

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah keseluruhan dari subjek penelitian. Populasi dalam penelitian ini yaitu daun kepel (*Stelechocarpus buraho* (Bl.) Hook f. & Th.) yang berlokasi di daerah Kecamatan Matesih, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel adalah bagian yang mewakili suatu populasi dalam penelitian. Sampel yang digunakan pada penelitian ini berupa daun kepel (*Stelechocarpus buraho* (Bl.) Hook f. & Th.) yang dipilih dalam kondisi segar, bebas dari serangan hama, kemudian dibersihkan menggunakan air mengalir dan selanjutnya dikeringkan. Tanaman kepel tersebut diperoleh dari wilayah Kecamatan Matesih, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini adalah ekstrak daun kepel (*Stelechocarpus buraho* (Bl.) Hook f. & Th.) yang diperoleh dengan metode maserasi dan dilakukan variasi dosis yaitu 100 mg/KgBB; 200 mg/KgBB; dan 300 mg/KgBB.

Variabel utama kedua pada penelitian ini yaitu uji efektivitas hepatoprotektor ekstrak daun kepel (*Stelechocarpus buraho* (Bl.) Hook f. & Th.).

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama terbagi menjadi tiga yaitu variabel bebas, variabel tergantung, variabel terkendali.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun kepel (*Stelechocarpus buraho* (Bl.) Hook f. & Th.) dengan variasi beberapa dosis.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah efektivitas hepatoprotektor daun kepel (*Stelechocarpus buraho* (Bl.) Hook f. & Th.).

Variabel terkendali pada penelitian ini yaitu terdiri dari hewan uji. Kondisi kandang hewan uji, pemeliharaan hewan uji, metode uji yang digunakan, dan proses pengamatan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun Kepel (*Stelechocarpus buraho* (Bl.) Hook f. & Th.) adalah bagian dari tumbuhan kepel yang akan digunakan dipilih dari daun yang masih segar yang diperoleh dari tanaman kepel yang tumbuh di Kecamatan Matesih Kabupaten Karanganyar, provinsi Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun kepel adalah proses pada daun yang masih segar dilakukan dengan sortasi basah, dicuci, dan dipilih sesuai kriteria daun yang sehat. Daun kemudian ditiriskan setelah dibersihkan, dikeringkan dengan sinar matahari, dihaluskan menggunakan blender, dan diayak dengan ayakan ukuran 40 *mesh*.

Ketiga, ekstrak daun kepel adalah serbuk daun kepel yang diekstraksi dengan memakai metode dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70%, Hingga didapatkan filtrat kemudian diuapkan memakai *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental.

Keempat, hepatoprotektor adalah kemampuan suatu bahan uji dalam mencegah terjadinya kerusakan hati yang diinduksi oleh zat hepatotoksik.

Kelima, mencegah kenaikan kadar enzim AST dan ALT adalah menahan peningkatan kadar enzim AST dan ALT ada darah tikus jantan setelah induksi parasetamol dibandingkan dengan kontrol negatif.

Keenam, gambaran histopatologi adalah melihat gambaran kerusakan pada jaringan hati yang dilihat dengan perbesaran 100x yang dibandingkan kontrol negatif.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik, batang pengaduk, pisau, oven, kain flannel, kertas saring, kapas, ayakan, blender, beaker glass, bejana maserasi, *rotary evaporator*, oven, cawan kurs, tabung reaksi, sentrifugasi, mikro pipet, IChem-353, mitokrom, kandang tikus, tempat makan, tempat minum, sonde, mortir, stamfer, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet, sentrifuge, object glass, deck glass, handscoon.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun kepel, hewan uji tikus putih, etanol 70%, aquadest, pakan tikus, pereaksi ALT-AST, parasetamol (penginduksi hepatotoksik), larutan Na CMC 0,5% (kontrol negatif), N-asetilsistein (kontrol positif), pereaksi Mayer,

Pereaksi *Dragendorff*, pereaksi *bouchardat*, serbuk magnesium, FeCl_3 , Amil alkohol, HCl pekat, bouin, paraffin, xylol, hematoxylin, eosin.

D. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan *Ethical Clearance*

Proses pembuatan *ethical clearance* (EC) dilakukan di RSUD Dr. Moewardi, Surakarta. Langkah awal yang harus ditempuh adalah mengisi formulir pendaftaran secara *online*. Pemohon kemudian mendatangi kantor forensik dan medikolegal RSUD Dr. Moewardi dengan membawa bukti pendaftaran, formulir *online* yang telah diisi, serta proposal penelitian yang telah mendapat tanda tangan dari pembimbing. Tahap berikutnya adalah melakukan pembayaran administrasi, dan proses pengurusan EC akan berlangsung dengan waktu maksimal 14 hari. Dokumen EC dapat diambil secara langsung oleh pemohon dengan membawa bukti pengajuan yang telah divalidasi oleh petugas.

2. Determinasi tanaman kepel

Tahap awal penelitian perlu memastikan identitas tanaman yang dikenal sebagai determinasi tanaman. Determinasi merupakan proses untuk memastikan keaslian sampel daun kepel sehingga dapat mencegah kekeliruan saat pengumpulan sampel. Proses ini direncanakan akan dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

3. Pengumpulan bahan

Sampel daun kepel berasal dari tanaman kepel di Matesih, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Daun kepel yang digunakan sebagai sampel harus masih segar dan tidak rusak oleh hama.

4. Pembuatan simplisia

Sampel daun kepel yang digunakan untuk penelitian dipilih dengan metode sortasi basah. Hal ini dilakukan untuk membedakan atau menghilangkan kontaminan pada simplisia, yang dicuci dengan air mengalir. Daun kepel yang telah dibersihkan kemudian dikeringkan dengan sinar matahari, dan proses pengeringan dilanjutkan menggunakan oven bersuhu 40°C .

5. Pembuatan serbuk simplisia

Sampel daun kepel yang telah kering diblender untuk mendapatkan serbuk yang halus kemudian diayak menggunakan ayakan

nomor 40. Hasil serbuk kering daun kepel disimpan dalam wadah yang telah disiapkan.

6. Penetapan susut pengeringan

Susut pengeringan dalam penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menetapkan batas maksimum jumlah senyawa yang hilang selama proses pengeringan. Proses ini dilaksanakan dengan menggunakan ekstrak seberat satu hingga dua gram yang dimasukkan ke dalam cawan kurs porselin yang tertutup dan sudah ditara, kemudian dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit. Serbuk dalam cawan kurs porselin diratakan dengan cara menggoyangkan hingga merata. Selanjutnya, serbuk simplisia dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105°C selama 1 jam dengan tutupnya dibuka. Tahapan tiap pengeringan diawali dengan pendinginan botol timbang dalam keadaan tertutup dan ditempatkan dalam eksikator hingga mendapatkan suhu ruang. Proses pengeringan berlanjut dan dilakukan penimbangan kembali setiap satu jam hingga diperoleh bobot yang konstan yaitu penimbangan berturut-turut tidak > 0,5 mg atau 0,0005 gram, dengan persyaratan susut pengeringan tidak > 10% (kemenkes, 2017).

7. Pembuatan ekstrak

Sebanyak 500 gram serbuk daun kepel ditimbang dan ditambahkan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10, yaitu diukur 5000 ml pelarut etanol 70% dan dilakukan penambahan pada serbuk daun kepel, kemudian disimpan dalam bejana yang terlindung dari cahaya matahari. Maserasi dilakukan selama 24 jam, dengan 6 jam perendaman pertama disertai penggojokan sesekali lalu didiamkan selama 18 jam. Sesudah maserasi 24 jam, filtrat dan residu disaring. Hasil dari penyaringan selanjutnya diproses melalui remaserasi menggunakan setengah bagian pelarut atau setara dengan 2500 ml pelarut etanol 70% yang baru. Filtrat ekstrak I dan filtrat hasil remaserasi digabungkan, lalu diuapkan memakai *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental daun kepel.

8. Penetapan kadar air ekstrak

Penentuan kadar air ekstrak dilakukan dengan metode destilasi menggunakan toluen sebagai pelarut. Toluene terlebih dahulu dijenuhkan dengan akuades melalui proses pengocokan berulang, kemudian didiamkan hingga terbentuk dua lapisan yang terpisah. Lapisan air berada pada bagian bawah, sedangkan lapisan toluen berada di bagian atas, selanjutnya lapisan air dibuang. Sebanyak 10 gram ekstrak daun

kepel ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu alas bulat, kemudian ditambahkan 200 mL toluen jenuh. Campuran tersebut dipanaskan hingga volume air yang terdestilasi tidak mengalami penambahan lagi. Pembacaan volume air dilakukan setelah pemisahan antara toluen dan air berlangsung sempurna. Kadar air dinyatakan dalam persen volume per bobot (% v/b), dengan persyaratan bahwa kadar air ekstrak daun kepel tidak melebihi 17,8% (kemenkes, 2017).

9. Identifikasi senyawa

Lakukan indentifikasi kandungan kimia dengan tujuan untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam ekstrak yang dihasilkan dari ekstraksi memakai pelarut etanol 70 %. Identifikasi kandungannya meliputi senyawa flavonoid, saponin, tanin, dan alkaloid.

9.1 Uji flavonoid. Penelitian ini, sebanyak 1 gram ekstrak ditimbang kemudian ditambahkan aquadest kemudian dididihkan, selanjutnya disaring dan filtratnya digunakan untuk pengujian. Tahap berikutnya dilakukan dengan mengambil sebanyak 5 mL filtrat A ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium sebanyak 0,1 gram, 1 mL asam klorida pekat, serta 2 mL amil alkohol. Campuran tersebut dikocok hingga homogen, kemudian didiamkan sampai terbentuk pemisahan lapisan dan selanjutnya diamati. Hasil uji dinyatakan positif mengandung flavonoid apabila terbentuk warna kuning hingga jingga pada lapisan amil alkohol (Lumbessy *et al.*, 2013).

9.2 Uji saponin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml aquades panas. Setelah campuran didinginkan, larutan dikocok selama satu menit. Keberadaan saponin ditandai dengan terbentuknya busa yang bertahan minimal selama satu menit. Selanjutnya ditambahkan larutan asam klorida 1 N, apabila busa yang terbentuk tetap stabil, maka ekstrak dinyatakan positif mengandung saponin (Kartikasari *et al.*, 2022).

9.3 Uji tannin. Penelitian ini, sebanyak 1 gram ekstrak dimasukan ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 10 ml aquadest panas sambil di aduk lalu didinginkan, setelah itu disaring. Sebanyak 2 ml filtrat ditambahkan 1-2 tetes besi (III) klorida atau FeCl_3 positif tannin ditandai dengan pembentukan warna biru-hitam, hijau-hitam, atau hijau-hitam (Syafitri *et al.*, 2014).

9.4 Uji alkaloid. Sebanyak 0,5 gram sampel ditimbang, kemudian ditambahkan 1 ml larutan asam klorida 2 N dan diencerkan dengan air suling hingga volume 9 ml. Campuran tersebut disaring, lalu

filtrat yang diperoleh dipanaskan menggunakan tangas air selama kurang lebih dua menit. Filtrat selanjutnya dibagi ke dalam tiga tabung reaksi, masing-masing sebanyak tiga tetes. Pada tabung pertama, filtrat ditambahkan dua tetes pereaksi *Dragendorff*; hasil uji dinyatakan positif alkaloid apabila terbentuk endapan berwarna jingga hingga merah bata. Tabung kedua diberi dua tetes pereaksi Mayer, dengan indikasi positif berupa endapan berwarna kuning atau putih. Pada tabung ketiga, filtrat direaksikan dengan dua tetes pereaksi Bouchardat, dan terbentuknya endapan berwarna coklat kehitaman menunjukkan hasil positif.

9.5 Uji triterpenoid dan steroid. Sebanyak 10 gram ekstrak direaksikan dengan penambahan 10 tetes asam asetat glasial ($\text{CH}_3 \text{COOH}$) dan dua tetes asam sulfat pekat ($\text{H}_2 \text{SO}_4$). Terbentuknya cincin berwarna coklat kemerahan pada batas kedua lapisan menunjukkan hasil positif adanya senyawa terpenoid. Sementara itu, munculnya cincin berwarna biru atau hijau menandakan keberadaan golongan senyawa steroid (Fajriaty *et al.*, 2018).

10. Persiapan hewan uji

Penelitian ini menggunakan tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dengan rentang bobot 180–250 gram dan umur 2–3 bulan sebanyak 25 ekor sebagai hewan uji dalam pengujian aktivitas hepatoprotektor. Hewan uji dikelompokkan ke dalam lima kelompok perlakuan, masing-masing terdiri atas lima ekor tikus. Sebelum pemberian perlakuan, seluruh tikus terlebih dahulu ditimbang berat badannya dan diaklimatisasi terhadap kondisi laboratorium selama satu minggu. Selama periode adaptasi tersebut, hewan uji memperoleh pakan dan air minum secara teratur.

11. Pembuatan sediaan uji

11.1 Pembuatan suspensi Na-CMC 0,5%. Na-CMC ditimbang 0,5 g dan dimasukkan pada air panas 10 ml sampai mengembang selanjutnya digerus sampai homogen, saat larutan homogen tambahkan aquades secara bertahap sampai 100 ml.

11.2 Pembuatan suspensi parasetamol 7,2%. Pembuatan larutan parasetamol 72% yaitu ditimbang 7.200 mg parasetamol kemudian dicampurkan ke dalam 100 ml suspensi Na CMC hingga larut.

11.3 Pembuatan suspensi Hepa-Q® 0,227%. Pembuatan suspensi Hepa-Q® dosis untuk manusia yaitu 126mg/70kg dikonversikan ke tikus yaitu 2,27 mg/200gram bb tikus. Cangkang

kapsul dibuka dan ditimbang 227 mg kemudian dicampurkan ke dalam 100 ml suspensi Na CMC hingga larut.

11.4 Pembuatan suspensi ekstrak. Ekstrak yang telah didapat ditimbang sesuai dosis lalu ditambahkan Na-CMC 0,5% secara bertahap dengan diaduk sampai larut.

12. Perhitungan dosis

Dosis Hepa-Q® yang digunakan pada manusia adalah tiap kapsul mengandung 126 mg untuk dosis manusia. Faktor konversi manusia berat badan 70 kg pada tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018. Dosis Hepa-Q untuk tikus 200 gram yaitu $126 \text{ mg} \times 0,018 = 2,27 \text{ mg}/200 \text{ gram}$ bb tikus.

Dosis untuk parasetamol yang digunakan yaitu 4 gram untuk manusia. Setelah dikonversikan ke tikus maka dosis yang dipakai yaitu $4 \text{ gram} \times 0,018 = 0,072 \text{ gram}$ atau 72 mg.

13. Pemeriksaan AST-ALT

Pertama, mencit putih jantan diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari. Selama proses aklimatisasi hewan uji diberi makan serta minum seperti biasa. Hewan uji dianggap sehat jika tidak menunjukkan deviasi berat badan (>10%) selama masa aklimatisasi serta tidak menunjukkan terdapat gejala tidak normal secara visual.

Kedua, tiap kelompok diberi perlakuan yang berbeda secara oral dalam bentuk larutan, yaitu:

- a. Kelompok 1 : Kontrol positif Hepa-Q® 2,27 mg/200 gram bb , dan parasetamol dosis 72 mg/200gram bb
- b. Kelompok 2 : Kontrol negatif CMC Na dan parasetamol dosis 72 mg/200gram bb
- c. Kelompok 3 : Dosis 100 mg/KgBB tikus dan parasetamol dosis 72 mg/200gram bb
- d. Kelompok 4 : Dosis 200 mg/KgBB tikus dan parasetamol dosis 72 mg/200gram bb
- e. Kelompok 5 : Dosis 300 mg/KgBB tikus dan parasetamol dosis 72 mg/200gram bb

Ketiga, pada hari pertama, sebelum pelakuan, sampel darah diambil dan perhitungan kadar AST dan ALT untuk masing-masing kelompok sebagai (T0). Ekstrak daun kepel diberikan selama 7 hari cek kadar AST dan ALT (T1). Pada hari ke-8 diberikan induksi parasetamol 72 mg/200mg BB. Pada hari ke-9 sampel darah setiap kelompok dikumpulkan dan diperiksa kembali kadar AST dan ALT sebagai (T2).

Selanjutnya masing masing kelompok diambil 1 hewan uji hewan dikorbankan dan dibedah kemudian diambil hatinya.

13.1 Penetapan enzim AST. Darah tikus ditampung di dalam tabung vaculab tunggu sekitar ± 1 jam agar darah membeku dan disentrifugasi hingga sel-sel darah mengendap serta terpisah dari plasmanya. Selanjutnya, kadar AST ditetapkan dengan cara mengambil 100 μ l darah hasil sentrifugasi yang ditambahkan 1000 μ l reagen AST. Pembacaan dilakukan menggunakan alat IChem-353 pada suhu 30°C dengan panjang gelombang 340 nm. Prinsip pengujian ini bertujuan untuk mengetahui adanya kerusakan hati melalui peningkatan kadar AST.

13.2 Penetapan enzim ALT. Darah tikus ditampung di dalam tabung vaculab tunggu sekitar ± 1 jam agar darah membeku dan disentrifugasi hingga sel-sel darah mengendap serta terpisah dari plasmanya. Selanjutnya, kadar ALT ditetapkan dengan cara mengambil 100 μ l darah hasil sentrifugasi yang ditambahkan 1000 μ l reagen ALT. Pembacaan dilakukan menggunakan alat IChem-353 pada suhu 30°C dengan panjang gelombang 340 nm. Prinsip pengujian ini bertujuan untuk mengetahui adanya kerusakan hati melalui peningkatan kadar ALT.

14. Pembuatan preparat histopatologi

Jaringan hati yang telah diambil difiksasi menggunakan larutan *Bouin* dengan tujuan mempertahankan struktur jaringan agar tidak mengalami pergeseran, pembusukan, maupun kerusakan. Jaringan hasil fiksasi kemudian melalui proses dehidrasi dengan perendaman dalam larutan etanol bertingkat mulai dari konsentrasi 70% hingga 100% untuk menghilangkan kandungan air. Tahap berikutnya dilakukan dealkoholisasi dengan memindahkan jaringan ke dalam *xylol* guna menggantikan etanol. Selanjutnya, jaringan diinfiltrasi menggunakan parafin cair pada suhu panas selama kurang lebih 10–12 jam. Setelah parafin mengeras, jaringan dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan irisan sekitar 3–5 mikrometer.

Tahapan berikutnya adalah proses pewarnaan, di mana irisan jaringan diletakkan pada kaca objek untuk dilakukan pengecatan. Metode pewarnaan yang digunakan adalah *hematoxylin* dan *eosin*, kemudian preparat dikeringkan. *Hematoxylin* memberikan warna biru pada inti sel, sedangkan *eosin* mewarnai sitoplasma dengan warna merah muda. Pada tahap akhir, preparat ditutup menggunakan kanada balsam.

Parameter pengamatan secara makroskopis menunjukkan adanya kongesti dan pelebaran sinusoid pada jaringan interstisial, serta ditemukannya degenerasi hidropik, degenerasi lemak, dan nekrosis pada organ hati. Pembuatan preparat histologi sel hati dilakukan oleh Laboratorium kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

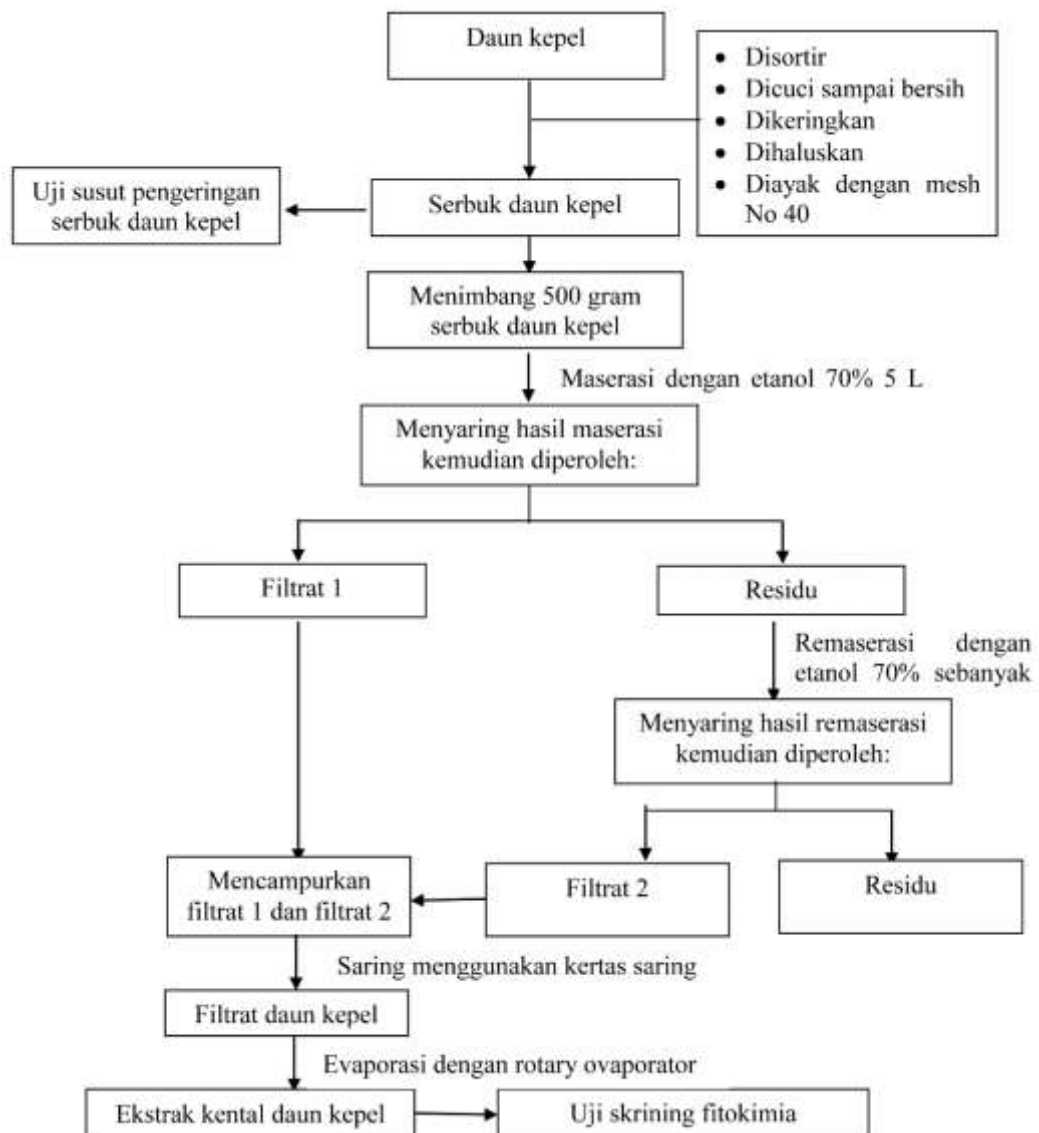
Pembuatan sediaan histologi dari sampel diikuti dengan pembuatan satu preparat jaringan hati untuk setiap tikus. Masing-masing preparat diamati secara mikroskopis bersama kelompok lain untuk membandingkan tingkat kerusakan sel hati. Pengamatan dilakukan pada empat lapang pandang, yaitu keempat sudut dan bagian tengah preparat, dengan menggunakan pembesaran mikroskop 100x serta di hitung score kerusakan

$$\frac{\text{jumlah total nekrosis}}{\text{jumlah sel hepar normal} + \text{jumlah sel hepar nekrosis}} \times 100\%$$

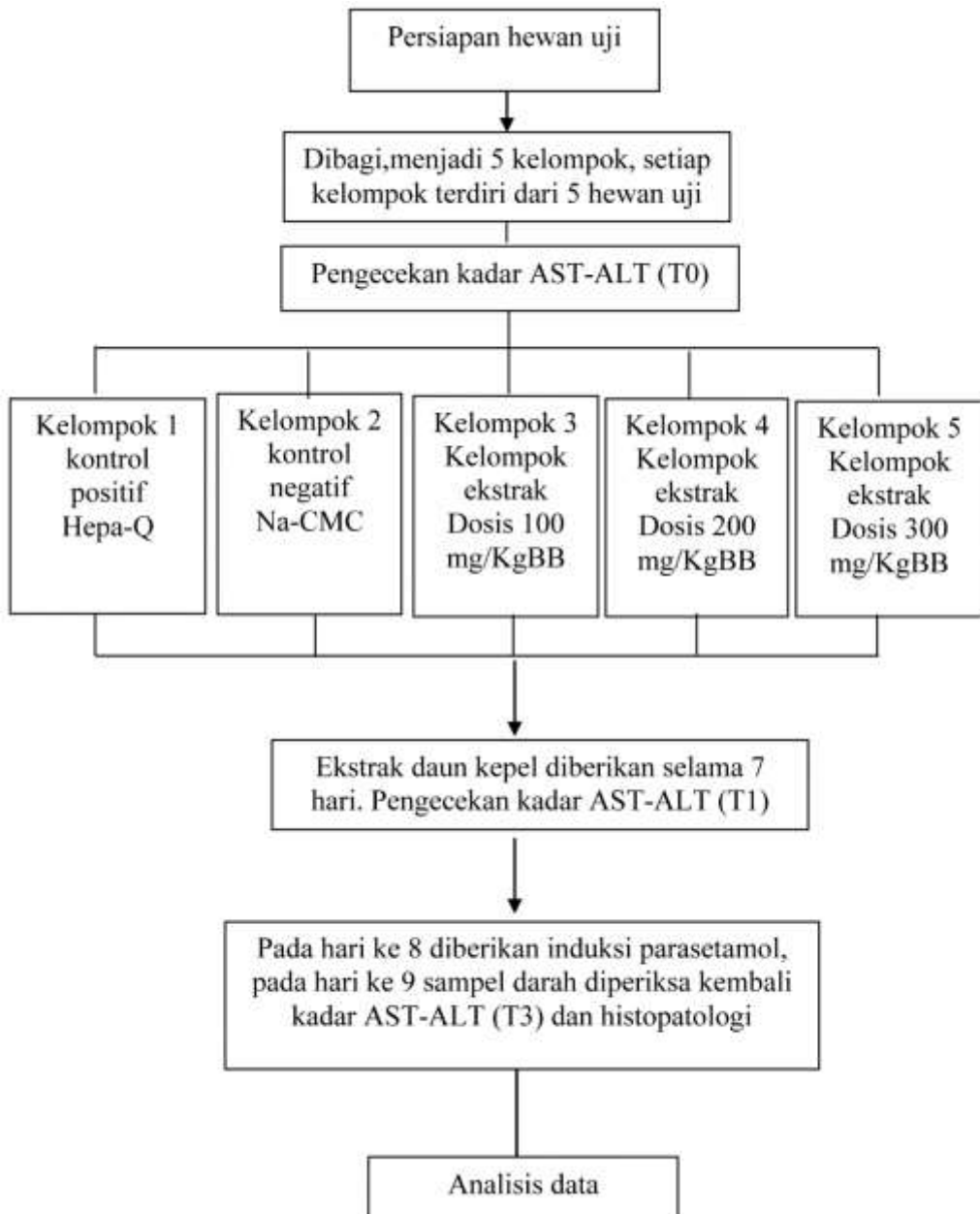
E. Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini dilakukan menggunakan program SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) untuk mengetahui apakah data yang diperoleh berdistribusi normal dan menunjukkan perbedaan yang signifikan. Jumlah data yang kurang dari 50 dianalisis uji normalitas menggunakan metode *Shapiro-Wilk*. Data dianggap berdistribusi normal apabila nilai signifikansi $> 0,05$ dan dianalisis menggunakan uji parametrik *One-Way ANOVA* (*Analysis of Variance*), yang diawali dengan uji Levene untuk menguji homogenitas varians. Apabila data homogen, analisis dilanjutkan dengan uji *Tukey Post Hoc*; sedangkan untuk data yang tidak homogen digunakan uji *Games-Howell*. Sebaliknya, data dengan distribusi tidak normal (nilai signifikansi $< 0,05$) dianalisis menggunakan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*. Uji *Mann-Whitney* kemudian digunakan untuk mengetahui perbedaan spesifik antar pasangan kelompok apabila hasil uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan adanya perbedaan signifikan.

F. Skema Penelitian



Gambar 5. Pembuatan ekstrak etanol 70% daun kepel.



Gambar 6. Skema uji hepatoprotektor AST-ALT.