

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian eksperimen.

B. Tempat dan waktu penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Bahan Alam, Labaoratorium Kimia, Laboratorium Farmakologi Jurusan Farmasi Poltekkes Kemenkes Kupang, dan Laboratorium Kesehatan Provinsi NTT Kupang.

2. Waktu penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan Januari hingga bulan Mei tahun 2024

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah fraksi air daun faloak dengan dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB.

2. Variabel terikat

Veriabel terikat dari penelitian ini adalah kadar total protein.

3. Variabel pengganggu

Variable pengganggu pada penelitian ini adalah kondisi hewan uji (usia, kondisi lingkungan, pakan) dan tempat tumbuh faloak.

D. Defenisi operasional

Tabel 2 Definisi operasional

No	Variabel	Defeniai operasional	Alat ukur	Skala
1.	Fraksi air daun faloak	Daun faloak yang telah dikeringkan, dihaluskan menjadi simplisia dan diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dan dievaporasi kemudian sehingga diperoleh ekstrak pekat	Timbangan analitik	Nominal
2.	Dosis	Menggunakan faktor konversi dari manusia 70kgBB ke tikus 200gBB dengan dikalikan 0,018	Kalkulator	Nominal
3.	Hepatoprotektor	Hepatoprotektor adalah senyawa yang dapat melindungi sel-sel hati terhadap pengaruh zat toksik yang dapat merusak sel hati.	Parameter total protein	Ratio
4.	Tikus putih jantan (<i>rattus norvegicus</i> .)	Sebagai binatang percobaan antara lain bersifat omnivora (pemakan segala), mempunyai jaringan yang hampir sama dengan manusia	Timbangan digital hewan uji	Ratio

E. Alat dan bahan

1. Alat

Timbangan analitik, blender, ayakan 60 mesh, desikator, gelas kimia, gelas ukur, mikropipet, labu erlenmeyer, rotary evaporator, surgical kit, sonde

oral, disposable syringe, tabung EDTA, centrifuge, tabung vakum, cool box, ice pack, kimia analyser (Erba XL 200), kuvet.

2. Bahan

Sampel yang digunakan yaitu daun faloak dari kota kupang, bahan kimia antara lain akuades, etanol 96%, reagen mayer, dragendorff, magner, serbuk Mg, HCL pekat, Etil asetat, chloroform, *n-heksan*, CMC, parasetamol forte, curcuma force, reagen kontrol, reagen total protein.

F. Prosedur Penelitian

1. Persiapan bahan uji

Daun faloak yang digunakan berlokasi di kelurahan Liliba, Kota Kupang yang sudah dilakukan determinasi dengan nomor 55/HB/01/2023. Sampel yang telah diperoleh selanjutnya dibuat menjadi simplisia meliputi sortasi basah, pencucian, pengubahan bentuk, pengeringan, sortasi kering, kemudian dihaluskan menjadi serbuk kering.

2. Pembuatan ekstrak etanol daun faloak (*Sterculia quadrifida*, R.Br)

Membuat ekstrak etanol daun faloak dari Serbuk daun faloak dilakukan dengan cara maserasi menggunakan cairan penyari berupa etanol 96% dengan perbandingan 1:10 menurut Farmakope Herbal Sebanyak 1 kg dimasukkan dalam bejana tertutup ditambah 10.000 mL atau 10 liter etanol 96% kemudian ditutup selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk. Setelah 5 hari campuran tersebut diremaserasi menggunakan etanol 96% sebanyak 5.000 mL atau 5 liter lalu pindahkan dalam bejana tertutup dan biarkan di tempat yang sejuk terlindung dari cahaya selama 2 hari setelah

itu disaring. Semua maserat yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dan selanjutnya diuapkan dalam penangas air pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak pekat.

Rendemen Ekstrak Rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

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

3. Fraksinasi daun faloak

Fraksinasi merupakan teknik pemisahan ekstrak hasil maserasi yang telah diuapkan sehingga diperoleh ekstrak kental (Tivani et al., 2021) Ekstrak etanol daun faloak kental difraksinasi dengan jalan partisi cair cair menggunakan pelarut *n-heksan* dan air. Jumlah *n-heksan* yang digunakan sebanding dengan jumlah air yang ditambahkan ke dalam ekstrak etanol (1:1). Ekstrak kental daun faloak yang diperoleh dimasukkan ke dalam erlenmeyer, Kemudian dilarutkan dengan air. Setelah larut, dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan pelarut *n-heksan* kemudian dikocok dalam corong pisah sampai homogen dengan pengulangan sebanyak 2 kali. Dibiarkan sampai terbentuk lapisan air dan lapisan *n-heksan* kemudian masing-masing lapisan ditampung dalam wadah yang berbeda. Setelah proses partisi fraksi yang diperoleh dipisahkan menggunakan waterbath pada suhu 50°C hingga diperoleh fraksi kental kemudian ditimbang berat sampel (Luntungan et al., 2021) Rendemen-rendemen fraksi dihitung berdasarkan persamaan sebagai berikut:

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

4. Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia

a. Alkaloid

Ekstrak dicampur dengan 5 mL kloroform dan 5 mL amoniak selanjutnya dipanaskan, dikocok dan disaring. Tambahkan 5 tetes Asam sulfat 2 N pada masing-masing filtrat, kemudian kocok lalu didiamkan. Bagian atas dari masing masing filtrat diambil dan diuji dengan tiga pereaksi yaitu Mayer, Wagner dan Dragendorf. Terbentuknya endapan putih, cokelat dan jingga menunjukkan adanya senyawa alkaloid

b. Flavonoid

Ekstrak dicampur dengan 3 mL etanol 70 % selanjutnya dikocok, dipanas-kan menit 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

c. Tanin

Ekstrak disari dengan 10 mL air kemudian disaring, filtratnya diencer-kan dengan air sampai tidak berwar-na. Larutan diambil sebanyak 2 mL dan ditambahkan 2 tetes FeCl 1 %. Terbentuknya warna cokelat kehij-jauan atau biru kehitaman menunjukkan adanya tannin

d. 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

e. Steroid/terpenoid

Ekstrak dicampur dengan 3 mL kloroform atau 3 mL etanol 70 % 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

5. Penetapan kadar air

Ekstrak sebanyak 1 gram dalam cawan alumunium pada *moisture analyzer* dengan cara disebar disemua bagian sisi cawan alumunium. Selanjutnya suhu alat disetting menjadi 105°C Selama 60 menit. Nilai kadar air yang keluar pada alat saat pengujian telah selesai (Nurhidayati & Warmiti, 2021). Persyaratan kadar air untuk simplisia pada umumnya yaitu tidak lebih dari 10% (Departemen Kesehatan RI, 2017).

6. Pembuatan suspensi kurkumin

Kontrol pembanding yang digunakan adalah curcumin dalam bentuk suspensi curcuma 3,6mg/kgBB.

7. Pembuatan Na. CMC 1%

Pembuatan suspensi CMC Na 1% (b/v) dilakukan dengan cara sebagai berikut: sebanyak 1 gram CMC Na dalam 1000 mL ditaburkan ke dalam mortir yang berisi air suling panas sebanyak 20 mL. Didiamkan selama 15

menit hingga diperoleh massa yang transparan, lalu gerus hingga terbentuk gel dan diencerkan dengan sedikit aquadest, kemudian dituang ke dalam labu tertukur 1000 mL, ditambahi aquadest sampai batas tanda (Ramadhan et al., 2019).

8. Pembuatan induksi paracetamol

Dosis parasetamol yang dapat mengakibatkan hepatotoksik berkisar 10-15 gram (Niki Rahmawati et al., 2018). Konversi dosis dari manusia (70kg) ke tikus (200 g) adalah 0,018 (faktor konversi menurut Laurence & Bacharach) Sehingga dosis induksi parasetamol yaitu :

$$\frac{10.000 \text{ mg} \times 0.018}{200 \text{ gr BB}} = 180 \text{ mg}/200\text{g BB}$$

Dosis yang akan diberikan sebesar 180 mg/200g BB tikus putih/ hari secara peroral

$$\text{Dosis kg/BB tikus adalah : } \frac{1000 \text{ mg} \times 180 \text{ mg}}{200 \text{ gr BB}} = 900 \text{ mg/kgBB}$$

9. Penyiapan hewan uji

Tikus putih (*Rattus norvegicus* L) jantan galur sebanyak 30 ekor dengan berat 185 - 300 gram diadaptasikan selama satu minggu (diberi pakan biasa dan aquadest ad libitum). Hewan coba yang telah diadaptasi satu minggu dikelompokkan secara acak menjadi 6 kelompok (Noer et al., 2016).

10. Pengelompokan hewan uji

Pada pengelompokan hewan uji ini digunakan rumus Federer untuk menghitung berapa hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini. Rumus yang digunakan yaitu $(n - 1) (t - 1) \geq 15$ dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan. Perhitungan jumlah

mencit 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 sehingga hasil perhitungan menggunakan rumus Federer didapatkan hasil $n \geq 4$ sehingga jumlah sampel tiap kelompok adalah 5 hewan uji.

- a) Kelompok I sebagai kontrol normal adalah kelompok tikus yang tidak diberikan perlakuan apapun.
- b) Kelompok II sebagai kontrol negatif adalah kelompok tikus yang diberikan suspensi Na CMC 1%
- c) Kelompok III sebagai kontrol positif adalah kelompok tikus yang diberikan suspensi curcumin 3,6 mg/kgBB.
- d) Kelompok IV adalah kelompok tikus yang diberikan fraksi air daun faloak 50 mg/kgBB.
- e) Kelompok V adalah kelompok tikus yang diberikan fraksi air daun faloak 100mg/kgBB.
- f) Kelompok VI adalah kelompok tikus yang diberikan fraksi air daun faloak 200 mg/kgBB

11. Pengujian efek hepatoprotektor

Tikus sebanyak 30 ekor yang telah di adaptasikan selama 7 hari, ditimbang bobotnya satu persatu. Secara acak di kelompokkan menjadi 6 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Kemudian masing-masing kelompok normal, kontrol positif, kontrol negatif dan kelompok uji secara berturut-turut diberikan sediaan curcumin 3,6 mg/kgBB (Avisa & Utami, 2018), Na CMC 1%, fraksi air daun falok 50 mg/kgBB; 100 mg/kgBB; dan 200 mg/kgBB selama 14 hari secara oral. Pada hari ke-8, semua kelompok di induksi parasetamol 900 mg/kgBB kecuali kelompok kontrol normal yang tidak diberi perlakuan apapun. Dan pada hari ke-15 diambil sampel darah tikus melalui retro-orbital. Kemudian darah ditampung dalam tabung vakum. Sampel disentrifugasi 3.000 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan serum darah tikus. Setelah itu, diperiksa total protein dengan alat ERBA XL 200 menggunakan reagen total protein

G. Analisis data

Pengolahan data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu uji ANOVA (*One way anova*) dilanjutkan uji LSD (*Least Significance Difference*) pada tingkat kepercayaan 95% (-0,05) (Herman et al., 2018)