

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *post-test control-only* secara eksperimental laboratorium dengan pengujian hepatoprotektif dengan tikus putih jantan galur wistar menggunakan hewan uji total 20 ekor tikus dikelompokkan menjadi 5 kelompok perlakuan dengan 4 ekor tikus perkelompoknya yaitu kontrol positif silymarin, kontrol negatif, dan tiga kelompok perlakuan dengan pemberian fraksi n-heksan kulit batang jambang yang terdiri dari tiga variasi dosis yaitu 50, 100, dan 200 mg/KgBB. Penelitian ini menggunakan parasetamol 1000 mg/KgBB sebagai penginduksi.

3.2 Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah fraksi n-heksan dari kulit batang jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) yang telah diproses melalui metode ekstraksi dan fraksinasi. Sampel digunakan sebagai bahan uji untuk mengetahui aktivitas hepatoprotektif terhadap tikus putih jantan galur Wistar yang diinduksi parasetamol.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tempat makan tikus, baki plastik, botol minum tikus, penutup kawat, timbangan tikus, timbangan analitik, mortir dan stamper, corong *bushner*, corong pisah, kertas saring, kaca arloji, spatula, gelas ukur, vial, *rotary evaporator*, tabung reaksi, *beaker glass*, batang pengaduk, sonde, *handscoon*, spuit 1 cc, maserator, *photometer humalyzer* 2000, sentrifugasi, mikropipet, tabung EDTA, pipa hematokrit, kuvet, dan tabung *effendrof*.

3.3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang dipakai untuk penelitian yaitu kulit batang kering jamblang (1,5 kg), parasetamol 500 mg, silymarin (hepamax), n-heksan, aquadest, *Pulvis Gummi Arabicum* (PGA), eter, asam sulfat, asam klorida, amil alcohol, benzene, natrium hidroksida, serbuk magnesium, kloroform, isopropanol, pereaksi (dragendorff, mayer, lieberman-bouchard), reagen albumin (buffer sitrat, bromocresol green), reagen ALT, reagen AST, dan etanol 70%.

3.3.3 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 bobot tikus antara 200-300 gram.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Klasifikasi Variabel

a. Variabel Bebas

Variabel bebas yang dipakai dalam penelitian ini yaitu fraksi n-heksan kulit batang jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) bersama menggunakan beberapa kelompok variasi dosis yang berbeda yaitu kontrol positif silymarin dosis 50 mg/kg, lalu kontrol negatif diberi parasetamol dosis 1000 mg/kg, dan kelompok uji pemberian fraksi n- heksan kulit batang jamblang tiga variasi dosis yaitu 50, 100, dan 200 mg/KgBB.

b. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu pengujian *Aspartate aminotransferase* (AST), *alanine aminotransferase* (ALT), dan albumin dengan sampel serum darah memakai alat *photometer humalyzer* 2000.

c. Variabel Terkendali

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

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Berlandaskan tabel diartikan operasional variabel pada studi ini, yaitu:

Tabel 3. 1 Definisi Variasi Operasional

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
1	Variabel Bebas				
	Dosis fraksi n-heksan kulit batang jambang (<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels)	5 kelompok perlakuan: 1. Menggunakan obat silymarin sebagai kontrol positif 2. Penginduksi parasetamol sebagai kontrol negatif (-) 3. Kelompok menggunakan fraksi n-heksan ekstrak kulit batang <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels dengan 3 dosis yang bervariasi.	-	Nominal	1. Kontrol Negatif (-), parasetamol 50 mg/KgBB 2. Kontrol Positif (+), Silymarin 50 mg/KgBB 3. Dosis 1 (50 mg/KgBB) = kelompok terapi dosis 4. Dosis 2 (100 mg/KgBB) = kelompok terapi dosis 5. Dosis 3 (200 mg/KgBB) = kelompok terapi dosis
2	Variabel Terikat				
	Uji <i>Aspartate aminotransferase</i> (AST)	Pengujian serum darah tikus yang diuji memakai alat <i>photometer humalyzer</i> 2000.	<i>Photometer humalyzer</i> 2000	Interval	1. Normal: <55 U/L 2. Tinggi: >55 U/L (Ahmed <i>et al.</i> , 2018).
	Uji <i>Alanine aminotransferase</i> (ALT)	Pengujian serum darah tikus yang diuji memakai	<i>Photometer humalyzer</i> 2000	Interval	1. Normal: 42,9 – 67,4 U/L

	alat <i>photometer humalyzer</i> 2000.	2. Tinggi: 30,2 U/L (Azizah T <i>et al.</i> , 2015).
Uji Albumin	Mengukur albumin yang diuji memakai dengan alat <i>photometer humalyzer</i> 2000.	Interval 1. Rendah 3,8 g/dl 2. Tinggi: >5 g/dl (Sammad <i>et al.</i> , 2017).

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Preparasi Sampel

1. Pembuatan Ekstrak dengan Metode Maserasi

Serbuk simplisia kulit batang jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) 1,5 kg disimpan pada wadah yang digunakan untuk ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% selama 1x24 jam dilakukan remaserasi sebanyak kurang lebih 3 kali, setelah itu lalu maserat tersebut di tampung dan pelarutnya diuapkan menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu 50 °C sampai kental setelah itu kembali dipanaskan pada suhu 40 °C memakai *waterbath*, sehingga dihasilkan ekstrak kental. Dihitung persentase rendemen ekstrak yang diperoleh:

$$\text{Rendamen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100\%$$

2. Pembuatan Fraksi n-Heksan Kulit Batang Jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Ekstrak etanol kulit batang jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) difraksinasi cair-cair dengan menggunakan pelarut berdasarkan kepolaran yang berbeda-beda diantaranya: pelarut polar yakni air, pelarut semi polar yaitu etil asetat, dan pelarut non polar yaitu n- heksan. Ditimbang 250 g ekstrak etanol kulit batang jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels), dan dilarutkan dengan pelarut n-heksan ke dalam corong pisah di kocok sesekali, kran atas

dibuka untuk mengeluarkan gas, kocok sampai 3x pengulangan tunggu hingga terpisah fase air dan fraksi. Setelah itu, buang fase air dan diambil fase fraksi n-heksan dan dimasukkan ke dalam rotary evaporator dan dikentalkan dalam penangas air (waterbath) sampai menjadi ekstrak kental.

$$\text{Rendamen} = \frac{\text{Berat Fraksi yang Diperoleh}}{\text{Berat Ekstrak}} \times 100\%$$

3. Pembuatan Larutan Baku Silymarin

Pembuatan larutan baku silymarin dengan cara menimbang seksama 50 mg/kg serbuk silymarin, kemudian dilarutkan dalam PGA 1% yang telah dibuat sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam *beaker glass* aduk sampai homogen, lalu diberikan pada tikus secara oral.

4. 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% di dalam *beaker glass* aduk sampai homogen dan diberikan secara oral.

5. Pembuatan Suspensi Fraksi n-Heksan Kulit Batang Jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Ditimbang bobot tikus, setelah didapat disesuaikan dengan dosis ekstrak etanol kulit batang jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) menggunakan 3 perbandingan dosis 50, 100, dan 200 mg/KgBB, lalu ditimbang fraksi n-heksan kulit batang jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) dimasukkan ke dalam *beaker glass* lalu dilarutkan dengan PGA 1% aduk sampai larut dan diberikan secara oral pada tikus.

3.5.2 Randomisasi Hewan Uji

Hewan uji ini ditandai dengan angka 1 sampai 20 ekor pada ekor hewan uji. Selanjutnya randomisasi hewan menggunakan excel dengan rumus $=\text{RAND}()$, kemudian di sort berdasarkan angka untuk pengelompokkan hewan percobaan.

Pengelompokkan menggunakan 20 ekor tikus, dibagi masing-masing kelompok 4 ekor tikus. Adapun kelompok positif silymarin 50 mg/kg, selanjutnya kelompok negatif parasetamol 1000 mg/kg, lalu 3 kelompok dosis yaitu: dosis 1 (50 mg/kgBB), dosis 2 (100 mg/kgBB), dan dosis 3 (200 mg/kgBB). Jumlah pengulangan tiap kelompok yaitu berdasarkan dengan rumus Federer (Hanafiah, 1993) adalah sebagai berikut:

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

Keterangan:

t: jumlah anggota perlakuan

n: jumlah sampel

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

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

$$(n-1)(4) \geq 15$$

$$(n-1) \geq 15/4$$

$$(n-1) \geq 3$$

$$n = 1+3 \rightarrow 4 \text{ sampel}$$

3.5.3 Pengelompokkan Perlakuan pada Tikus

Pada penelitian ini tikus yang digunakan tikus putih jantan galur Wistar sebanyak 20 ekor dibagi dengan 5 kelompok, dan setiap per kelompoknya terdiri dari 4 tikus.

Tabel 3. 2 Pengelempokan Hewan Uji

Kelompok		Perlakuan
I	Kontrol Negatif + Induksi Parasetamol	Suspensi parasetamol dosis 1000 mg/KgBB diberikan pada hari ke 15-21
II	Kontrol Positif + Induksi Parasetamol	Silymarin dosis 50 mg/KgBB diberikan pada hari ke 1-21 dan diberikan induksi pada hari ke 15-21
III	Fraksi n-heksan Dosis 1 + Induksi Parasetamol	Fraksi <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels dosis (1) 50 mg/kgBB diberikan pada hari 1-21 dan diberikan induksi pada hari ke 15-21
IV	Fraksi n-heksan Dosis 2 + Induksi Parasetamol	Fraksi <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels dosis (2) 100 mg/kgBB diberikan pada hari 1-21 dan diberikan induksi pada hari ke 15-21
V	Fraksi n-heksan Dosis 3 + Induksi Parasetamol	Fraksi <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels dosis (3) 200 mg/kgBB diberikan pada hari 1-21 dan diberikan induksi pada hari ke 15-21

Penelitian ini dilakukan selama 21 hari, tikus diberi obat yang sesuai dengan kontrol perlakuannya yaitu Parasetamol, silymarin, dan ke-3 dosis fraksi n-heksan kulit batang jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) selama 14 hari. Lalu selanjutnya diberikan induksi obat parasetamol pada hari ke 15-21, silymarin dan ke-3 fraksi. Begitupun pada hari ke-22 sampel darah tikus diambil melalui orbital mata dan untuk dilakukan setrifugasi agar bisa didapatkan serum darah dan dilanjutkan pada pengujian kadar AST (*Aspartate aminotransferase*), ALT (*Alanine aminotransferase*), dan kadar albumin menggunakan alat fotometer.

3.5.4 Pengambilan Sampel Darah

Pada hari ke-22, semua hewan uji dibius menggunakan kloroform disimpan diwadiah tertutup. Pengambilan darah diambil melalui orbitalis mata. Darah ditampung didalam tabung effendrof dengan mengalirkannya secara perlahan-lahan ke dinding tabung, lalu setelah itu disentrifugasi (Pertiwi & Widyaningsih, 2015). Selama 5 menit

menggunakan kecepatan 7000 rpm. Bagian serum kemudian dikumpulkan untuk dianalisis menggunakan reagen AST (*Aspartate aminotransferase*), ALT (*Alanine aminotransferase*), dan Albumin menggunakan *photometer humalyzer 2000*.

3.5.5 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 Pengukuran Kadar AST dan ALT

Perlakuan	Working Reagen (mL)	Sampel (μL)
Buffer	8	-
Substrat	2	-
Working Reagen	-	1000
Sampel Serum	-	100

Sampel darah tikus disentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan serumnya. Setelah itu, lakukan pengukuran kadar AST dan ALT pipet sebanyak 100 μL serum darah tikus ditambah dengan 1000 μL reagen masing-masing reagen dicampurkan, lalu sampel harus langsung diukur kadar AST (*Aspartate aminotransferase*) dan ALT (*Alanine aminotransferase*) menggunakan fotometer dengan panjang gelombang 340 nm pada menit ke 1, 2, dan 3.

Reagen yang digunakan untuk AST yaitu *buffer* (*Tris* pH 7,8, *L-aspartate*, LDH, NADH), serta substrat (*2-oxoglutarate*, NADH). Sedangkan reagen ALT *buffer* (*Tris* pH 7,4, *L-alanine*, LDH, NADH), dan substrat (*2-oxoglutarate*, NADH).

3.5.6 Pengukuran Albumin

1. Larutan Blanko

Ambil 10 μL aquadest menggunakan pipet masukkan kedalam kuvet, lalu tambahkan 1000 μL reagen albumin. Kemudian diinkubasi pada suhu 20-25 $^{\circ}\text{C}$ selama 5 menit, baca hasil pengukuran blanko dengan fotometer panjang gelombang 546 nm (Dumas et al., 1971).

2. Larutan Sampel

Ambil 10 μL larutan sampel yaitu serum darah menggunakan pipet masukkan kedalam kuvet, lalu tambahkan 1000 μL reagen albumin. Kemudian diinkubasi pada suhu 20-25 $^{\circ}\text{C}$ selama 5 menit, baca hasil pengukuran sampel dengan fotometer panjang gelombang 546 nm (Dumas et al., 1971).

3.6 Determinasi

Determinasi pada tumbuhan mempunyai arti digunakan untuk mengetahui kebenaran dari sampel. Pernyataan nomenklatur meliputi nama ekstrak, nama latin tumbuhan, bagian tumbuhan yang dipakai, dan nama tumbuhan Indonesia (Maryam et al., 2020). Kulit batang jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) di determinasi di Jatinangor Departemen Biologi FMIPA Universitas Padjajaran Bandung.

3.7 Skrining Fitokimia Fraksi Kulit Batang Jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

1. Alkaloid

Sampel dibasakan menggunakan ammonia, dan selanjutnya ditambahkan dengan kloroform, digerus kuat. Lalu lapisan kloroform dipipet dan disaring, kemudian ditambahkan HCl 2N. Campuran tersebut dikocok kuat sampai terdapat dua lapisan, lapisan asam dipipet, lalu dibagi menjadi 3 bagian diantaranya: bagian pertama untuk pembanding, bagian kedua ditambahkan dengan pereaksi Mayer, jika terdapat kekeruhan atau

endapan putih pada hasilnya maka menunjukkan adanya alkaloid. Bagian terakhir ditambahkan pereaksi *Dragendorff*, jika hasilnya ada kekeruhan atau endapan kuning- jingga menandakan golongan alkaloid (Farnworth, 1966).

2. Flavonoid

Sampel ditambahkan air lalu dipanaskan kemudian disaring. Filtrat yang terbentuk ditambahkan serbuk Mg dan HCl 5N dan disaring lalu ditambahkan amil alkohol, dikocok kuat, dan amati hasil warna amil alkohol yang terbentuk. Senyawa flavonoid menunjukkan adanya warna kuning - merah yang dapat ditarik oleh amil alkohol (Farnworth, 1966).

3. Glikosida

Sampel ditambahkan campuran etanol 96% dengan air perbandingan (7:3) dan HCl 2N hingga terendam, lalu direfluks selama 1 jam, didinginkan dan disaring. Selanjutnya filtrat yang terbentuk ditambahkan air suling dan timbal (II) asetat 0,4 M, lalu diaduk dan didiamkan sampai endapannya turun lalu disaring. Filtrat disari dengan campuran kloroform dan isopropanol (2:3) didalam corong pisah, dikocok sampai terbentuk 2 lapisan atas (gula) dan bawah (non gula).

- Lapisan atas: Dengan penambahan air dan pereaksi *Molish*, lalu secara perlahan-lahan ditambah H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung, sampai terbentuk cincin warna coklat/coklat keunguan/ungu pada batas antara kedua cairan menunjukkan adanya ikatan gula.

- Lapisan bawah: Dilakukan dengan penambahan pereaksi *Lieberman-Bouchard*, lalu bila terbentuk warna ungu kemerahan adanya triterpenoid, sedangkan bila warna biru menandakan steroid (Farnsworth, 1966).

4. Glikosida Antrakuinon

Sampel dimasukkan ke erlenmeyer lalu ditambahkan etanol sampai sampel terendam, kemudian ditambahkan H_2SO_4 2N, lalu panaskan sebentar, setelah dingin dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambah 10 ml benzena, dikocok dan didiamkan. Lapisan benzena dipisah dan disaring, kocok lapisan benzena dengan 2 ml NaOH 2N, didiamkan. Lapisan

NaOH hasilnya berwarna merah menandakan golongan antrakuinon (Farnsworth, 1966).

5. Steroid dan Terpenoid

Sampel ditambah dengan eter sambil digerus dan dikocok, lalu didiamkan. Selanjutnya dipipet dan disaring. Filtratnya diuapkan lalu hasil residunya ditambahkan pereaksi *Lieberman-Bouchard* lalu amati warna yang terbentuk, bila warna yang terbentuk warna biru-hijau maka termasuk steroid. Sedangkan warna ungu untuk triterpenoid (Farnsworth, 1966).

6. Saponin

Sampel ditambahkan air pada tabung reaksi kemudian dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit, lalu saring dan dinginkan. Setelah dingin, filtrat dikocok kuat dengan vertikal selama 30 detik. Untuk senyawa saponin terbentuk adanya busa setinggi 1 cm yang persisten selama beberapa menit dan tidak hilang setelah ditambahkan HCl atau didiamkan selama 20 menit (Farnsworth, 1966).

7. Tanin

Sampel ditambah air pada tabung reaksi kemudian dipanaskan dipenangas air selama 15 menit, lalu saring panas-panas. Filtratnya diencerkan dengan air suling sampai tidak berwarna. Larutan diambil sebanyak 2 ml lalu ditambahkan 1-2 tetes pereaksi FeCl_3 1%. Bila terbentuk warna biru atau kehitaman menandakan senyawa tannin (Farnsworth, 1966).

3.8 Analisis Data

Hasil penelitian yang didapatkan ditampilkan dalam bentuk rata-rata + SEM (*Standar Error Mean*). Pengujian perbedaan antara parameter yang diukur dibandingkan dengan menggunakan analisis varian satu arah (ANOVA) *oneway*, 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 10 (Alkandahri *et al.*, 2021).

3.9 Lokasi Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Buana Perjuangan karawang dan Laboratorium Rumah Sakit Permata Keluarga pada bulan Februari sampai April 2025.



3.10 Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Alur Penelitian