

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama periode bulan Januari sampai dengan bulan Februari tahun 2023. Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UINSU Medanense melakukan perawatan dan pengobatan hewan coba, serta produksi ekstrak etanol daun sambiloto *Andrographis paniculata* (Burm. fil.) Ness. Laboratorium Herbarium FMIPA-USU berfungsi sebagai fasilitas yang didedikasikan untuk identifikasi tumbuhan. Sedangkan Laboratorium Kimia Organik FMIPA-USU digunakan untuk melakukan skrining fitokimia. Laboratorium Patologi Klinik RS USU bertugas melakukan pemeriksaan serum darah, sedangkan Laboratorium Patologi Balai Besar Veteriner Medan khusus memproduksi sediaan histologi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat pemotong, blender, dan alat putar, evaporator, hot plate, kulkas, toples kaca 3L, gelas ukur, spatula, ayakan, corong buncher, labu pisah, saringan, pompa hisap, 5 kandang tikus, wadah makan, botol minum, sonde lambung, timbangan digital, alat suntik, seperangkat alat bedah, hematokrit, bak paraffin, cawan petri, sentrifuge, tabung sentrifuge, cool box, beaker glass, tisu, kapas, serbet, mikrotube, rak tube, mikroskop cahaya, kertas saring, kertas label, sarung tangan, jarum pentul, alat tulis dan alat dokumentasi.

3.2.2 Bahan

Penelitian ini menggunakan bahan baku tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* L.) strain Wistar, ekstrak etanol daun sambiloto *Andrographis panikulata* (Burm. fil.) Ness, dan timbal asetat ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$). pelet tikus standar, sekam kayu, aquades, ethanol 96%, eter, *Neutral Buffered Formalin* (NBF), NaCl fisiologis, hemaktosilin-eosin, larutan xylol, parafin, alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 100%), *ez mount*, sampel darah (serum), reagen dialab SGOT dan SGPT.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini terdiri dari lima kelompok perlakuan, masing-masing dengan lima kali pengulangan.

K(-) : Kontrol Negatif

Diberi makan dan minum selama 28 hari.

K(+) : Kontrol Positif

Di induksi timbal asetat ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) selama 28 hari dengan dosis 40 mg/kg.

P1 : Perlakuan 1

Timbal asetat dengan rumus kimia $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ diberikan kepada subjek selama 14 hari, dimulai dari hari pertama. Dosis yang diberikan adalah 40 mg per kilogram berat badan. Ekstrak etanol daun sambiloto diberikan pada subjek pada hari ke 15 hingga 28, dengan dosis 250 mg per kilogram berat badan.

P2 : Perlakuan 2

Selama periode percobaan mulai dari hari 1 hingga 14, timbal asetat ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) diberikan dengan dosis 40 mg/kg. Ekstrak etanol daun sambiloto diberikan dengan dosis 500 mg per kilogram berat badan pada hari ke 15 hingga 28.

P3 : Perlakuan 3

Selama periode 14 hari awal, subjek diberikan timbal asetat ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) dengan dosis 40 mg/kg. Ekstrak etanol daun sambiloto diberikan dengan dosis 750 mg per kilogram berat badan, pada hari ke 15 hingga 28.

3.4 Penentuan Jumlah Sampel

Perhitungan jumlah sampel yang dibutuhkan ditentukan dengan menggunakan rumus Federer yang dinyatakan sebagai $(n - 1)(t - 1) \geq 15$. Dalam rumus ini, 'n' mewakili jumlah sampel dan 't' mewakili jumlah sampel. sejumlah perawatan. Dengan menerapkan rumus ini maka nilai jumlah sampel (n) dapat ditentukan.

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

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 4,75$$

Berdasarkan hasil penentuan jumlah sampel di atas dengan menggunakan rumus Federer, maka di dapatkan nilai dari jumlah sampel yaitu 4,75. Sehingga penulis menetapkan menggunakan 5 hewan coba pada setiap kelompok untuk hasil yang lebih efisien dan maksimal total tikus yang digunakan yaitu sebanyak 25 ekor tikus.

3.5 Prosedur Kerja

3.5.1 Pengumpulan Bahan

Sampel yang digunakan pada penelitian ini ialah daun sambiloto *Andrographis paniculata* (Burm. fil.) Ness yang di ambil langsung dari wilayah Sei Mencirim, Suka Maju, Kec. Sunggal, Kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara.

3.5.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sambiloto *Andrographis paniculata*

(Burm. fil.) Ness

Sampel daun sambiloto *Andrographis paniculata* (Burm.fil.) Ness seberat 7 kilogram diambil dan selanjutnya dilakukan proses pencucian menyeluruh dengan menggunakan air mengalir. Daun sambiloto selanjutnya mengalami proses pengeringan, dimana dibiarkan mengalami pengeringan alami hingga mencapai keadaan kering. Sampel yang sudah kering dilanjutkan ketahap selanjutnya untuk dihaluskan dengan menggunakan blender dan dipisahkan melalui ayakan sehingga diperoleh serbuk simplisia. Serbuk simplisia diekstraksi dengan metode maserasi menambahkan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 (200 gram serbuk simplisia dengan 2 liter etanol 96%). Proses ekstraksi dilakukan sebanyak tiga siklus yang masing-masing berlangsung selama 24 jam. Selain itu, campuran diaduk satu kali setiap jam selama 6 jam awal perendaman. Yang dimaksud dengan simplisia adalah bahan yang belum diolah atau mentah yang digunakan dalam pengobatan tradisional. Proses penyaringan filtrat simplisia dilakukan secara berkala 1 x 24 jam dengan menggunakan kertas saring. Hasil maserasi diencerkan menggunakan CMC Na 1%, selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan rotavapor untuk memperoleh ekstrak daun sambiloto *Andrographis paniculata* (Burm. fil.) Ness.

3.5.3 Identifikasi Tanaman

Identifikasi tanaman sambiloto *Andrographis paniculata* (Burm. fil.) Ness dilakukan di Laboratorium Herbarium Medanense (MEDA) FMIPA-USU. Identifikasi tanaman dilakukan untuk mengetahui taksonomi dari sampel sambiloto *Andrographis paniculata* (Burm. fil.) Ness.

3.5.4 Uji Skrining Fitokimia

3.5.4.1 Uji Flavonoid

Larutan ekstrak uji dimasukkan ke dalam tiga tabung reaksi yang masing-masing tabung berisi 3 mL larutan. Penambahan reagen FeCl_3 5% ke dalam tabung memberikan hasil yang positif, reaksi uji flavonoid menunjukkan larutan berubah warna menjadi koloid hitam, tabung II ditambahkan pereaksi serbuk $\text{Mg}_{(s)} + \text{HCl}_{(p)}$ dengan hasil negatif, reaksi uji flavonoid menunjukkan larutan berubah warna menjadi larutan merah muda, tabung III ditambahkan pereaksi H_2SO_4 98% dengan hasil positif, reaksi uji flavonoid menunjukkan larutan berubah menjadi warna endapan putih kekuningan.

3.5.4.2 Uji Alkaloid

Larutan ekstrak uji diletakkan ke dalam dua tabung reaksi yang masing-masing tabung berisi 3 ml larutan. tabung I ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardart dengan hasil negatif, reaksi uji alkaloid menunjukkan larutan berubah warna menjadi endapan merah bata, tabung II ditambahkan 2 tetes pereaksi Maeyer dengan hasil negatif, reaksi uji alkaloid menunjukkan larutan berubah warna endapan putih kekuningan.

3.5.4.3 Uji Terpenoid dan Steroid

Larutan ekstrak uji diletakkan ke dalam dua tabung reaksi yang masing-masing tabung berisi 3 ml larutan. Tabung I ditambahkan pereaksi Salkowsky dengan hasil positif, reaksi uji terpenoid dan steroid menunjukkan larutan berubah warna menjadi merah, tabung II ditambahkan pereaksi Liebermann-Bouchard dengan hasil positif, reaksi uji terpenoid dan steroid menunjukkan larutan berubah menjadi larutan hijau kebiruan.

3.5.4.4 Pemeriksaan Tanin

Larutan ekstrak uji tanin dicampurkan ke dalam tabung reaksi bervolume 3 ml, kemudian dicampur dengan larutan FeCl₃ 5%. Reaksi yang dihasilkan menunjukkan hasil yang baik, dibuktikan dengan terbentuknya larutan koloid hitam pada uji tanin.

3.5.4.5 Pemeriksaan Saponin

Larutan uji yang mengandung ekstrak saponin diletakkan ke dalam tabung reaksi yang volumenya mencapai 3 ml. Selanjutnya direaksikan dengan campuran Aquades, Alkohol 96%, dan HCl 2N, menghasilkan hasil negatif. Larutan yang dihasilkan dikocok kuat-kuat selama 10 menit, dilanjutkan dengan waktu istirahat 10 menit. Jika buih yang terbentuk akibat pengocokan berlangsung selama 10 menit, maka terdapat senyawa saponin.

3.5.5 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan tikus putih jantan strain Wistar (*Rattus norvegicus* L.) dengan berat antara 150-180 gram dan berumur sekitar 3 bulan. Sebanyak dua puluh lima ekor tikus putih wistar (*Rattus norvegicus* L.) jantan ditempatkan dalam lima kandang dengan ukuran masing-masing kandang 40 cm × 60 cm. Setiap kandang menampung lima ekor tikus putih Wistar jantan (*Rattus norvegicus* L.). Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* L.) strain Wistar diberi masa aklimatisasi selama satu minggu. Hal ini dilakukan guna memitigasi potensi pengaruh stres terhadap metabolisme tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* L.) strain Wistar. Penelitian ini mengharuskan tikus putih Wistar jantan (*Rattus norvegicus* L.) memiliki kesehatan yang baik. Pemanfaatan hewan coba telah mendapat persetujuan dari Ketua Komite Etik Penelitian Hewan (AREC) Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara.

3.5.6 Penginduksian dan Penetapan Dosis Timbal Asetat ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$)

Induksi timbal asetat ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) diberikan sebanyak 40 mg/kg dengan pengenceran menggunakan aquades sebanyak 196 ml. 1 ml larutan stok mengandung konsentrasi timbal asetat ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) 0,07 gr yang setara dengan asupan harian yang diterima dari 40 mg/kg, ketika diberikan kepada tikus dengan berat 150-180 gr. Pemberian timbal asetat ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) dilakukan secara oral.

3.5.7 Penginduksian Ekstrak Etanol Daun Sambiloto *Andrographis paniculata* (Burm. fil) Ness

Ekstrak daun sambiloto *Andrographis paniculata* (Burm.fil.) Ness diberikan secara oral pada hewan coba dengan dosis yang bervariasi untuk setiap kelompok perlakuan. Ekstrak diberikan pada tikus pada perlakuan 1, 2, dan 3 dengan dosis masing-masing 250, 500, dan 750 mg/kg berat badan pada hari ke 15 hingga 28. Pemberian zat pada tikus dilakukan melalui jalur oral dengan menggunakan spuit dilengkapi dengan sonde. Selama prosedur pemberian ekstrak secara oral, sonde oral dimasukkan ke dalam rongga mulut tikus dan secara bertahap dimasukkan ke dalam kerongkongan, hingga akhirnya mencapai perut. Sebelum memasukkan sonde oral, sangat penting untuk memastikan bahwa kepala tikus diposisikan tegak, sehingga memudahkan masuknya sonde oral langsung ke dalam tubuh tikus. Pelaksanaan pemberian oral yang tidak tepat dapat menyebabkan masuknya sonde oral secara tidak sengaja ke dalam saluran pernafasan, sehingga menyebabkan kematian pada tikus.

3.5.8 Pemeriksaan Kadar SGPT dan SGOT

Sampel darah dikumpulkan dari tikus pada hari terakhir. Sampel darah diperoleh dengan cara mengambil darah tikus melalui sinus orbital. Metode utama yang digunakan untuk mengambil darah dari sinus orbital melibatkan pemanfaatan hematokrit. Serum diperoleh dengan cara memasukkan sampel darah ke dalam tabung tanpa penambahan antikoagulan. Selanjutnya, campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan putaran 3000 putaran per menit (rpm) selama 10

hingga 15 menit, sehingga terjadi pemisahan cairan bening yang disebut serum dari trombosit yang terkoagulasi.

3.5.9 Pembedahan dan Pengamatan Kerusakan Hati Secara Makroskopis

Setelah masa perlakuan selama 28 hari, hewan uji menjalani masa puasa selama 18 jam. Sebelum dilakukan tindakan pembedahan pada hewan uji pada hari ke 29, terlebih dahulu dilakukan dislokasi tikus. Selanjutnya adalah tahap pembedahan dimana tikus dibedah mulai dari bagian bawah abdomen sampai ke rongga dada. Kemudian diambil organ hati dari masing-masing kelompok lalu diamati perubahan warna dan permukaannya. Organ hati diambil dan berat masing-masing hati ditimbang dan dicatat untuk mengetahui Indeks Hepatosomatik (IHS). IHS diartikan sebagai rasio berat hati terhadap berat badan yang dihitung menggunakan rumus:
$$IHS = \frac{\text{Berat Hati Tikus}}{\text{Berat Badan Tikus}} \times 100\%$$

Setelah pengamatan morfologi hati selesai, spesimen hati selanjutnya dilakukan prosedur pencucian menyeluruh dengan menggunakan larutan natrium klorida (NaCl) fisiologis. Selanjutnya, organ tersebut ditempatkan dengan hati-hati ke dalam botol sampel yang berisi larutan 10% Neutral Buffered Formalin.

3.5.10 Pembuatan Preparat Histologi Hati

Protokol pembuatan spesimen histologi hati tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* L.) diuraikan sebagai berikut:

a. Fiksasi

Selama tahap fiksasi, hati tikus menjalani proses pembersihan awal menggunakan larutan natrium klorida fisiologis 0,9%. Selanjutnya, hati ditempatkan dalam botol sampel yang diisi dengan 10% Neutral Buffered Formalin selama 24 jam.

b. Pemotongan Specimen

Pada tahap pemotongan spesimen, spesimen diiris dengan ketebalan berkisar antara 0,5 hingga 1 cm, setelah itu selanjutnya dimasukkan ke dalam jaringan pengolahan.

c. *Tissue Processing*

Tahapan *tissue processing* yaitu dimasukkan kembali *Neutral Buffered Formalin* 10% sebanyak 2 kali, selanjutnya kandungan air yang ada pada jaringan dihilangkan dengan melakukan proses dehidrasi menggunakan alkohol 70%. Prosedur selanjutnya melibatkan pembersihan jaringan menggunakan proses yang disebut infiltrasi. Hal ini memerlukan perendaman jaringan dalam larutan xylol dua kali, dengan perbandingan 3:1, diikuti dengan tiga kali perendaman lebih lanjut dalam parafin cair. Fase khusus ini berlangsung sekitar 15 hingga 16 jam.

d. *Embedding*

Selama tahap penyisipan, jaringan ditempatkan secara hati-hati di dalam cetakan yang kemudian diisi dengan parafin cair. Selanjutnya, jaringan tersebut mengalami proses pendinginan hingga membeku pada suhu kamar, sehingga terbentuk blok parafin.

e. *Sectioning*

Proses pemotongan melibatkan pembuatan sayatan dan kemudian menempatkan blok parafin ke dudukan mikrotom. Blok parafin yang digunakan dalam penelitian ini memiliki dimensi 10 μm . Hasil pemotongan yang diperoleh diwujudkan dalam bentuk pita-pita tipis yang selanjutnya direndam dalam penangas air. Selanjutnya, sediaan yang sesuai diekstraksi secara hati-hati dari media berair menggunakan alat kaca, dan selanjutnya dilakukan penerapan panas pada pelat panas untuk menghilangkan zat parafin.

f. Pewarnaan Hematoksilin Eosin

Proses pewarnaan diawali dengan tahap deparaffinisasi yang menggunakan xylol I, II, dan III dengan durasi waktu 5 menit. Selanjutnya dimulai tahap rehidrasi yang melibatkan dua putaran alkohol 96% masing-masing selama 5 menit, dilanjutkan dengan perendaman dalam alkohol 70% selama 5 menit. Selanjutnya, bersihkan benda tersebut dengan membilasnya dengan air mengalir terus menerus selama 1 hingga 2 menit, pastikan kebersihannya menyeluruh. Langkah selanjutnya melibatkan fase pewarnaan nuklir,

dimana preparasi jaringan direndam dalam larutan pewarnaan hematoksin selama 5 sampai 8 menit. Selanjutnya, fase counterstaining memerlukan penerapan 1-2 tetes eosin selama 1-3 menit. Selanjutnya dilakukan proses dehidrasi dengan cara merendam spesimen dalam alkohol 70% dan alkohol 96% secara berturut-turut, dengan masing-masing perendaman dilakukan sebanyak dua kali.

g. Mounting

Setelah pewarnaan *hematoksin eosin* selanjutnya dilakukan perekatan pada jaringan menggunakan *ez-mount*.

3.5.11 Pemeriksaan Histopatologi

Pemeriksaan preparat histopatologi hati diamati dibawah mikroskop dan dicatat perubahan mikroskopis yang ditemukan. Persiapan hati tunggal dilakukan untuk setiap tikus, dan selanjutnya, setiap persiapan diperiksa di bawah mikroskop dalam lima bidang pandang yang berbeda. Bidang pandang ini meliputi keempat sudut serta bagian tengah preparasi, dengan perbesaran 100x. Nilai rata-rata kerusakan hati dihitung untuk setiap kategori pada setiap sediaan. Skor Manja Roenigk sebagaimana diubah oleh Insani pada tahun 2015 disajikan sebagai berikut:

- 1 = Normal, tidak ada perubahan patologis.
- 2 = Degenerasi parenkimatos.
- 3 = Degenerasi hidropik.
- 4 = Nekrosis.

3.6 Analisis Data

Analisis data yang diperoleh dalam penelitian ini ialah data skoring histologi hati yang di analisis dengan uji *One way ANOVA* menggunakan perangkat SPSS begitu juga dengan data SGPT dan SGOT. Jika terdapat perbedaan yang signifikan, uji Duncan akan digunakan untuk analisis lebih lanjut.

3.7 Skema Penelitian

