

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh objek yang menjadi fokus kajian penelitian. Populasi yang digunakan berupa tanaman kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) yang berasal dari perkebunan Heru empon-empon, desa Pojok, kecamatan Mojogedang, kabupaten Karanganyar.

Sampel merupakan bagian dari populasi yang ditetapkan berdasarkan kriteria tertentu. Sampel pada penelitian ini adalah tanaman kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) yang diambil secara acak dari perkebunan Heru empon-empon, desa Pojok, kecamatan Mojogedang, kabupaten Karanganyar.

B. Variabel Penelitian

1. Idenifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol kunyit hitam (*Curcuma caesia*) yang diberikan pada beberapa tingkat dosis. Variabel utama kedua meliputi parameter uji toksisitas subkronik ekstrak etanol kunyit hitam, yang mencakup pemantauan perubahan berat badan, pengukuran kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN) dan kreatinin, analisis histopatologi ginjal pada tikus putih, baik jantan maupun betina. Variabel utama ketiga adalah hewan uji yang digunakan yaitu tikus putih galur *Wistar*.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini meliputi seluruh variabel yang diamati secara langsung dan dikelompokkan ke dalam tiga jenis, yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas merupakan faktor yang ditetapkan untuk dianalisis pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol kunyit hitam yang diberikan pada berbagai tingkat dosis kepada tikus putih jantan dan betina.

Variabel tergantung adalah variabel yang digunakan untuk menilai dampak dari variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini mencakup parameter toksisitas subkronik ekstrak etanol kunyit hitam, yang dievaluasi melalui pengukuran kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN),

kadar kreatinin, serta analisis histopatologi ginjal pada tikus putih jantan dan betina.

Variabel terkendali merupakan faktor-faktor di luar variabel bebas yang berpotensi memengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dikendalikan untuk meminimalkan bias penelitian. Variabel terkendali dalam penelitian ini meliputi berat badan dan usia tikus, kondisi lingkungan pemeliharaan, perlakuan yang diberikan oleh peneliti.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, ekstrak kunyit hitam merupakan ekstrak kental yang diperoleh dari rimpang kunyit hitam melalui proses maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Kedua, dosis toksik adalah jumlah zat uji yang diberikan kepada hewan percobaan yang menyebabkan efek merugikan terhadap fungsi biologis, yang ditunjukkan oleh perubahan bermakna pada parameter toksisitas dibandingkan dengan kelompok kontrol, tanpa menimbulkan kematian selama periode pengamatan.

Ketiga, pemberian subkronik didefinisikan sebagai pemberian sediaan ekstrak etanol kunyit hitam secara peroral satu kali sehari selama 28 hari berturut-turut pada waktu yang sama.

Keempat, dosis yang digunakan dalam uji toksisitas subkronik adalah 250 mg/kgBB, 500 mg/kgBB, dan 1000 mg/kgBB.

Kelima, histopatologi merupakan metode yang digunakan untuk mengevaluasi adanya efek toksik pada organ ginjal setelah pemberian ekstrak etanol kunyit hitam secara peroral selama 28 hari.

Keenam, efek toksisitas subkronik yang diamati meliputi pengukuran kadar kreatinin dan *Blood Urea Nitrogen* (BUN) pada tikus putih jantan dan betina setelah perlakuan selama 28 hari.

Ketujuh, kelompok satelit adalah kelompok tambahan yang digunakan untuk menilai kemungkinan munculnya efek tertunda atau yang bersifat reversibel, dengan periode pengamatan reversibilitas dilakukan selama 14 hari setelah pemberian sediaan uji dihentikan.

C. Alat, Bahan, dan Hewan Percobaan

1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat untuk proses maserasi, antara lain botol cokelat, batang pengaduk, kertas saring, corong kaca, labu ukur, peralatan analisis dan preparasi sampel, yang mencakup *rotary evaporator*, spektrofotometer, spuit, sentrifus,

mikroskop, seperangkat alat bedah yang terdiri atas skalpel, pinset, pisau, gunting, jarum, dan meja lilin, peralatan histologi berupa mikrotom putar (*rotary microtome*), kaca objek (*object glass*), kaca penutup (*deck glass*).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) yang diperoleh dari perkebunan Heru empon-empon, desa Pojok, kecamatan Mojogedang, kabupaten Karanganyar. Pelarut dan bahan kimia yang digunakan antara lain etanol 96%, akuades, larutan CMC-Na 0,5%, EDTA (Brataco), standar kreatinin, standar nitrogen urea, larutan *Bouin*, *xylol*, zat pewarna hematoksilin dan eosin untuk proses pewarnaan preparat jaringan. Larutan formalin sebagai bahan fiksasi organ setelah pembedahan dan parafin sebagai media pembenaman jaringan.

3. Hewan percobaan

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih galur Wistar jantan dan betina dengan rentang usia 6–8 minggu dan berat badan antara 100–300 gram, yang diperoleh dari Laboratorium Universitas Setia Budi, Surakarta.

D. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan *ethical clearance*

Pengujian kelayakan etis atau persetujuan etik merupakan tahap awal yang wajib dilakukan sebelum pelaksanaan penelitian. Proses pengajuan izin etik bertujuan untuk memastikan bahwa perlakuan terhadap hewan uji dalam penelitian ini dilaksanakan secara etis, adil, dan tetap menghormati hak-hak hewan sebagai makhluk hidup. Permohonan persetujuan etik diajukan melalui RSUD Dr. Moewardi Surakarta.

2. Determinasi tanaman

Proses determinasi tanaman bertujuan untuk memastikan bahwa penelitian sesuai dengan ciri-ciri morfologi yang tercantum literatur ilmiah. Kegiatan identifikasi ini dilakukan di laboratorium Universitas Setia Budi.

3. Pembuatan serbuk rimpang kunyit hitam

Sebanyak 7 kg rimpang kunyit hitam dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada bahan tanaman. Selanjutnya, bahan dikeringkan di bawah sinar matahari selama ± 7 hari

hingga kadar airnya berkurang menjadi kurang dari 10%. Rimpang kunyit hitam yang telah kering kemudian digiling menggunakan mesin penggiling dan diayak dengan ayakan nomor 60 untuk memperoleh ukuran partikel serbuk yang seragam. Proses ini bertujuan untuk meningkatkan luas permukaan serbuk dan memaksimalkan efisiensi ekstraksi (Temarwut *et al.*, 2020).

4. Penetapan susut pengeringan serbuk rimpang kunyit hitam

Penetapan susut pengeringan serbuk rimpang kunyit hitam dilakukan menggunakan alat *moisture balance*. Sebanyak 1 sampai 2 gram serbuk ditimbang dan ditempatkan pada posisi yang telah ditentukan dalam alat. Suhu pengeringan diatur pada 105°C, dan proses dilanjutkan hingga tercapai kestabilan berat sampel. Persentase susut pengeringan dihitung dengan membandingkan penurunan berat terhadap berat awal sampel. Pengujian dilakukan dengan tiga kali replikasi. Nilai susut pengeringan dianggap memenuhi syarat jika persentase penurunan berat tidak melebihi 10% (FHI, 2017).

5. Pembuatan ekstrak etanol kunyit hitam

Pembuatan ekstrak etanol kunyit hitam dilakukan melalui metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10. Serbuk kunyit hitam dimasukkan ke dalam botol maserasi, kemudian ditambahkan pelarut sesuai perbandingan tersebut. Proses perendaman dilakukan selama 6 jam pertama dengan pengadukan sesekali, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Campuran hasil maserasi disaring dan filtrat yang diperoleh dikumpulkan. Seluruh filtrat yang terkumpul kemudian diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada tekanan rendah dengan suhu 50°C. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya dipekatkan kembali menggunakan penangas air pada suhu 50°C hingga terbentuk ekstrak kental (FHI, 2017).

6. Penetapan kadar air ekstrak dengan metode *Azeotropi* (destilasi toluene)

Tabung dan sistem pendingin dibersihkan terlebih dahulu menggunakan larutan asam, kemudian dibilas dengan air dan dikeringkan. Sampel cair sebanyak 1–4 mL ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu kering. Sampel berbentuk pasta digunakan lembaran logam, sedangkan pada sampel yang mudah bergolak ditambahkan batu didih. Sebanyak 200 mL toluena dimasukkan ke dalam labu, kemudian alat dirangkai dan dihubungkan dengan tabung penerima yang telah diisi toluena jenuh air. Labu dipanaskan secara perlahan selama ± 15 menit.

Proses distilasi dikendalikan dengan laju 2 tetes per detik saat toluena mulai mendidih hingga sebagian besar air terpisah, kemudian laju tetesan ditingkatkan menjadi 4 tetes per detik hingga seluruh air tersuling. Pendingin kemudian dibilas dengan toluena jenuh air, dan distilasi dilanjutkan selama 5 menit. Apabila masih terdapat tetesan air yang menempel pada dinding tabung, tetesan tersebut dilepaskan dengan menggosok menggunakan karet basah yang dipasang pada kawat tembaga. Volume air dicatat setelah pemisahan selesai dan kadar air dihitung serta dinyatakan dalam persen volume per bobot (% v/b) (FHI, 2017).

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak etanol kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.)

7.1 Identifikasi alkaloid. Identifikasi senyawa alkaloid dilakukan menggunakan pereaksi *Mayer*, *Dragendorff*, dan *Wagner*. Sebanyak 2 mL sampel diambil dan ditambahkan dengan 8 mL akuades hangat, kemudian campuran disaring. Filtrat yang diperoleh dibagi ke dalam tiga tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan enam tetes pereaksi *Mayer*, hasil positif alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih. Tabung kedua ditambahkan enam tetes pereaksi *Dragendorff*, di mana keberadaan alkaloid ditunjukkan oleh terbentuknya endapan berwarna jingga. Tabung ketiga ditambahkan enam tetes pereaksi *Wagner*, dan hasil positif alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna cokelat (Yanti dan Vera, 2019).

7.2 Identifikasi flavonoid. Sebanyak 2 mL sampel dicampurkan dengan 8 mL akuades hangat, kemudian campuran disaring dan filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Filtrat tersebut ditambahkan beberapa tetes asam klorida (HCl) pekat dan sedikit serbuk magnesium (Mg). Hasil positif keberadaan senyawa flavonoid ditandai dengan perubahan warna menjadi merah tua, merah muda, atau merah bata (Sulasmi *et al.*, 2018).

7.3 Identifikasi saponin. Sebanyak 2 mL sampel dicampurkan dengan 8 mL akuades hangat, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 mL air panas dan satu tetes asam klorida (HCl) pekat, lalu dikocok kuat. Hasil positif saponin ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil dan tidak mudah hilang (Fitriyanti *et al.*, 2019).

7.4 Identifikasi polifenol. Sebanyak 2 mL sampel dicampurkan dengan 8 mL akuades hangat dan disaring. Filtrat dimasukkan ke dalam

tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 1%. Hasil positif polifenol ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi coklat kehitaman, biru kehitaman, atau hijau kehitaman (Sulasmi *et al.*, 2018).

7.5 Identifikasi triterpenoid. Sebanyak 2 mL sampel dicampurkan dengan 5 mL kloroform dan 10 tetes asam asetat anhidrat, kemudian dibiarkan selama 15 menit. Selanjutnya, 6 tetes larutan dipindahkan ke tabung reaksi dan ditambahkan 2–3 tetes asam sulfat pekat. Hasil positif triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna hijau gelap (Islami *et al.*, 2022).

7.6 Identifikasi tanin

7.6.1 Tanin katekol. Sebanyak 2 mL sampel dicampurkan dengan 8 mL akuades hangat dan disaring. Filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan campuran formaldehid 3% dan HCl pekat dengan perbandingan volume 4:2. Campuran dipanaskan hingga mencapai suhu 90°C . Hasil positif tanin katekol ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna merah (Sulasmi *et al.*, 2018).

7.6.2 Tanin galat. Sebanyak 2 mL sampel dicampurkan dengan 8 mL akuades hangat, kemudian dilakukan penyaringan. Filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan sedikit natrium asetat dan tiga tetes larutan FeCl_3 . Hasil positif keberadaan senyawa tanin galat ditandai dengan perubahan warna menjadi cokelat kehitaman, biru kehitaman, atau hijau kehitaman (Sulasmi *et al.*, 2018).

8. Uji KLT.

Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 GF₂₅₄ pada pelat KLT berukuran 7 cm × 3 cm. Aktivasi pelat dilakukan dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100°C selama 10 menit. Sebanyak 0,1 g ekstrak dilarutkan dalam 10 mL etanol, kemudian larutan tersebut ditotolkan pada fase diam. Identifikasi senyawa kurkuminoid dilakukan menggunakan fase gerak kloroform:methanol dengan perbandingan 95:0,5, dan keberadaan kurkuminoid ditandai dengan munculnya bercak berwarna kuning yang teramati di bawah sinar ultraviolet pada panjang gelombang 366 nm (Elizarni dan Yanti, 2019).

9. Pembuatan larutan uji

9.1 Pembuatan suspensi Na CMC 0,5%. Pembuatan suspensi Na-CMC dilakukan dengan menaburkan 0,5 g CMC ke dalam mortir yang berisi 30 mL akuades panas, kemudian didiamkan selama ± 15

menit hingga terbentuk massa bening. Campuran selanjutnya digerus hingga homogen, kemudian diencerkan dengan akuades dan dipindahkan ke gelas ukur hingga volume akhir mencapai 100 mL.

9.2 Larutan ekstrak 1,25 g/100 mL. Larutan ekstrak disiapkan dengan melarutkan sebanyak 1,25 g ekstrak kunyit hitam ke dalam 100 mL suspensi CMC 0,5% untuk memperoleh sediaan dengan variasi dosis 250 mg/kgBB.

9.3 Larutan ekstrak 2,5 g/100 mL. Larutan ekstrak disiapkan dengan melarutkan sebanyak 2,5 g ekstrak kunyit hitam ke dalam 100 mL suspensi CMC 0,5% untuk memperoleh sediaan dengan variasi dosis 500 mg/kgBB.

9.4 Larutan ekstrak 5 g/100 mL. Larutan ekstrak disiapkan dengan melarutkan sebanyak 5 g ekstrak kunyit hitam ke dalam 100 mL suspensi CMC 0,5% untuk memperoleh sediaan dengan variasi dosis 1000 mg/kgBB.

10. Persiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan dan betina yang sehat, dengan rentang berat badan 100–300 g dan usia 6–8 minggu. Sebanyak 50 ekor tikus digunakan sebagai hewan uji dan dibagi ke dalam beberapa kelompok perlakuan, masing-masing terdiri atas 10 ekor (5 jantan dan 5 betina). Seluruh hewan ditimbang, diberi tanda pengenalan, dan diadaptasikan terhadap kondisi laboratorium selama satu minggu. Tikus dipuasakan selama 8–24 jam, dengan tetap diberikan air minum sesuai kebutuhan. Pemberian bahan uji dilakukan setelah semua hewan uji berada dalam kondisi siap dan memenuhi kriteria penelitian. (BPOM, 2022).

11. Pengamatan

Pengamatan gejala toksik meliputi perubahan berat badan, kadar kreatinin, kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN), serta pemeriksaan histopatologi ginjal tikus. Pengamatan dilakukan selama 28 hari, sedangkan pada kelompok satelit pengamatan dilanjutkan selama 14 hari tambahan untuk menilai kemungkinan reversibilitas efek toksik. Perubahan berat badan hewan uji dipantau dan dicatat setiap minggu.

12. Penentuan sediaan dosis uji

Pengujian toksisitas subkronik dilakukan selama 28 hari dengan pemberian dosis yang telah ditentukan. Pengamatan kelompok satelit dilanjutkan hingga hari ke-42 untuk menilai kemungkinan munculnya

efek toksik tertunda yang bersifat reversibel. Volume maksimum sediaan uji yang diberikan secara oral kepada tikus dibatasi hingga 5 mL.

Pembagian pemberian sediaan uji pada masing-masing kelompok hewan uji sebagai berikut:

Kelompok I : kontrol negatif, diberikan CMC-Na 0,5%

Kelompok II : perlakuan dosis rendah, 250 mg/kgBB

Kelompok III : perlakuan dosis sedang, 500 mg/kgBB

Kelompok IV : perlakuan dosis tinggi, 1000 mg/kgBB

Kelompok V : kelompok satelit dosis tinggi, 1000 mg/kgBB

13. Pengambilan sampel darah

Pengambilan sampel darah dilakukan sepanjang penelitian untuk pengukuran parameter biokimia klinis pada hewan uji, yaitu kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN) dan kreatinin. Sampel darah diambil pada awal penelitian (T_0), akhir perlakuan (T_{28}), serta pada hari ke-42 (T_{42}) khusus untuk kelompok satelit. Pengambilan darah dilakukan melalui sinus orbitalis menggunakan pipa mikrohematokrit dengan volume sekitar 2 mL, dengan batas maksimum pengambilan sebesar 5 mL. Sampel dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi yang berisi 10 μ L antikoagulan EDTA, kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 3.000 rpm. Serum yang diperoleh dipisahkan dan disimpan pada suhu -20°C hingga dilakukan pemeriksaan kadar BUN dan kreatinin.

14. Pemeriksaan kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN)

Pengukuran kadar BUN dilakukan dengan menggunakan 0,03 mL serum per pemeriksaan pada T_0 , T_{28} , dan T_{42} (kelompok satelit). Tiga tabung reaksi disiapkan yaitu tabung blanko berisi 1.000 μ L akuades, tabung standar berisi 10 μ L larutan standar dan 1.000 μ L monoreagen (perbandingan 4:1, reagen 1 mengandung buffer, NADH, dan 2-oksooglutarat, reagen 2 mengandung urease dan glutamat dehidrogenase/GLDH), tabung sampel berisi 10 μ L serum dan 1.000 μ L monoreagen. Semua campuran dihomogenkan menggunakan *vortex* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 menit, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 340 nm menggunakan spektrofotometer.

15. Pemeriksaan kadar kreatinin

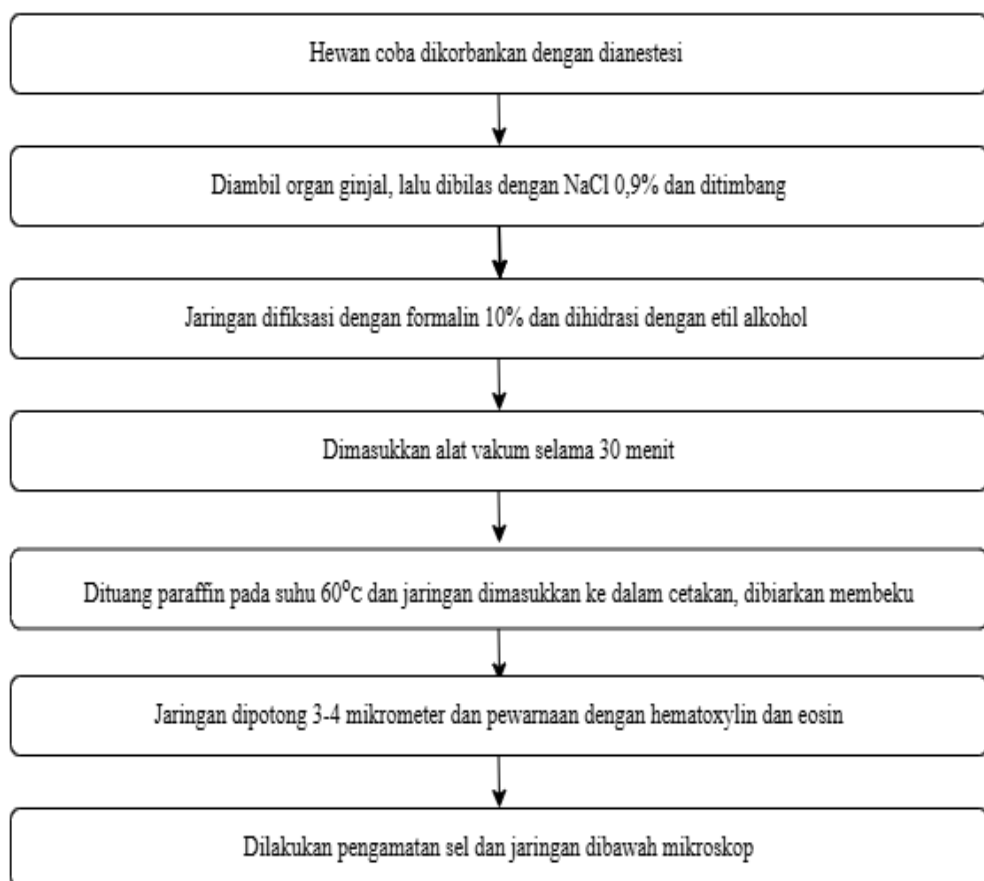
Pengukuran kadar kreatinin dilakukan dengan 0,15 mL serum per pemeriksaan pada T_0 , T_{28} , dan T_{42} (kelompok satelit). Tiga tabung reaksi disiapkan yaitu tabung blanko berisi 1.000 μ L akuades, tabung standar berisi 50 μ L larutan standar dan 1.000 μ L monoreagen (perbandingan

4:1, reagen 1 mengandung buffer, NADH, dan 2-oksoglutarat, reagen 2 mengandung urease dan GLDH), tabung sampel berisi 50 μ L serum dan 1.000 μ L monoreagen. Semua larutan dihomogenkan menggunakan vortex dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 0–10 menit. Hasil reaksi diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 492 nm.

16. Pemeriksaan hispatologi

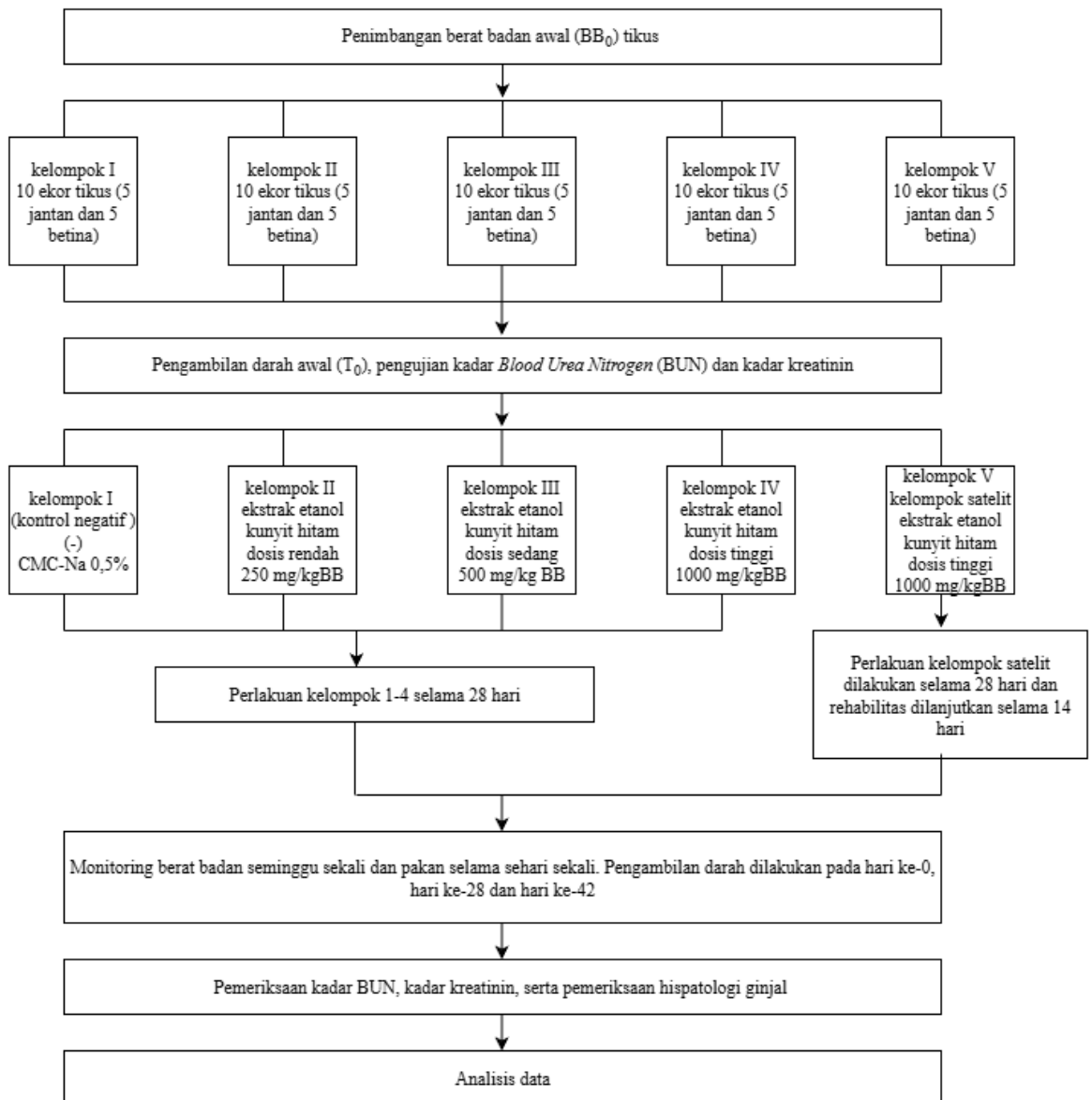
Hari ke-42 satu hewan uji dari masing-masing kelompok jantan dan betina dikorbankan untuk pengambilan organ ginjal. Jaringan ginjal difiksasi menggunakan larutan bouin untuk mempertahankan integritas preparat dan mencegah kerusakan seperti pergeseran posisi atau pembusukan. Jaringan difiksasi kemudian diproses melalui serangkaian larutan etanol bertingkat dari 70% hingga 100% untuk dehidrasi, selanjutnya direndam dalam *xylol* untuk dealkoholisasi. Proses infiltrasi dilakukan dengan parafin panas selama 12–16 jam hingga jaringan mengeras, kemudian jaringan dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 3–5 μ m.

Tahap selanjutnya yaitu proses pewarnaan, iris jaringan ditempelkan pada kaca objek dan diberi pewarna *hematoxylin-eosin*. *Hematoxylin* memberikan warna biru pada inti sel (*nucleus*), sedangkan *eosin* memberikan warna merah muda pada sitoplasma, kemudian ditambahkan satu tetes cairan perekat, preparat ditutup dan diamati menggunakan mikroskop.



Gambar 7. Pemeriksaan hispatologi.

E. Alur Penelitian



Gambar 8. Alur penelitian uji toksisitas subkronik.

F. Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini meliputi penimbangan berat badan serta pengukuran kadar kreatinin dan *Blood Urea Nitrogen* (BUN) pada hewan uji. Distribusi data dianalisis terlebih dahulu menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui data terdistribusi normal atau tidak. Data dikategorikan sebagai terdistribusi normal apabila nilai $p > 0,05$ dan dianggap tidak normal jika $p < 0,05$.

Data yang terdistribusi normal kemudian diuji homogenitasnya menggunakan *Levene Statistic*. Data yang memenuhi kriteria homogenitas selanjutnya dianalisis menggunakan uji *One-Way ANOVA*. Hasil uji *One-Way ANOVA* dengan $p < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan, sedangkan $p > 0,05$ menunjukkan tidak adanya perbedaan signifikan. Data yang terdapat perbedaan signifikan dilanjutkan uji lanjutan dengan uji *post hoc Tukey*. Data terdistribusi normal tidak homogen, maka diuji dengan uji *Welch ANOVA*, kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc Games-Howell*. Jika hasil uji normalitas, data tidak terdistribusi normal maka analisis menggunakan uji non parametrik *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Jika uji *Kruskal-Wallis* terdapat perbedaan yang bermakna, maka analisis dilanjutkan dengan uji *post-hoc Mann-Whitney U* untuk mengetahui perbedaan antar pasangan kelompok.