

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang diambil adalah jenis penelitian eksperimen.

B. Tempat dan waktu penelitian

a. Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi bahan alam, Laboratorium Farmakologi Prodi Farmasi Poltekkes Kemenkes Kupang dan Laboratorium Kesehatan Provinsi NTT.

b. Waktu penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan Januari - Mei 2024

C. Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah diberi perlakuan Fraksi air daun falloak (*Sterculia quadrifida*, R.Br.) dengan dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB.

b. Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah efek hepatoprotektor fraksi air daun falloak (*Sterculia quadrifida*, R.Br.)

c. Variabel Pengganggu

Variabel pengganggu penelitian ini adalah kondisi hewan uji (usia, kondisi lingkungan dan pakan) dan tempat tumbuh falloak.

D. Defenisi Operasional

Tabel 1. Defenisi Operasional

No	Variable	Definisi operasional	Alat ukur/ cara ukur	Skala
1.	Fraksi air daun faloak	Daun faloak yang telah dikeringkan, dihaluskan menjadi simplisia lalu diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dan dievaporasi sehingga dimemperoleh eksrak kental hasil eksrak kental di lakukan fraksinasi sehingga memperoleh fraksi air.	Timbangan digital	Nomina l
2.	Dosis	Menggunakan faktor koversi dari manusia 70 kgBB ke tikus 200 g BB dengan dikalikan 0,018.	Kalkulator	Nomina l
3.	Hepatoprotektor	Senyawa obat yang dapat memberikan perlindungan pada hati dari kerusakan yang ditimbulkan oleh obat.	Parameter bilirubin total	Ratio
4.	Tikus putih jantan (<i>Rattus norvegicus</i>) galur wistar	Salah satu hewan uji yang digunakan dalam pengujian efek hepatoprektektor	Timbangan digital hewan uji	Ratio

E. Alat dan bahan

1. Alat

Timbangan analitik (*pyrex ew 220-3 nm*), blender, ayakan mesh 60, gelas kimia (*pyrex*), gelas ukur (*pyrex*), cawan porselin, batang pengaduk, beaker glass (*pyrex*), Erlenmeyer (*pyrex*), corong kaca (*pyrex*), pipet tetes (*pyrex*), tabung reaksi (*pyrex*), rak tabung, kaca arloji (*pyrex*), kertas perkamen, sendok tanduk, alumunium foil, waterbath (*pyrex 1042*), stopwatch, sarung tangan, mikropipet, rotary vacuum evaporator, Surgical kit, sonde oral,

disposable syringe, tabung vacutainer, *pullbox*, *icepack*, *sentrifuge*, kimia analyser (Erba XL 200), kapas, jarum pentul, Styrofoam Gabus, kandang pemeliharaan tikus, dan botol minum tikus.

2. Bahan

Ekstrak Daun Faloak, etanol 96%, reagen bilirubin total, parasetamol, curcumin, reagen mayer, reagen dragendroff, reagen wagner, serbuk Mg, HCL pekat, n-heksana, HCL 2N, metanol, kloroform, asam sulfat pekat, Etil asetat, Anhidrida asam asetat, FeCl₃, Na CMC.

F. Prosedur penelitian

1. Persiapan bahan uji

Daun faloak digunakan dari kelurahan liliba, Kota Kupang yang sudah dilakukan determinasi dengan No.55/HB/01/2023. Daun faloak tersebut yang sudah di determinasi dibuat menjadi simplisia meliputi:

- a. Pengumpulan bahan baku dengan cara mengambil daun faloak yang dipanen secara bertahap bersamaan pada saat kuncup bunga dan bunga mekar
- b. Sortasi basah dengan cara daun faloak yang sudah dipetik selanjutnya dipisahkan dari pengotor maupun serangga yang masih menempel dan dipilih daun yang masih utuh
- c. Pencucian dengan cara daun faloak dicuci dengan air mengalir sampai bersih dari pengotor lalu dilanjutkan dengan perajangan
- d. Pengeringan dilakukan dengan cara daun faloak dijemur disinar matahari yang ditutupi kain hitam diatasnya.

- e. Sortasi kering dilakukan dengan cara pemisahan kembali kotoran-kotoran yang masih menempel pada daun faloak untuk dibuang.
 - f. Pembuatan serbuk simplisia yaitu simplisia dihaluskan menjadi serbuk kering.
2. Produksi ekstrak etanol daun faloak (*Sterculia quadrifida*, R.Br)

Menurut buku Farmakope Indonesia IV ekstrak adalah sediaan bermassa kental, didapatkan dari ekstraksi senyawa aktif terhadap tumbuhan ataupun hewan memakai pelarut sesuai, hampir seluruh pelarut diuapkan. Untuk mendapatkan ekstrak kering dapat berasal dari tanaman dan hewan, melewati proses pemekatan.

Pembuatan ekstrak etanol diawali dengan pengambilan dan pengumpulan tanaman faloak yang berasal dari kelurahan liliba, kabupaten Kupang. Tanaman yang dikumpulkan harus diidentifikasi tanamannya. Daun Faloak yang teridentifikasi dipanen kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C. Serbuk daun faloak sebanyak 1 kg direndam dengan etanol 96% dalam 10 liter selama 5 hari kemudian diremaserasi selama 2 hari direndam dengan etanol 96% dalam 5 liter. Semua maserat yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dan selanjutnya diuapkan dalam penangas air pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak pekat.

3. Fraksinasi daun faloak

Fraksinasi merupakan teknik pemisahan ekstrak hasil maserasi yang telah diuapkan sehingga diperoleh ekstrak kental (Tivani *et al.*, 2021). Sebanyak 20 gram ekstrak kental daun faloak yang dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian dilarutkan dengan aquades sebanyak 40 mL. Setelah larut, dimasukkan ke dalam corong pisah 250 ml dan

ditambahkan pelarut n-heksan sebanyak 40 mL setelah itu dikocok dalam corong pisah 250 mL selama 10 kali sampai homogen. Dibiarkan sampai terbentuk 2 lapisan air dan lapisan n-heksan, kemudian masing-masing lapisan tersebut ditampung dalam wadah yang berbeda. Lapisan air kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* hingga kering, lalu ditimbang dan diperoleh fraksi air. Rendemen fraksi dihitung berdasarkan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Rendemen fraksi} = \frac{\text{Berat Fraksi}}{\text{Berat Ekstrak}} \times 100 \%$$

4. Uji kadar air

Uji kadar air dengan cara titrasi dapat dilakukan karena larutan sulfafur-dioksida dan iodium dalam piridina dan dalam etanol (96%) dapat bereaksi dengan air secara stokhiometris. Dalam larutan berwarna, tidak dapat digunakan pengamatan titik akhir dengan mata. Alat elektris yang digunakan adalah yang mempunyai potensial lebih kurang 200 mV antara sepanjang elektrode platina yang dicelupkan ke dalam larutan yang dititrasi. Pada titik akhir titrasi, sedikit pereaksi yang berlebih akan menaikkan arus antara 50 dan 150 mikroamper selama 30 detik sampai 30 menit. waktu yang diperlukan akan semakin pendek jika zat uji larut dalam pereaksi. pelarut yang digunakan adalah *metanol mutlak P* (FI. ed III)

5. Identifikasi kandungan senyawa kimia

a. Alkaloid

Ekstrak dicampur dengan 5 mL kloroform dan 5 mL amoniak kemudian dipanaskan, dikocok dan disaring. Asam sulfat 2 N sebanyak 5 tetes ditambahkan pada masing-masing filtrat, kemudian kocok dan didiamkan. Bagian atas dari masing-masing filtrat diambil dan diuji dengan pereaksi Mayer, Wagner dan

Dragendorff. Terbentuknya endapan putih, coklat dan jingga menunjukkan adanya alkaloid (Utami *et al.*, 2017)

b. Flavonoid

Ekstrak dicampur dengan 3 mL etanol 96 % lalu dikocok, dipanas-kan dan dikocok lagi kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan serbuk Mg 0,1 g dan 2 tetes HCl pekat. Terbentuknya warna merah pada lapisan etanol menunjukkan adanya flavonoid (Utami *et al.*, 2017)

c. Terpenoid dan steroid

Ekstrak dicampur dengan 3 mL kloroform atau 3 mL etanol 96 % dan ditambah 2 mL asam sulfat pekat dan 2 mL asam asetat anhidrat. Perubahan warna dari ungu ke biru atau hijau menunjukkan adanya senyawa steroid dan terbentuknya warna kecokelatan antar permukaan menunjukkan adanya senyawa terpenoid (Utami *et al.*, 2017)

d. Tannin

Ekstrak disari dengan 10 mL air kemudian disaring, filtratnya diencerkan dengan air sampai tidak berwarna. Larutan diambil sebanyak 2 mL dan ditambahkan 2 tetes FeCl 1 %. Terbentuknya warna coklat kehijau-hijauan atau biru kehitaman menunjukkan adanya tanin (Mailuhu *et al.*, 2017)

e. Saponin

Ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, air panas sebanyak 10 mL ditambahkan, dinginkan dan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Positif mengandung saponin jika terbentuk buih setinggi 1-10 cm selama tidak kurang dari 10 menit dan pada penambahan 1 tetes HCl 2 N, buih tidak hilang.

6. Pembuatan Na. CMC 1%

Timbang CMC Na 10 g masukan ke dalam mortir yang berisi air panas (70°C) 100 mL. Diamkan selama 20 menit sampai memperoleh hasil yang transparan, lalu digerus hingga terbentuk gel dan diencerkan sedikit demi sedikit menggunakan sisa aquades kemudian dituangkan ke dalam labu ukur 1000 mL hingga batas kalibrasi (Susanto, 2021).

7. Pembuatan suspensi kurkumin

Dosis kandungan kurkuma 200 mg/kgBB manusia untuk satu kali minum, maka dosis kurkuma untuk tikus konversi ke manusia dengan berat 70 kg dan faktor konversi tikus putih 0,018 adalah $0,018 \times 200 \text{ gram} = 3,6 \text{ gram}/200 \text{ gram BB tikus}$ (PRASETYO, Fitrya, and Amriani 2021). Kontrol pembanding yang digunakan adalah curcumin dalam bentuk suspensi curcumin 3,6mg/kgBB.

8. Pembuatan induksi parasetamol

Dosis parasetamol yang dapat mengakibatkan hepatotoksik berkisar 10-15 gram. Konversi dosis dari manusia (70kg) ke tikus (200 g) adalah 0,018. Sehingga dosis induksi parasetamol yaitu :

$$\frac{10.000mg \times 0,018}{200 \text{ gr BB}} = 180mg / 200mgBB$$

Dosis kg/BB tikus adalah :

$$\frac{1000 \times 180 \text{ mg}}{200 \text{ gr BB}} = 900 \text{ mg/kgBB}.$$

9. Penyiapan hewan uji

Tikus jantan putih (*Rattus norvegicus* L) sebanyak 30 ekor diadaptasi selama satu minggu. Hewan uji diadaptasi satu minggu dengan bertujuan untuk menyeragamkan makanan dan hidupnya dengan kondisi lingkungan percobaan sehingga dianggap

memenuhi syarat penelitian. Hewan uji yang sudah diadaptasi dikelompokkan secara acak menjadi 6 kelompok (Laia *et al.*, 2019)

10. Pengelompokan hewan uji

Penelitian ini ditentukan menggunakan rumus *Federer* untuk menghitung berapa hewan uji yang akan digunakan. Rumus *Federer* yang digunakan yaitu $(n-1)(t-1) = 15$, dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan.

Perhitungan jumlah tikus jantan putih yang digunakan dengan rumus *Federer* (Federer, 1963) yaitu:

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

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

$$n-1 \geq 15: 5$$

$$n \geq 3+1$$

$$n \geq 4$$

Penelitian ini akan menggunakan 6 kelompok hewan uji sebagai hasil perhitungan menggunakan rumus *Federer* didapatkan hasil $n \geq 4$, sehingga jumlah sampel tiap kelompok adalah 5 hewan uji

- a. Perlakuan I Kontrol normal adalah perlakuan kelompok tikus yang tidak diberikan perlakuan apapun
- b. Perlakuan II Kontrol positif adalah perlakuan kelompok tikus yang diberikan suspensi curcumin 3,6 mg/kgBB
- c. Perlakuan III kontrol negatif adalah perlakuan kelompok tikus yang diberikan suspensi Na Cmc 1%

- d. Perlakuan IV adalah perlakuan tikus yang diberikan fraksi air daun faloak 50 mg/kgBB
- e. Perlakuan V adalah perlakuan tikus yang diberikan fraksi air daun faloak 100 mg/kgBB
- f. Perlakuan VI adalah perlakuan tikus yang diberikan fraksi air daun faloak 200 mg/kgBB

11. Pengujian efek hepatoprotektor

Pengujian ini diperlukan 30 ekor tikus yang telah diadaptasikan selama 14 hari, setiap tikus ditimbang satu persatu untuk mengetahui berat keseragaman bobot subjek. Dibagi secara acak menjadi 6 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan kelompok uji secara berturut-turut diberikan sediaan CMC Na. 1%, curcumin 3,6 mg/ Kg BB, fraksi air daun faloak 50 mg/kgBB; 100 mg/kgBB; dan 200 mg/kgBB selama 7 hari secara oral. Pada hari ke-8, semua kelompok diinduksi dengan parasetamol 900 mg/kgBB kecuali kelompok kontrol normal yang tidak diberi perlakuan apapun. Dan pada hari ke-15 diambil sampel darah tikus melalui retroorbital. Kemudian darah ditampung dalam tabung vakum. Sampel disentrifugasi 3.000 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan serum darah tikus. Setelah itu, diperiksa kadar bilirubin total dengan alat ERBA XL 200 menggunakan reagen bilirubin total.

G. Analisis data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan uji ANOVA (*One Way Anova*. dilanjutkan uji LSD (*Least Significance Difference*) pada tingkat kepercayaan 95% ($=0,05$).

