentamisin inj 80 mg/KgB. 2. Kontrol normal menggunakan aquadest 3. Kelompok ekstrak dengan 3 dosis berbeda. 50 mg, 100 mg dan 200 mg
2	Variabel terikat Kadar kreatinin, ureum, dan asam urat	Mengukur kadar kreatinin, ureum dan asam urat yang dilakukan dengan alat spektrofotometer humalyzer 2000	Humalyzer 2000	Interval	1. Normal 2. Rendah

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Proses Ekstraksi dan Fraksinasi

Serbuk simplisia daun *C.costata* ditempatkan dalam wadah tertutup rapat dan direndam dalam etanol 70% dengan pengadukan berkala selama 3 hari. Metode ekstraksi ini dikenal sebagai maserasi. Kemudian maserai ditampung dan pelarutnya diuapkan menggunakan *Rotary Evaporator* dengan menggunakan suhu mencapai 50°C hingga kental dan dipanaskan kembali pada *waterbath* dengan suhu 400°C sehingga didapatkan ekstrak kental.

Dihitung presentasi rendemen ekstrak yang diperoleh :

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

Ekstrak etanol 70% daun cep-cepan difraksinasi cair-cair menggunakan pelarut non polar yaitu n-heksan. Ekstrak yang sudah ditimbang dicampur dengan n-heksan dalam corong pisah. Campuran ini kemudian didiamkan hingga terpisah menjadi dua lapisan. Proses ini diulang beberapa kali sampai lapisan n-heksan menjadi jernih. Lalu fraksinasi diuapkan dengan rotary evaporator 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 Determinasi

Pengumpulan bahan baku dan persiapan simplisia di determinasi di herbarium jatinangor departemen biologi FMIPA Unpad (Alkandahri *et al.*, 2021)

3.4.3 Perlakuan Hewan Uji

Tikus putih Jantan galur wistar dengan ukuran berat badan sekitar 150-250 g dan berusia 15-20 minggu dijadikan sebagai hewan percobaan dalam penelitian kali ini. 20 ekor hewan uji, lalu diacak menjadi 5 kelompok percobaan, masing-masing 4 ekor tikus, kelompok pertama adalah kontrol normal menggunakan aquades, kelompok kedua adalah kontrol negatif yang diinduksikan gentamisin untuk memberikan efek nefrotoksisitas terhadap

tikus dengan dosis 80 mg/kg, dilanjutkan dengan kelompok uji yang diberikan fraksi n-heksan daun cep- cepan dengan berbagai dosis. Hari ke-1 sampai hari ke-3 sebelum di induksi hewan uji di beri fraksi n-heksan 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 n-heksan daun cep-cepan dengan berbagai dosis.

3.4.4 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 humalyzerr 2000 :

a. Pengukuran kadar kreatinin

Untuk mengukur kadar kreatinin, tambahkan 50 μ L sampel darah ke dalam tabung reaksi bersih. Tambahkan 100 μ L 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 μ L sampel darah ke dalam tabung reaksi bersih. Tambahkan 100 μ L 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 μ L sampel darah atau urine ke dalam tabung reaksi bersih. Tambahkan 100 μ L 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 n-heksan Daun *C. costata*

Penapisan fitokimia fraksi n-heksan daun *C. costata* sebagai berikut :

3.5.1 Pemeriksaan Alkaloid

Sampel dicampur dengan amonia, lalu tambahkan kloroform sembari digerus. Bagian bawah yang berwarna seperti minyak (kloroform) diambil dan disaring. Cairan hasil saringan kemudian dicampur dengan asam klorida. Campuran dikocok hingga terjadi pemisahan fasa. Fasa asam dipipet kemudian bagi menjadi tiga bagian. Bagian awal dijadikan sebagai blanko, bagian kedua diuji dengan pereaksi Mayer untuk konfirmasi keberadaan alkaloid yang ditandai dengan terbentuknya endapan putih keruh. Bagian ketiga diuji dengan pereaksi *Dragendorff* yang akan menghasilkan endapan berwarna kuning hingga jingga jika terdapat alkaloid (Farnsworth, 1966).

3.5.2 Pemeriksaan Flavonoid

Sampel ditambahkan dengan air kemudian dipanaskan lalu dilakukan penyaringan. Filtrat yang diperoleh kemudian direaksikan dengan serbuk magnesium dan asam klorida pekat dalam suasana asam. Setelah itu, dilakukan ekstraksi cair-cair dengan amil alkohol agar dapat dipisahkan senyawa yang larut dalam amil alkohol. Dilakukan pengamatan terhadap warna pada lapisan amil alkohol sebagai indikator adanya senyawa tertentu. Terbentuk warna kuning hingga merah yang dapat ditarik oleh amil alkohol merupakan senyawa flavonoid (Farnsworth, 1966).

3.5.3 Pemeriksaan Glikosida

Sampel didicampurkan dengan campuran etanol 96% serta air dengan perbandingan (7:3) dan asam klorida 2 N hingga terendam, direfluks selama kurang lebih 1 jam, lalu didinginkan serta disaring. Kemudian tambahkan air suling dan timbal (II) asetat 0,4 M terhadap filtrat, lalu aduk, kemudian diamkan sampai endapan turun lalu dilakukan penyaringan. Filtrat yang diperoleh dipartisi dengan campuran kloroform dan isopropanol dalam perbandingan volume 2:3. Campuran dikocok dengan kuat untuk mempercepat proses ekstraksi. Setelah didiamkan, akan terbentuk dua lapisan yang berbeda densitas. Lapisan atas, yang bersifat polar dan mengandung sebagian besar komponen gula, dapat dipisahkan dari lapisan bawah yang bersifat non-polar

- Lapisan atas

Setelah penambahan pereaksi Molish dan air kedalam campuarn, lalu tambahkan asam sulfat pekat perlahan-lahan dituangkan ke dalam campuran, terbentuk lapisan berwarna di antara kedua cairan. Warna cokelat, ungu, atau keunguan ini adalah hasil dari reaksi dehidrasi karbohidrat oleh asam sulfat pekat. - Lapisan bawah

Penambahan pereaksi Lieberman-Bouchard digunakan untuk identifikasi senyawa triterpenoid dan steroid. Warna ungu sedikit merah mengindikasikan adanya triterpenoid, apabila

3.5.4 Pemeriksaan Glikosida Antrakuinon

Masukan sampel ke dalam erlenmeyer, tambah etanol hingga terendam, tambahkan asam sulfat 2 N, lalu panaskan sebentar, ketika sudah mulai dingin masukkan dalam corong pisah tambahkan 10 ml benzena, diaduk lalu diamkan. Pisahkan lapisan benzena kemudian saring, aduk lapisan benzena dengan 2 ml larutan natrium hidroksida 2 N, kemudian diamkan. Lapisan natrium hidroksida berwarna merah yang menunjukkan adanya glikosida antrakuinon (Farnsworth, 1966).

3.5.5 Pemeriksaan Steroid dan Terpenoid

Tambahkan eter terhadap sampel sembari digerus lalu diaduk dan diamkan, setelah itu dipipet serta dilakukan penyaringan. Filtrat diuapkan eternya lalu residunya ditambahkan pereaksi *Lieberman-Bouchard* dan diamati warnanya. Senyawa steroid dikonfirmasi dengan berubahnya warna biru-hijau sedangkan senyawa triterpenoid dikonfirmasi dengan berubahnya warna ungu (Farnsworth, 1966).

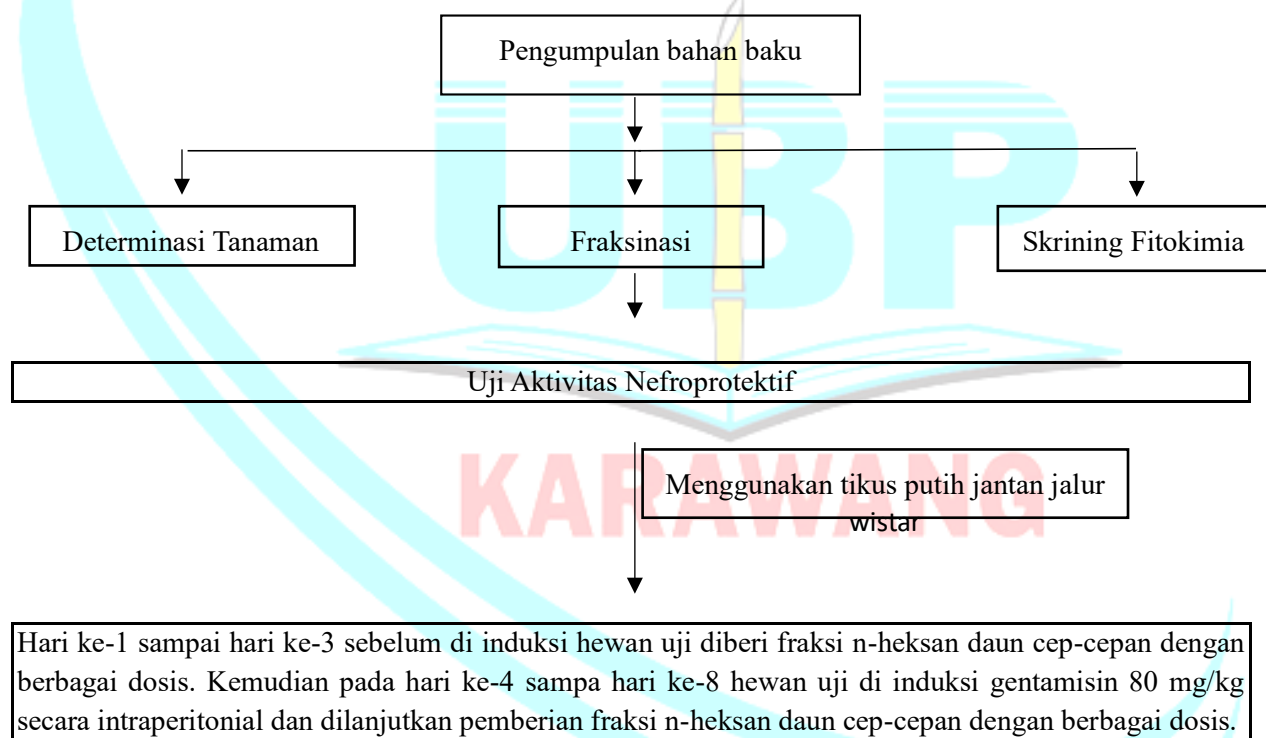
3.5.6 Pemeriksaan Saponin

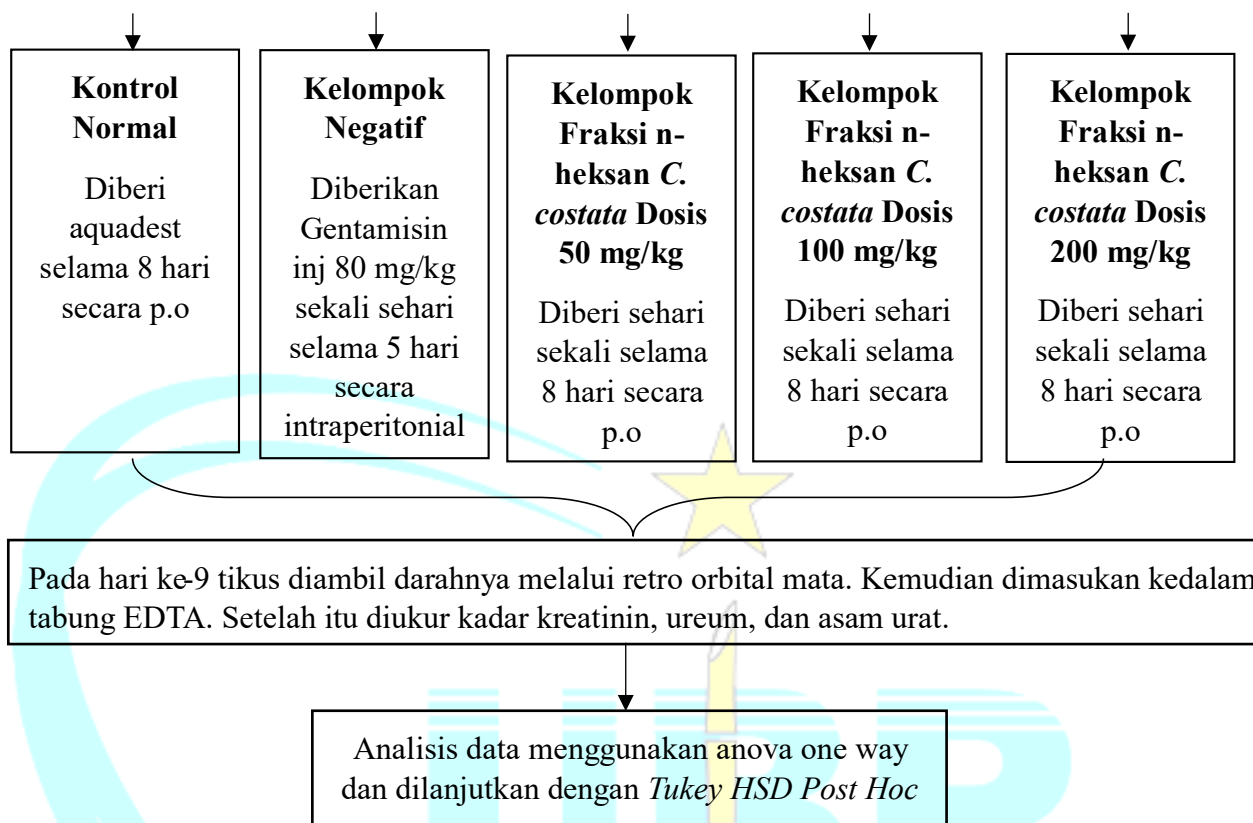
Sampel ditambahkan air pada tabung reaksi, lalu panaskan dalam penangas air dalam kurun waktu 15 menit kemudian saring dan dinginkan. Ketika sudah dingin, filtrat diaduk dengan kuat secara vertikal dalam kurun waktu 30 detik. Senyawa saponin dikonfirmasi dengan terbentuknya busa setinggi kurang lebih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

3.5.7 Pemeriksaan Tanin

Sampel ditambahkan air pada tabung reaksi, lalu panaskan dalam penangas air dalam kurun waktu 15 menit, saring panas-panas. Hasil saringan diencerkan dengan air suling hingga tidak memiliki warna. Dua mililiter larutan ini kemudian direaksikan dengan satu hingga dua tetes larutan besi(III) klorida 1%. Terbentuknya kompleks berwarna biru, hitam, atau hijau tua mengindikasikan adanya gugus fenol bebas dalam struktur tanin yang bereaksi dengan ion besi(III) (Farnsworth, 1966).

3.6 Alur Penelitian





Gambar.3.1 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 (*Anova One Way*) serta lanjut pengujian *Tukey HSD Post Hoc* menggunakan Graphpad prism.

3.8 Lokasi Penelitian

Riset ini diselenggarakan pada laboratorium farmakologi Universitas Buana Perjuangan Karawang, pada bulan Juni sampai Agustus 2024

