

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni-Juli 2024 dengan tempat perawatan dan pengujian hewan coba di Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Sumatera Utara. Determinasi tanaman akan dilakukan di Laboratorium Herbarium Medanense Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara. Uji fitokimia dan pembuatan ekstrak etanol daun salam akan dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Sumatera Utara. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Pengembangan PTKI Medan. Analisis dan perhitungan kadar kreatinin dan ureum dilakukan di UPT. Laboratorium Kesehatan Daerah Sumatera Utara.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, timbangan digital, kandang tikus, sonde oral, spuit 3 ml, pisau, beaker glass, batang pengaduk, blender, toples, rak tabung, tabung reaksi, *centrifuge*, *colling box*, baki bedah, 1 set alat bedah, mikrohematokrit, mikrotube, *waterbath* dan *rotary evaporator*.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* L.), daun salam (*Syzygium polyanthum*), etanol 96%, aquadest, kadmium klorida ( $\text{CdCl}_2$ ) CMC 0,5% dan sampel darah tikus.

#### **3.3 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan penelitian eksperimental dengan rancangan acak lengkap (RAL). Penelitian akan dilakukan dengan 5 kelompok perlakuan dan dengan 4 kali pengulangan yaitu :

1. Kelompok kontrol negatif (K-) : Kelompok ini tikus hanya diberi makan dan diberi minum.

2. Kelompok kontrol positif (K+) : Kelompok ini tikus hanya dipaparkan kadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) dengan dosis 40 mg /kg BB setiap pagi hari selama 14 hari.
3. Kelompok Perlakuan 1 (P1) : Kelompok ini tikus diberi kadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) dengan dosis 40 mg/kg BB setiap pagi hari dan diberi ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) dengan dosis 200 gram/kg BB setiap sore hari selama 14 hari.
4. Kelompok Perlakuan 2 (P2) : Kelompok ini tikus diberi kadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) dengan dosis 40 mg/kg BB setiap pagi hari dan diberi ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) dengan dosis 300 gram/kg BB setiap sore hari selama 14 hari.
5. Kelompok Perlakuan 3 (P3) : Kelompok ini tikus diberi kadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) dengan dosis 5 mg/kg BB pagi hari dan diberi ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) dengan dosis 400 gram/kg BB setiap sore hari selama 14 hari.

Banyaknya jumlah tikus yang diperlukan, ditentukan dengan menggunakan rumus Federer.

Rumus Federer :

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

t : jumlah kelompok perlakuan

n : jumlah sampel dalam tiap kelompok perlakuan

maka :

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

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

$$4n-1 \geq 15$$

$$4n \geq 16$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan diatas maka diketahui jumlah sampel minimal yang diperlukan adalah 4 ekor tikus putih. Oleh karena itu pada penelitian ini menggunakan sampel sebanyak 4 ekor tikus putih untuk setiap kelompok perlakuan. Terdapat 5 kelompok perlakuan sehingga dalam penelitian ini membutuhkan 20 ekor tikus putih

### **3.4 Prosedur Kerja**

#### **3.4.1 Identifikasi Tanaman**

Tanaman yang dipakai pada penelitian ini adalah daun salam yang diambil dari daerah Aek Songsongan Kabupaten Asahan Sumatera Utara. Selanjutnya daun salam dideterminasi di Laboratorium Herbarium Medanense Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara.

#### **3.4.2 Preparasi Ekstrak Daun Salam**

Daun salam diperoleh dengan memotong bagian bagian cabang pohon, kemudian dipisahkan daun dengan batang. Setelah itu daun salam yang telah disortir dicuci menggunakan air mengalir dan di keringkan dalam ruangan terbuka yang tidak terpapar langsung dengan cahaya matahari. Setelah kering daun salam dihaluskan menggunakan blender menjadi serbuk simplisia. Serbuk simplisia dimaserasi dengan perbandingan 1: 10. Simplisia daun salam sebanyak 800 gram di maserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 8000 ml selama 3-5 hari. Setelah itu ekstrak daun salam yang sudah dimaserasi disaring menggunakan kertas saring kemudian diletakkan dalam wadah. Serat yang diperoleh kemudian dimaserasi kembali selama 3 hari. Ekstrak daun salam yang telah disaring diuapkan agar menghasilkan ekstrak kental menggunakan *rotary evaporator*. Selanjutnya ekstrak yang diperoleh ditimbang dengan berat 200 mg, 300 mg dan 400 mg serta dilarutkan dengan *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) 0,5% lalu hasilnya disimpan di lemari pendingin pada suhu 4-8°C.

#### **3.4.3 Uji Skrining Fitokimia**

Pengujian skrining fitokimia dilakukan menggunakan analisis kualitatif yang bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya kandungan metabolit sekunder pada ekstrak daun salam

##### **3.4.3.1 Pemeriksaan Flavonoid**

Ekstrak daun salam yang telah disaring dimasukkan ke dalam tabung reaksi secukupnya kemudian dididihkan dan diuapkan di waterbath, setelah itu ditambahkan serbuk magnesium (Mg) dan asam klorida (HCl) pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi merah, kuning atau jingga.

### 3.4.3.2 Pemeriksaan Alkaloid

Ekstrak daun salam yang telah disaring dimasukkan ke dalam tabung reaksi secukupnya kemudian dididihkan dan diuapkan di waterbath, setelah itu ditambahkan pereaksi Mayer. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih hingga kekuningan.

### 3.4.3.3 Pemeriksaan Saponin

Ekstrak daun salam yang telah disaring dimasukkan ke dalam tabung reaksi secukupnya kemudian dididihkan dan diuapkan di waterbath, setelah itu ditambahkan air mendidih/panas dan HCl 2 N kemudian dikocok selama 5 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya busa setinggi 1- 10 cm yang tidak cepat hilang.

### 3.4.3.4 Pemeriksaan Tanin

Ekstrak daun salam yang telah disaring dimasukkan ke dalam tabung reaksi secukupnya kemudian dididihkan dan diuapkan di waterbath, setelah itu ditambahkan NaCl 12% dan FeCl 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi biru gelap atau hijau kehitaman.

### 3.4.3.5 Pengujian Aktivitas Antioksidan

Adapun prosedur pengujian aktivitas antioksidan adalah sebagai berikut :

1. Pembuatan Larutan DPPH

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 10 mg dilarutkan 100 ml etanol, kemudian larutan diaduk hingga homogen.

2. Pembuatan Larutan Blanko

Larutan DPPH di pipet sebanyak 10 ml kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25ml, ditambahkan etanol p.a hingga garis tanda lalu dihomogenkan sehingga diperoleh larutan konsentrasi 40 ppm, dimasukkan ke dalam kuvet spektrofotometri. Dibaca absorbansinya dengan blanko berupa etanol p.a pada range 400-600 nm.

3. Pembuatan Konsentrasi Antioksidan Daun Salam

Ditimbang ekstrak kental sebanyak 25 mg dan dilarutkan dengan etanol p.a sehingga 25ml, diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Diambil 0,25 ml; 0,375 ml; 0,5 ml; 0,625 ml; 0,75 ml dari larutan ekstrak yang 1000

ppm, kemudian ditambahkan 1 ml larutan DPPH pada masing masing konsentrasi dan ditambahkan dengan etanol p.a hingga batas tanda (Tabung reaksi 5 ml), diperoleh konsentrasi 50, 75, 100, 125, 150 ppm. Diinkubasi selama 30 menit kemudian di ukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV - Vis pada panjang gelombang maksimum 516 nm.

#### 4. Penentuan Nilai IC<sub>50</sub>

Analisis pengujian antioksidan DPPH dilakukan dengan melihat perubahan warna masing-masing sampel setelah diinkubasi bersama DPPH. Jika semua elektron DPPH berpasangan dengan elektron pada sampel ekstrak maka akan terjadi perubahan warna sampel dimulai dari ungu tua hingga kuning. Perhitungan persentase penangkapan radikal bebas oleh ekstrak daun salam dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{perendaman} = \frac{A \text{ Blanko} - A \text{ Sampel}}{A \text{ Blanko}} \times 100\%$$

#### 3.4.4 Persiapan Hewan Coba

Hewan uji coba pada dalam penelitian ini adalah menggunakan 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) berumur 3 bulan dengan berat badan 180-200 gram. Disiapkan 5 kandang berukuran 40 × 60 cm dengan isi 4 ekor tikus/kandang. Tikus diaklimatisasi selama seminggu untuk menghilangkan stres yang dapat mempengaruhi metabolisme tikus dan dapat menyulitkan penelitian karena penyesuaian terhadap lingkungan yang baru. Penggunaan hewan coba sudah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Hewan FMIPA USU (Animal Research Ethics Committees/arec) dengan No. 0641/KEPH-FMIPA/2024.

#### 3.4.5 Penginduksian Kadmium Klorida (CdCl<sub>2</sub>)

Penginduksian kadmium klorida dilakukan secara oral dengan dosis 40 mg/kg BB setiap hari selama 14 hari. Perhitungan penginduksian kadmium berdasarkan berat badan tikus, misalnya dengan berat badan tikus 180 gram :

$$\frac{180}{100} \times 40 \text{ mg} = 7,2 \text{ mg CdCl}_2 + 0,5 \text{ ml aquadest}$$

Maka kadmium klorida yang diinduksi pada tikus dengan berat badan 180 gram adalah sebanyak 7,2 mg dilarutkan dalam 0,5 ml aquadest.

### 3.4.6 Pemberian Ekstrak Daun Salam

Pemberian ekstrak daun salam dilakukan secara oral pasca pemberian induksi pada sore hari dengan dosis yang telah ditentukan masing-masing perlakuan. P1 sebanyak 200 mg/kg BB, P2 sebanyak 300 mg/kg BB dan P3 sebanyak 400 mg/kg BB dilarutkan masing-masing dengan CMC 0,5%. Perlakuan dilakukan sebanyak 14 kali dalam 14 hari. Perhitungan dosis ekstrak dibuat berdasarkan rata-rata berat badan tikus pada setiap kelompok perlakuan, misalnya dengan berat badan tikus 180 gram dan dengan dosis 400 mg/kg BB, yaitu :

$$\text{Ekstrak} = \frac{180}{1000} \times 400 = 72 \text{ mg}; \text{ dibuat larutan stok selama 1 minggu, maka :}$$

$$= 72 \times 5 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari}$$

$$= 2.520 \text{ mg} = 2,52 \text{ gr}$$

$$\text{Larutan CMC } 0,5 \% = 1,8 \text{ ml CMC} \times 5 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari}$$

$$= 63 \text{ ml CMC}$$

Untuk dosis ekstrak etanol daun salam 400 mg/kg selama 7 hari berdasarkan berat badan tikus putih yaitu sebanyak 2,52 gr ekstrak daun salam dicampurkan dengan 63 ml CMC 05 %. Maka, ekstrak etanol daun salam yang diinduksi pada tikus putih dengan berat badan 180 gram adalah sebanyak 1,8 ml setiap sore hari selama 14 hari pasca pemberian kadmium klorida.

#### 3.4.6.1 Pembuatan Larutan CMC 0,5%

Pembuatan larutan CMC dilakukan dengan perbandingan 1 : 100 yaitu sebanyak 0,5 gram CMC dilarutkan dalam 100 ml aquadest kemudian dilarutkan diatas hotplate sambil diaduk.

#### 3.4.7 Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke 15 pasca hari terakhir perlakuan. Darah diambil dari mata (sinus orbitalis) menggunakan mikrohematokrit kemudian dimasukkan ke dalam mikrotube dan didiamkan selama  $\pm 10$  menit. Kemudian dilakukan pemisahan serum dan plasma

menggunakan sentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya serum dipisah dan dimasukkan kedalam mikrotube. Serum digunakan untuk pemeriksaan terhadap kadar kreatinin dan ureum.

#### 3.4.7.1 Pemeriksaan Kadar Kreatinin

Adapun pemeriksaan kadar kreatinin dilakukan dengan metode Jaffe menggunakan kit dialab Australia. Pengujian dilakukan dengan cara *men-set to 0 chemical analyzer* menggunakan blank dengan komposisi reagen I 1000  $\mu\text{L}$  dan aquadest 50  $\mu\text{L}$  lalu divorteks dan diinkubasi selama 5 menit dengan  $37^\circ\text{C}$  dan ditambahkan reagen II sebanyak 250  $\mu\text{L}$ . Lalu diukur adsorbansi standart dengan menambahkan 50  $\mu\text{L}$  standart dan 1000  $\mu\text{L}$  reagen I kemudian di vortex dan diinkubasi selama 2 menit dengan suhu  $37^\circ\text{C}$  lalu ditambahkan reagen II sebanyak 250  $\mu\text{L}$ . Kemudian diukur adsorbansi sampel dengan menambahkan 50  $\mu\text{L}$  sampel dan 1000  $\mu\text{L}$  reagen I kemudian di vortex dan diinkubasi selama 2 menit dengan suhu  $37^\circ\text{C}$  lalu ditambahkan reagen II sebanyak 250  $\mu\text{L}$ ; diukur adsorbansi dengan panjang gelombang 510 nm, diulangi pengukuran adsorbansi setiap 60 detik selama 2 menit lalu diratakan nilai optical density dan dikalkulasikan dengan rumus berikut :

$$\frac{\Delta A \text{ sampel}}{\Delta \text{ standart}} \times \text{konsentrasi standart} = \text{kreatinin mg/dl}$$

#### 3.4.7.2 Pemeriksaan Kadar Ureum

Adapun pemeriksaan kadar ureum dilakukan dengan metode GLDH Pengujian dilakukan dengan cara *men-set to 0 chemical analyzer* menggunakan blank dengan reagen I 1000  $\mu\text{L}$  dan diinkubasi selama 5 menit dengan  $37^\circ\text{C}$  dan ditambahkan reagen II sebanyak 250  $\mu\text{L}$ . Lalu diukur adsorbansi standart dengan menambahkan 10  $\mu\text{L}$  standart dan 1000  $\mu\text{L}$  reagen I kemudian di vortex dan diinkubasi selama 5 menit dengan suhu  $37^\circ\text{C}$  lalu ditambahkan reagen II sebanyak 250  $\mu\text{L}$ . Kemudian diukur adsorbansi sampel dengan menambahkan 10  $\mu\text{L}$  sampel dan 1000  $\mu\text{L}$  reagen I kemudian di vortex dan diinkubasi selama 5 menit dengan suhu  $37^\circ\text{C}$  lalu ditambahkan reagen II sebanyak 250  $\mu\text{L}$ ; diukur *optical density* menggunakan alat chemistry analyzer dengan panjang gelombang 340 nm; diulangi pengukuran adsorbansi setiap 60 detik selama 2 menit lalu diratakan nilai *optical density* dan dikalkulasikan dengan rumus berikut :

$$\frac{\Delta A \text{ sampel}}{\Delta \text{ standard}} \times \text{konsentrasi standard} = \text{kreatinin mg/dl}$$

### 3.4.8 Pembedahan dan Pengamatan Morfologi dan indeks Organ Ginjal Tikus

Untuk meringankan penderitaan sebelum dilakukan pembedahan, tikus dibius menggunakan larutan kloroform, kemudian tikus diletakkan diatas baki bedah kemudian dibedah pada bagian abdomen menggunakan satu set alat bedah. Pengamatan warna dan tekstur permukaan organ ginjal dilakukan dengan cara mengamati warna, permukaan, dan konsistensi ginjal. Pengamatan morfologi berdasarkan tabel dibawah ini.

Tabel 3.1 Derajat morfologi ginjal

Morfologi organ ginjal	Normal	Tidak normal
Warna	Merah kecokelatan	Merah pucat
Permukaan	Licin	Kasar
Konsistensi	Kenyal	Kaku

Pengukuran berat relatif organ ginjal dilakukan dengan cara menimbang organ ginjal bagian kiri dan kanan menggunakan timbangan analitik dan berat relative ginjal dinyatakan dalam persen (%) berdasarkan rumus:

$$\text{Berat relatif organ} = \frac{\text{Berat organ (g)}}{\text{Berat badan tikus (g)}} \times 100\% \text{ (Malini et al., 2021)}$$

### 3.5 Analisis Data

Data pengukuran kadar ureum dan kreatinin di analisis menggunakan SPSS dengan Uji *One Way ANOVA (Analysis of Variance)* dengan taraf signifikan 5%.

Jika berpengaruh maka dilanjutkan dengan Uji *Duncan's Multiple Range Test (DMRT)*. Hasil dari analisis pengukuran dikajikan secara deskriptif kuantitatif.



### 3.6 Skema Penelitian

