

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Oktober-November 2022. Pemeliharaan dan perlakuan hewan coba dan pembuatan ekstrak etanol daun keji beling dilaksanakan di Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UINSU, Laboratorium Herbarium Medanense FMIPA-USU sebagai tempat identifikasi tumbuhan, Laboratorium Biologi Farmasi sebagai tempat skrining fitokimia, pengecekan serum SGPT dan SGOT Patologi Klinik USU, pembuatan rotary evaporator di Laboratorium Kimia Bahan Alam FMIPA-USU dan Laboratorium Patologi Balai Veteriner Medan sebagai tempat pembuatan preparat histologi.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu, Mikroskop cahaya, cover glass, object glass, Pisau cutter, blender, rotary evaporator, water bath, embedding, hot plate, kulkas kain hitam, toples kaca 3L, gelas ukur, ayakan, spatula, corong buncher, labu pisah, saringan, pompa hisap, 5 kandang tikus, wadah makan, jarum pentul, botol minum, sonde lambung, alat suntik, timbangan digital, seperangkat alat bedah, botol vial, bak parafin, Mikrotom, pisau mikrotom, beaker glass, micrometer dan cassette jaringan.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu, tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* L.) strain galur wistar, ekstrak etanol keji beling (*Strobilanthes crispus* L. Blume), Natrium Benzoat (C_6H_5COOH), Etanol 96%, pellet tikus standar, sekam kayu, aquades, CMC Na 1%, kapas, eter, Neutral Buffered Formalin 10%, NaCl fisiologis 0,9%, Haematoksin-Eosin, larutan xylol, parafin, alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 100%).

3.3 Rancangan Percobaan

Rancangan pada penelitian ini adalah eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima macam kelompok perlakuan dengan empat kali pengulangan.

1. KN : - Diberi makan dan minum (pagi).
2. KNB : - Hari ke 1-30 diinduksi Natrium Benzoat (C_6H_5COOH) 400 mg/kg BB (pagi).
3. P1 : - Hari ke 1-30 diinduksi Natrium Benzoat (C_6H_5COOH) 400 mg/kg BB (pagi).

- Hari ke 1-30 diinduksi ekstrak Daun Keji Beling 300 mg/kg BB (sore).
- 4. P2 : - Hari ke 1-30 diinduksi Natrium Benzoat (C_6H_5COOH) 400 mg/kg BB (pagi).
 - Hari ke 1-30 diinduksi ekstrak etanol Daun Keji Beling 400 mg/kg BB (sore).
- 5. P3 : - Hari ke 1-30 diinduksi Natrium Benzoat (C_6H_5COOH) 400 mg/kg BB (pagi).
 - Hari ke 1-30 diinduksi Daun Keji Beling dosis 500 mg/kg BB (sore).

3.4. Penentuan Jumlah Sampel Penelitian

Penelitian Penentuan jumlah sampel ditetapkan menggunakan rumus Federer yaitu : $t(n-1) \geq 15$, dengan n melambangkan jumlah sampel dan t yaitu perlakuan pada setiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 5 perlakuan, sehingga nilai jumlah sampel (n) adalah sebagai berikut:

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

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 15+4$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 4,75$$

Berdasarkan hasil penentuan jumlah sampel di atas dengan menggunakan rumus Federer, didapatkan nilai dari jumlah sampel yaitu 4,75. Sehingga penulis menetapkan menggunakan 4 hewan coba disetiap kelompok untuk hasil lebih efisien dan maksimal dan total tikus yang digunakan yaitu 20 ekor tikus.

3.5 Prosedur Kerja

3.5.1 Preparasi Ekstrak

Daun Keji beling (*Strobilanthes crispus* L. Blume) diambil di daerah Tambak Rejo, Medan Tembung, Kecamatan Percut Sei Tuan, Kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara.

Daun Keji Beling (*Strobilanthes crispus* L. Blume) yang diambil dicuci bersih sebanyak 7 kg sampel daun keji beling. Kemudian daun keji beling dikeringkan dengan cara diangin anginkan, hingga daunnya mengering. Sampel yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender lalu diayak dengan pengayak. Serbuk daun keji beling ditimbang

sebanyak 1 kg dimasukkan ke dalam wadah, kemudian ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 30 L dengan perbandingan 1:10 sampai sampel terendam secara keseluruhan kemudian sampel ditutup, perendaman dilakukan selama 3 hari. Selama perendaman dilakukan pengadukan 1 jam sekali selama 6 kali. Setelah itu, dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring menghasilkan filtrat dan debris. Endapan hasil perendaman diisi kembali dengan etanol 96%. Perlakuan diulangi selama 3 hari. Filtrat yang diperoleh kemudian dilakukan pemekatan dengan menggunakan rotary evaporator (Olii, 2020).

3.5.2 Uji Skrining Fitokimia

3.5.2.1 Pemeriksaan Flavonoid

Sebanyak 0,5 gr serbuk simplisia daun keji beling (*Strobilanthes crispera* L. Blume) dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pelarut etil asetat sebanyak 1ml. Pemeriksaan dilakukan sebanyak tiga kali. Pemeriksaan senyawa flavonoid menggunakan pereaksi $FeCl_3$ 5% sebanyak 0,5 gr dan diteteskan pada tabung reaksi berisi ekstrak keji beling, hasil positif ditandai dengan perubahan warna menjadi koloid hitam. Pemeriksaan flavonoid menggunakan pereaksi H_2SO_4 98% diambil sebanyak 0,5 gr dan diteteskan pada tabung reaksi berisi ekstrak daun keji beling (*Strobilanthes crispera* L. Blume), hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi orange kekuningan dan selanjutnya pemeriksaan flavonoid dengan $MgHCl$ sebanyak 0,5 gr dan ditaruh pada tabung reaksi berisi ekstrak daun keji beling (*Strobilanthes crispera* L. Blume) hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi merah muda.

3.5.2.2. Pemeriksaan Saponin

Sebanyak 0,5 gr serbuk simplisia daun keji beling (*Strobilanthes crispera* L. Blume) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan methanol sebanyak 1 ml ditutup dengan plastic dan diikat dengan karet. Kemudian direndam selama 24 jam, lalu disaring. Ekstrak simplisia yang sudah disaring dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang baru. Setelah itu dimasukkan aquades ke dalam tabung dan dilakukan pengocokan hingga berbusa. Jika berbusa maka mengindikasikan adanya kandungan senyawa saponin.

3.5.2.3. Pemeriksaan Tanin

Sebanyak 0,5 gr serbuk simplisia daun keji beling (*Strobilanthes crispera* L. Blume) dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan besi (III) klorida 5% sebanyak 3

tetes. Hasil positif dapat ditandai dengan terbentuknya warna koloid hitam. Pemeriksaan dilakukan sebanyak tiga kali

3.5.2.4. Pemeriksaan Alkaloid

Sebanyak 0,5 gr serbuk simplisia daun keji beling (*Strobilanthes crisper* L. Blume) dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 1 ml etanol 96%. Setelah itu masing-masing filtrat diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi 1 dan 2. Kemudian pada tabung 1 ditambahkan dua tetes pereaksi meyer, pada tabung reaksi dan 2 ditambahkan pereaksi bouchardat. Hasil positif ditandai dengan adanya endapan putih kekuningan pada tabung reaksi 1 dan pada tabung 2 endapan berwarna merah bata. Pemeriksaan dilakukan sebanyak tiga kali

3.5.2.5. Pemeriksaan Terpenoid dan Steroid

Sebanyak 0,5 gr serbuk simplisia daun keji beling (*Strobilanthes crisper* L. Blume) dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan n-heksan dan kloroform. Hasil positif menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard adanya steroid dan terpenoid dapat ditandai dengan perubahan warna hijau kebiruan. Sedangkan menggunakan pereaksi salkowsky, hasil positif ditandai dengan perubahan berwarna merah (Olii, 2020).

3.5.3 Persiapan Hewan Coba

Hewan berupa tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) jantan dengan berat badan 150-180 gram, berusia 3 bulan, dan berjumlah 20 ekor dimasukkan ke dalam kandang. Tikus dibagi dalam 5 kelompok yaitu satu kelompok kontrol negatif, satu kelompok kontrol positif dan tiga kelompok perlakuan masing-masing terdiri dari 4 ekor untuk setiap kelompok. Tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) diaklimatisasi selama satu minggu guna untuk mengurangi efek stress berada di lingkungan baru dan diberi pakan sehingga proses metabolisme tikus tidak terganggu. Tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) yang digunakan dalam penelitian harus dalam keadaan sehat. Penggunaan hewan coba telah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Hewan FMIPA USU (*Animal Research Ethics Committees/AREC*) dengan No. 0662/KEPH-FMIPA/2021.

3.5.4 Penginduksian dan Penetapan Dosis Natrium Benzoat

Pada penelitian ini penginduksian terhadap hewan uji coba tikus diberikan sebanyak 400 mg/kg dengan pengenceran menggunakan aquades sebanyak 200 ml. 1 ml

larutan stok mengandung konsentrasi natrium benzoat sebanyak 0,72 mg yang setara dengan asupan harian yang diterima dari 400 mg/kg BB natrium benzoat ketika diberikan pada tikus dengan berat 180 g. Pemberian natrium benzoat dilakukan secara oral dan diinduksi pada hari ke-1 sampai dengan hari ke-30 pada pagi hari.

3.5.5. Penginduksian Ekstrak Daun Keji Beling (*Strobilanthes crisper* L. Blume)

Pemberian perlakuan ekstrak daun keji beling terhadap hewan yang diinduksi dengan cara oral dengan memberikan dosis yang berbeda-beda pada setiap kelompok perlakuan. Perlakuan 1,2, dan 3 diberi ekstrak dengan dosis 300, 400, 500 mg/kg BB pada hari ke 1 sampai dengan hari ke-30 pada sore hari.

Pemberian oral pada tikus dilakukan menggunakan alat suntik yang dilengkapi dengan sonde oral. Pada proses pemberian oral ekstrak daun keji beling, sonde oral dimasukkan ke dalam mulut tikus secara perlahan-lahan diluncurkan melalui langit-langit rongga mulut sampai ke esofagus kemudian masuk ke dalam lambung. Sebelum memasukkan sonde oral, sebaiknya kepala 20 tikus diposisikan menengadah lurus keatas sehingga sonde oral masuk dengan lurus ke dalam tubuh tikus. Jika oral dilakukan dengan cara yang tidak tepat, memungkinkan sonde oral dapat masuk ke dalam saluran pernafasan yang dapat mengakibatkan kematian pada tikus.

3.5.6 Pembedahan dan Pengamatan Kerusakan Hati

Setelah dilakukan perlakuan pada tikus putih selama 30 hari, tahap selanjutnya adalah pembedahan, pada hari ke 30 tikus dipuasakan terlebih dahulu. Sebelum tikus dibedah, tikus di anastesi terlebih dahulu menggunakan eter dengan cara diinhalasi overdosis eter dimana tikus dimasukkan ke dalam toples yang di dalamnya terdapat kapas yang dibasahi dengan larutan eter. Toples ditutup rapat dan ditunggu beberapa saat sampai tikus benar-benar mati. Selanjutnya adalah tahap pembedahan dimana tikus dibedah mulai dari bagian bawah abdomen sampai ke rongga dada.

Menurut Pratiwi (2015), prosedur pembuatan preparat histopatologi dikaukan dengan metode parafinasi yang pertama kali dilakukan yaitu:

1. Fiksasi

Langkah pertama yaitu memfiksasi hati dengan menggunakan larutan *Neutral Buffered Formalin* 10% selama 48 jam. Apabila jaringan direndam terlalu lama dapat

menyebabkan kerapuhan pada jaringan sehingga tidak mungkin untuk dipotong dengan mikrotom secara baik.

2. Pemilihan Jaringan (*Trimming*)

Jaringan terfiksasi dipotong menggunakan pisau bedah yang tajam dan steril agar jaringan tidak mengalami kerusakan dalam proses pengerjaan. Setelah dilakukan proses trimming kemudian jaringan yang telah dipotong dimasukkan ke dalam cassette. Cassete yang berisi jaringan kemudian direndam dalam aquades selama satu menit dengan tujuan untuk menghindari terjadinya pengkerutan pada jaringan akibat terlalu lama terkena udara.

3. Dehidrasi Jaringan

Dehidrasi jaringan dilakukan dengan tujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi sehingga nantinya dapat diisi dengan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Hal ini perlu dilakukan karena air tidak dapat bercampur dengan cairan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Penarikan air keluar dari sel/jaringan dilakukan dengan cara merendam jaringan dalam bahan kimia yang berfungsi sebagai dehidrator (penarik air) yang secara progresif konsentrasinya meningkat, yakni alkohol.

4. Pembuatan Blok Jaringan

Pembuatan blok jaringan dilakukan untuk menjaga masing-masing bagian dari jaringan agar tidak berubah seperti pada kondisi tahap awal pemotongan dengan menggunakan alat yang disebut *tissue embedding*. Sampel organ yang diambil juga harus sesuai dengan ukuran cetakan (*paraffin mold*). Cetakan diisi dengan parafin cair. Parafin yang digunakan mempunyai titik didih 60°C. Cetakan ke-21 didinginkan pada *cold-plate* lalu ditanamkan organ kedalam cetakan dan diberi parafin cair kembali kemudian dibekukan agar mudah dipotong.

5. Pengirisan Jaringan

Pengirisan jaringan adalah proses pemotongan blok jaringan dengan menggunakan mikrotom. Mikrotom merupakan alat yang digunakan untuk memotong tipis atau irisan suatu jaringan. Sampel jaringan berparaffin bergerak maju secara manual menuju pisau sesuai dengan ketebalan irisan 4-5 mikron.

6. Pewarnaan

Pada pewarnaan HE, sediaan preparat pada gelas objek direndam dalam xylol 1 dan 2 selama masing-masing dua menit untuk dilakukan deparafinasi kemudian

rehidrasi dengan perendaman secara berturut dalam alkohol absolut, alkohol 95%, dan alkohol 80% masing-masing selama dua menit, lalu dicuci dengan air mengalir. Pewarnaan dengan Hematoksin dilakukan selama 8 menit, selanjutnya dibilas dengan air mengalir, lalu dicuci dengan Lithium karbonat selama 15-30 detik, dibilas dengan air mengalir, serta diwarnai dengan Eosin selama 2-3 menit. Sediaan yang diwarnai eosin dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan. Sediaan dimasukkan kedalam alkohol 95% dan alkohol absolut masing-masing sebanyak 10 kali celupan, lalu ke dalam alkohol absolut 2 selama 2 menit. Selanjutnya ke dalam xylol 1 selama 1 menit dan xylol 2 selama 2 menit. Sediaan kemudian ditetaskan dengan perekat permount dan ditutup dengan gelas penutup dan selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop.

7. Tahap mounting

Jaringan yang telah diwarnai kemudian diletakkan pada objek glass lalu direkatkan menggunakan ezimon.

3.5.7. Pemeriksaan Preparat Histopatologi

3.5.7.1. Histologi Hepar

Pemeriksaan preparat histopatologi hepar diamati di bawah mikroskop dengan menggunakan perbesaran 400 kali dimana sebanyak 20 slide diamati dalam lima lapangan pandang yang berbeda pada setiap slide. Setiap lapangan pandang dihitung 20 sel secara acak, sehingga dalam satu preparat tersebut ditemukan 100 sel hepar. Kemudian dihitung rata bobot skor perubahan histopatologi hepar pada lima lapangan pandang dari masing-masing tikus dengan model *Skoring Histopathology Manja Roenigk*. Kriteria penilaian yang diamati berupa nekrosis sel, degenerasi parenkimatososa dan degenerasi hidropik. Kemudian dicatat dan dihitung jumlah persentase kerusakan yang terjadi (Imamah, 2016).

Tabel 3.5.7.2. Kriteria penilaian derajat histopatologi sel hepar model *Skoring Histopathology Manja Roenigk*.

Deskripsi Histologi	Uraian/Kriteria	Skor
Normal	Ukuran sel rata-rata, ada titik-titik diinti sel, dan warna sitoplasma cukup merata	1
Degenerasi parenkimatosa	Sitoplasma membengkak dan sitoplasma bergranula	2
Degenerasi hidropik	Vakoulalisasi (sitoplasma pucat dan sel-sel membesar)	3
Nekrosis	Diameter sitoplasma lebih kecil, Warna sitoplasma lebih merah, dan Inti sel bisa tidak ada, bisa tebal (menjadi titik), bisa menyebar (tidak ada batas inti sel)	4

3.5.8. Pengukuran Kadar SGPT & SGOT

Alat yang akan digunakan harus dikalibrasi terlebih dahulu. Kemudian bahan yang akan dipakai haruslah diperiksa terlebih dahulu kondisinya. *Quality control* : Dilakukan sebelum ke pemeriksaan sampel tikus. Disiapkan dahulu bahan controlnya, kemudian dilakukan pemeriksaan dengan perlakuan sama seperti sampel. Dilihat hasil kontrol dalam range yang ditetapkan oleh pabrik.

Darah tikus diambil dengan menggunakan pipet hematocrit melalui vena sinus orbital mata. Darah yang keluar ditampung dengan menggunakan *Microtube*. Untuk membuat serum untuk sampel pemeriksaan, darah yang telah diambil didalam tabung didiamkan selama kurang lebih 15-20 menit, kemudian centrifuge dengan kecepatan 3500 rpm selama 10-15 menit, selanjutnya serum dipipet dan dipisahkan ke dalam tabung eppendorf dengan keadaan bersih. Kemudian dianalisis terhadap kadar SGPT & SGOT (Farihatun, 2020).

3.5.9. Analisis Data

Analisis data yang diperoleh dalam penelitian ini diolah secara statistic menggunakan analisis One Way ANOVA menggunakan perangkat lunak SPSS release 23 (*Statistical Product of Service Solution*) untuk melihat data histologi hepar, SGPT dan SGOT. Analisis yang digunakan adalah uji homogenitas (Uji *Bartlett*). Apabila data yang didapat terjadi perbedaan nyata ($P < 0,05$) dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan.

3.6 Skema Penelitian

