

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni-Juli 2024. Tempat pemeliharaan dan perlakuan hewan coba dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Sumatera Utara. Pembuatan ekstrak etanol daun salam dan uji skrining fitokimia dilaksanakan pada Laboratorium Politeknik Kimia Industri Sumatera Utara. Pemeriksaan SGPT dan SGOT dilaksanakan pada Laboratorium Kimia Klinis UPT. Laboratorium Kesehatan Daerah Provinsi Sumatera Utara.

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

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan yaitu timbangan digital, beaker glass, batang pengaduk, blender, sonde oral, mikrohematokrit, spektrofotometer, mikro pipet, rak tabung, sentrifuge, tabung sentrifuge, termos es.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan yang diperlukan yaitu tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) daun salam (*Syzygium polyanthum*), Etanol 70%, Aquadest, NaCl 0,9%, Kadmium ( $\text{CdCl}_2$ ), Sampel darah (serum), CMC Na 0,5%, Reagen dialab SGOT dan SGPT.

#### **3.3 Rancangan Penelitian**

Penelitian menggunakan metode rancangan acak lengkap (RAL). Kelompok perlakuan menggunakan 5 macam kelompok serta 4 kali pengulangan:

1. Kelompok kontrol negatif (K-): Kelompok ini hanya memberikan makanan dan minuman saja.
2. Kelompok kontrol positif (K+): Kelompok ini hanya memberikan kadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) dengan dosis 40 mg/kg BB + 0,5 aquades setiap hari sekali selama 14 hari.
3. Kelompok perlakuan (P1): Kelompok diberi kadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) dengan dosis 40 mg/kg BB + 0,5 aquades setiap pagi hari sekali selama 14 hari dan diberi ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) dengan dosis 200 gram/kg BB setiap sore hari.

4. Kelompok perlakuan (P2): Kelompok diberi kadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) dengan dosis 40 mg/kg BB + 0,5 aquades setiap pagi hari sekali selama 14 hari dan diberi ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) dengan dosis 300 gram/kg BB setiap sore hari.
5. Kelompok perlakuan (P3): Kelompok diberi kadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) dengan dosis 40 mg/kg BB + 0,5 aquades setiap pagi hari sekali selama 14 hari dan diberi ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) dengan dosis 400 gram/kg BB setiap sore hari.

Banyaknya jumlah tikus yang diperlukan ditentukan dengan menggunakan rumus Federer, sebagai berikut :

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

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

$$4n-1 \geq 15$$

$$4n \geq 16$$

$$n = 4$$

### 3.4 Prosedur Kerja

#### 3.4.1 Pembuatan Ekstrak Daun Salam (*Syzygium polyanthum*)

Untuk memperoleh ekstrak daun salam, dipotong sebagian dahan pohon lalu cabut daunnya dari batangnya. Setelah disortir, daun salam dibersihkan dengan air mengalir dan dikeringkan di tempat terbuka, jauh dari sinar matahari. Daun salam ditumbuk menjadi bubuk simplisia dengan menggunakan blender setelah dikeringkan. Serbuk simplisia dimaserasi selama 3-5 hari dengan perbandingan pelarut etanol 1:10. Ekstrak daun salam yang telah dimaserasi kemudian dituangkan ke dalam wadah setelah disaring melalui kertas saring. Setelah itu, serat yang dihasilkan menjalani maserasi lagi selama tiga hari. *Rotary evaporator* digunakan untuk menguapkan ekstrak daun salam yang telah disaring sehingga menghasilkan ekstrak yang kental. Selanjutnya ekstrak yang diperoleh ditimbang sebanyak 200 mg, 300 mg dan 400 mg dan dilarutkan dalam CMC 0,5%, kemudian hasilnya disimpan dalam lemari es pada suhu 4-8°C.

### **3.4.2 Uji Skrining Fitokimia**

#### **3.4.2.1 Pemeriksaan *Flavonoid***

Sebuah tabung reaksi yang cukup besar diisi dengan ekstrak daun yang telah disaring, kemudian dipanaskan hingga mendidih dan dibiarkan menguap dalam penangas air (waterbath). Selanjutnya ditambahkan bubuk magnesium (Mg) dan asam klorida pekat (HCL). Jika warnanya berubah menjadi merah, kuning, atau oranye, hasilnya dianggap positif.

#### **3.4.2.2 Pemeriksaan *Alkaloid***

Ekstrak daun salam setelah disaring kemudian dipanaskan hingga mendidih dan diuapkan dalam penangas air (waterbath), kemudian ditambahkan pereaksi Mayer. Endapan putih hingga kekuningan akan terbentuk sebagai tanda positif.

#### **3.4.2.3 Pemeriksaan *Tanin***

Ekstrak daun salam setelah disaring kemudian dipanaskan hingga mendidih dan diuapkan dalam penangas air (waterbath). Selanjutnya ditambahkan FeCl 1% dan NaCl 12%. Perubahan warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan hasil yang positif.

#### **3.4.2.4 Pemeriksaan *Saponin***

Ekstrak daun salam yang disaring dan dimasukkan ke tabung reaksi, dipanaskan hingga mendidih dan diuapkan dalam penangas air. Kemudian ditambahkan HCL 2 N dan air panas mendidih, dan campuran diaduk selama 5 menit. Adanya busa yang tingginya antara satu hingga sepuluh sentimeter dan tidak cepat hilang menunjukkan hasil yang positif.

### **3.4.3 Persiapan Hewan Coba**

Hewan uji berupa tikus putih (*Rattus norvegicus L.*) galur wistar dengan bobot badan 150-180 gram, umur 2-3 bulan, dan 20 ekor dan disiapkan 5 kandang berukuran 40 cm × 60 cm. Setiap kandang diisi dengan 4 tikus putih. Tikus putih di sesuaikan selama beberapa minggu untuk membatasi dampak berat pada tikus putih yang mempengaruhi pencernaan tubuh dan dapat menghambat penelitian karena mereka berada di iklim lain. Penggunaan hewan coba sudah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Hewan FMIPA USU (*Animal Research Ethics Committees/AREC*) dengan No. 0641/KEPH-FMIPA/2024.

#### 3.4.4 Penginduksian Kadmium

Penginduksian kadmium dilakukan secara oral dengan dosis 5 mg/kg BB sebanyak 14 kali perlakuan selama 14 hari. Perhitungan penginduksian kadmium berdasarkan berat badan tikus, misalnya dengan berat badan tikus 180 gram :

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

#### 3.4.5 Pemberian Ekstrak Daun Salam

Pemberian ekstrak daun salam dilakukan secara oral dengan dosis yang telah ditentukan, P1 sebanyak 200 mg/kg BB, P2 sebanyak 300 mg/kg BB, dan P3 sebanyak 400 mg/kg BB. Pemberian ekstrak daun salam dilakukan pasca pemberian kadmium pada sore hari, sebanyak 14 kali perlakuan selama 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 :

$$\begin{aligned} \text{Ekstrak} \quad \frac{180}{1000} \times 400 &= 72 \text{ mg} \\ &= 72 \text{ mg} \times 5 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 2.520 = 2,52 \text{ gr} \end{aligned}$$

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

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

Untuk dosis ekstrak etanol daun salam 400 mg/kg berdasarkan berat badan tikus putih yaitu sebanyak 2,25 gr 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 Tahap Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan sampel darah diambil pada hari terakhir perlakuan atau hari ke-15. Pengambilan darah tikus dilakukan melalui sinus orbitalis. Cara pengambilan darah yang paling umum di sinus orbital adalah dengan cara menggunakan mikrohematokrit. Sampel darah di tempatkan ke dalam tabung tanpa antikoagulan untuk mendapatkan serum. Tabung berisi darah tanpa antikoagulan di biarkan selama 20 menit pada suhu ruang. Kemudian disentrifugasi pada 3000 rpm

selama 15 menit dan menghasilkan cairan yang jelas ke atas trombosit yang terkoagulasi di sebut serum.

### **3.4.7 Metode Pemeriksaan Kadar SGPT dan SGOT**

#### **3.4.7.1 Prosedur Kerja Pemeriksaan Kadar SGPT (*Serum Glutamic Pyruvic Transaminase*)**

Pemeriksaan kadar SGPT (*Serum Glutamic Pyruvic Transaminase*) dilakukan dengan metode IFCC menggunakan kit komersial dialab Australia. Pengujian dilakukan dengan cara dimasukkan sebanyak 100  $\mu/l$  sampel dan ditambahkan reagen I sebanyak 1000  $\mu/l$  setelah itu di vortex dan diinkubasi dengan suhu 37<sup>0</sup> C selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan reagen II sebanyak 250  $\mu/l$  lalu di vortex dan *optical density* (OD) diukur menggunakan alat chemistry analyser dengan panjang gelombang 340 nm. Pengukuran panjang gelombang diulang setiap 60 detik selama 3 menit. Dirata-ratakan nilai absorbansi lalu nilai OD di kalkulasikan dengan rumus berikut:

$$\text{GPT U/L} = \Delta A/\text{min} \times 2143$$

#### **3.4.7.2 Prosedur Kerja Pemeriksaan Kadar SGOT (*Serum Glutamic Oksaloasetat Transaminase*)**

Pemeriksaan kadar SGOT (*Serum Glutamic Oksaloasetat Transaminase*) dilakukan dengan metode IFCC menggunakan kit komersial dialab Australia. Pengujian dilakukan dengan cara dimasukkan sebanyak 100  $\mu/l$  sampel dan ditambahkan reagen I sebanyak 1000  $\mu/l$  setelah itu di vortex dan diinkubasi dengan suhu 37<sup>0</sup> C selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan reagen II sebanyak 250  $\mu/l$  lalu di vortex dan *optical density* (OD) diukur menggunakan alat chemistry analyser dengan panjang gelombang 340 nm. Pengukuran panjang gelombang diulang setiap 60 detik selama 3 menit. Dirata-ratakan nilai absorbansi lalu nilai OD di kalkulasikan dengan rumus berikut:

$$\text{GOT U/L} = \Delta A/\text{min} \times 2143$$

#### **3.4.7.3 Prosedur Kerja Pemeriksaan Morfologi Hati**

Pengamatan morfologi hati tikus dengan membedah bagian rongga perut dan dikeluarkan hati, kemudian diletakkan hati dalam wadah yang berisi larutan saline fisiologis untuk membersihkan darah dan kotoran yang menempel pada

hati. Kemudian pengamatan morfologi dapat dilihat dari beberapa pengamatan sebagai berikut :

1) Warna Hati

- Coklat kemerahan : menandakan adanya steatosis
- Kuning : menandakan adanya steatosis (penumpukan lemak) atau icterus (penumpukan bilirubin)

2) Ukuran Hati

- Besar : dapat disebabkan oleh hipertrofi (pertumbuhan sel hati yang berlebihan), tumor, atau inflamasi
- Kecil : dapat disebabkan oleh atrofi (penyusutan sel hati), fibrosis (penumpukan jaringan parut), atau nekrosis (kematian sel)
- Normal : ukuran hati yang sesuai dengan berat badan tikus (0,5% - 0,7% dari berat badan tikus)

3) Konsistensi Hati

- Lunak : menandakan adanya steatosis atau edema (penumpukan air di jaringan)
- Keras : menandakan adanya fibrosis atau sirosis (penyakit hati kronis yang ditandai dengan jaringan parut yang luas)
- Kenyal : konsistensi normal hati tikus

4) Permukaan Hati

- Halus : permukaan normal hati tikus
- Kasar : menandakan adanya fibrosis atau nodul
- Nodular : adanya benjolan kecil pada permukaan hati yang dapat disebabkan oleh tumor, abses, atau parasite

### 3.5 Analisis Data

Penyajian data secara statistik dengan memakai tabel kemudian dihitung persentasenya, data pengujian menggunakan uji *One Way Anova* dengan memakai perangkat lunak SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*). Apabila ternyata dari hasil uji anova ditemukan nilai  $p \leq 0,05$  selanjutnya dilakukan pengujian dengan memakai uji DUNCAN untuk menganalisis antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Selanjutnya hasil analisis dikajikan secara deskriptif kuantitatif.



### 3.6 Alur Penelitian

