

BAB III

METODE PENELITIAN

3. 1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan sepanjang periode Februari hingga Maret tahun 2023. Pertimbangan etis dan pengelolaan hewan percobaan, serta proses ekstraksi etanol dari *Andrographis paniculata* (Burm. fil.), merupakan subjek penelitian yang penting. Daun sambiloto tanaman Nees dianalisis di Laboratorium Biologi yang terletak di dalam Fakultas Sains dan Teknologi UINSU Medan. Laboratorium Herbarium FMIPA-USU berfungsi sebagai fasilitas yang didedikasikan untuk identifikasi tumbuhan. Demikian pula dengan Laboratorium Kimia Organik FMIPA-USU yang digunakan untuk melakukan skrining fitokimia. Proses pengambilan kuantitas serum darah dilakukan di laboratorium patologi klinik RS USU. Selain itu, laboratorium patologi Balai Besar Veteriner Medan digunakan untuk produksi sediaan histologi.

3. 2. Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

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

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
SUMATERA UTARA MEDAN

3.2.2 Bahan

Subyek yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus novergicus* L) strain Galus Wistar dan spesimen *Andrographis paniculata* (Burm.fil.) sebagai bahan percobaan. Bahan-bahan yang diperlukan untuk penelitian ini antara lain ekstrak daun sambiloto, timbal asetat dalam bentuk bubuk, pelet tikus standar, sekam kayu, air suling, etanol 96%, eter, neutral buffered formalin (Nbf), Carboxymethyl Cellulose (CMC), natrium klorida fisiologis (NaCl), hematoxylin-eosin, larutan xyloel, parafin, dan alkohol bergradasi, (70%,80%,90%,100%), ez mont, sampel darah (serum) dan reagen dialet kreatininureum..

3.3. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). CRD terdiri dari lima kelompok, masing-masing dengan lima ulangan:

K(-) : Kontrol Negatif

Diberi makan 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

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 250 mg per kilogram berat badan selama periode hari ke-15 hingga hari ke-28.

P2 : Perlakuan 2

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

P3 : Perlakuan 3

Timbal asetat yaitu $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ diberikan dengan dosis 40 mg/kgBB pada hari ke-1 hingga hari ke-14. Ekstrak etanol daun sambiloto diberikan pada hari ke-15 hingga ke-28 dengan dosis 750 mg per kilogram berat badan.

3. 4. Penentuan Jumlah Sampel

Penentuan besar sampel yang ada pada penelitian ini berdasarkan pada rumus Federar yang dinyatakan sebagai $(n - 1) (t - 1) \geq 15$. Di sini, "n" mewakili jumlah sampel dan "t" mengacu pada jumlah sampel, perlakuan pada masing-masing kelompok. Penelitian ini menggunakan lima perlakuan berbeda, sehingga menghasilkan nilai jumlah sampel (n) 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 diatas dengan menggunakan rumus Federar, di dapatkan nilai dari jumlah sampel yaitu 4,75. Sehingga penulis menetapkan menggunakan 5 hewan coba disetiap kelompok untuk hasil lebih efisien dan maksimal dan total tikus yang digunakan yaitu 25 ekor tikus.

3. 5. Prosedur Kerja

3.5.1. Pengumpulan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari daun segar *Andrographis paniculata* (Burm. fil.) Ness. Daun ini diperoleh langsung dari daerah Sei Mencirim yang terletak di Suka Maju, Kecamatan Sunggal, Kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara..

3.5.2. Pembuatan Ekstrak Ethanol Daun Sambiloto *Andrographis paniculata* (Burm. fil.) Ness

Daun *Andrographis paniculata* (Burm. fil.) Ness dicuci bersih dengan menggunakan air mengalir. Ukuran sampel daun sambiloto yang digunakan untuk prosedur ini adalah sebesar 7 kg. Selanjutnya, dedaunan astringen mengalami proses pengeringan dimana daun dibiarkan mengering secara alami di udara sekitar. Bahan-bahan yang sudah kering dihaluskan dengan menggunakan blender, kemudian diayak hingga

menjadi bubuk simpilia. Serbuk simpilia diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 (200 gram serbuk simpilia dengan 2 liter etanol 96%). Proses ekstraksi dilakukan sebanyak tiga siklus yang masing-masing berlangsung selama 24 jam. Selain itu, campuran simpilia diaduk setiap jam selama enam jam awal masa perendaman. Tahap penyaringan filtrat simpilia dilakukan secara berkala 1 x 24 jam dengan menggunakan kertas sebagai media filtrasi yang dimaksud dengan “regangan” adalah keadaan deformasi atau tegangan yang dialami suatu bahan, hasil maserasi diencerkan dengan CMC Na 1% dan diekstraksi dalam alat penguap putar (rotary evaporator) sehingga diperoleh ekstrak daun sambiloto *Andrographis paniculata* (Burm. fil.) Ness.

3.5.3. Identifikasi Tumbuhan

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

3.5.4 Uji Skrining Fitokimia

3.5.4.1 Pemeriksaan Flavonoid

Larutan ekstrak uji disebarkan secara merata ke dalam tiga tabung reaksi, yang masing-masing tabung berisi 3 ml larutan. Tabung I ditambahkan pereaksi FeCl_3 5 % dengan hasil 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 warna menjadi orange kekuningan.

3.5.4.2 Pemeriksaan Alkaloid

Larutan ekstrak uji diletakkan ke dalam dua tabung reaksi dengan setiap tabungnya berisi 3 ml larutan. Tabung I ditambahkan 2 tetes pereaksi Liebermann-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 menjadi warna endapan putih kekuningan.

3.5.4.3 Pemeriksaan Saponin

Larutan ekstrak uji saponin diletakkan ke dalam tabung reaksi bervolume 3 ml, kemudian dicampur dengan kombinasi Aquades, Alkohol 96%, dan HCl 2N. Campuran yang dihasilkan memberikan hasil negatif. Larutan dikocok kuat-kuat selama 10 menit, dilanjutkan dengan waktu istirahat selama 10 menit. Apabila busa yang dihasilkan pada saat pengadukan berdurasi 10 menit maka dapat disimpulkan kemungkinan adanya senyawa saponin.

3.5.4.4 Pemeriksaan Tanin

Larutan ekstrak uji tanin dicampurkan ke dalam tabung reaksi yang bervolume 3 ml. Kemudian direaksikan dengan larutan FeCl₃ 5%, menghasilkan hasil yang baik. Reaksi uji tanin menunjukkan terbentuknya larutan koloid berwarna hitam.

3.5.4.5 Pemeriksaan Triterpenoid & Steroid

Larutan ekstrak uji diletakkan ke dalam dua tabung reaksi yang mana tiap tabung berisi 3 ml larutan. Tabung I ditambahkan pereaksi Salkowsky dengan hasil positif, reaksi uji terpenoid dan steroid menunjukkan larutan berubah warna menjadi warnamerah, tabung II ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard dengan hasil positif, reaksi uji terpenoid dan steroid menunjukkan larutan berubah menjadi larutan hijaukebiruan.

3.5.5 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini memakai tikus putih jantan strain Wistar (*Rattus norvegicus* L.) dengan berat antara 150-180 gram dan berumur 3 bulan. Sebanyak dua puluh lima ekor Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) jantan strain Wistar dialokasikan ke dalam lima kandang berukuran 40 cm x 60 cm. Setiap kandang menampung lima ekor tikus putih Wistar jantan (*Rattus norvegicus* L.). Tikus putih jantan Wistar (*Rattus norvegicus* L.) menjalani masa aklimatisasi selama satu minggu untuk mengurangi potensi dampak stres terhadap metabolismenya. Penelitian ini mengharuskan tikus

putih Wistar jantan (*Rattus novergicus* L.) memiliki kesehatan yang baik. Pemanfaatan hewan coba telah mendapat izin 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 ($Pb(C_2H_3O_2)_2$)

Induksi timbal asetat ($Pb(C_2H_3O_2)_2$) diberikan sebanyak 40 mg/kg dengan pengenceran menggunakan aquades sebanyak 196 ml. 1 ml larutan stok mengandung konsentrasi timbal asetat ($Pb(C_2H_3O_2)_2$) 0,07 gr yang setara dengan asupan harian yang diterima dari 40 mg/kg. Ketika diberikan kepada tikus dengan berat 150-180 gram. Pemberian timbal asetat ($Pb(C_2H_3O_2)_2$) dilakukan secara oral selama 28 hari pada kontrol positif dan 14 hari pada kelompok perlakuan.

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

Pemberian ekstrak daun sambiloto *Andrographis paniculata* (Burm.fil.) Nees secara oral dilakukan pada hewan uji, dengan dosis yang bervariasi pada setiap kelompok perlakuan. Ekstrak diberikan pada tikus pada perlakuan 1, 2, dan 3 dengan dosis 250, 500, dan 750 mg/kg berat badan (BB) pada hari ke 15 hingga 28. Tikus diberikan secara oral menggunakan spuit yang ditambah dengan alat oral. menguji. Selama prosedur pemberian ekstrak secara oral, probe oral dimasukkan ke dalam rongga mulut tikus dan secara bertahap dimasukkan melalui atap rongga mulut, kemudian mencapai kerongkongan dan akhirnya memasuki lambung. Sebelum memasukkan probe oral, sangat penting untuk memastikan bahwa kepala tikus diposisikan tegak, sehingga memudahkan penyisipan langsung probe oral ke dalam tubuh tikus. Jika proses pemberian oral tidak dijalankan dengan baik. Pengenalan probe oral ke dalam saluran pernapasan telah diamati menyebabkan kematian pada tikus.

3.5.8 Pemeriksaan Kadar Kreatinin dan Ureum Ginjal

Pipet hematokrit digunakan untuk mengumpulkan sampel darah dari tikus melalui vena sinus orbital yang terletak di mata. Vena tersebut terletak di puncak mata dan menyediakan saluran ke daerah posterior bola mata. Benda tersebut mengalami gerakan rotasi, sehingga terjadi pengusiran darah melalui aksi kapiler. Darah diambil dengan menggunakan mikrotube. Sampel darah yang diperoleh dipindahkan secara hati-hati ke dalam tabung sentrifugasi untuk meminimalkan terjadinya hemolisis. Proses sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 3000 putaran per menit (rpm) dengan durasi 10 hingga 15 menit untuk memperoleh serum. Selanjutnya serum dipartisi ke dalam tabung Eppendorf. Pemanfaatan serum digunakan untuk tujuan menganalisis kadar kreatinin serum dan urea (Adewale et al., 2014).

3.5.9 Pembedahan dan Pengamatan Kerusakan Ginjal Secara Makroskopis

Setelah masa terapi selama 28 hari yang diberikan pada hewan uji, dilakukan periode puasa selanjutnya selama 18 jam, setelah itu hewan menjalani prosedur pembedahan. Prosedur pembedahan dilakukan pada hari ke 29. Sebelum diseksi hewan uji, hewan tersebut mengalami dislokasi. Selanjutnya adalah tahap pembedahan dimana tikus dibedah dari bagian abdomen sampai ke rongga dada.

Pengamatan makroskopis ginjal tikus meliputi warna, bentuk, dan konsisten, kriteria ginjal normal yaitu :

- A. Warna ginjal normal berwarna merah kecoklatan
- B. Ginjal normal berbentuk seperti kacang tanah
- C. Ginjal normal memiliki konsistensi yang kenyal

3.5.10 Pembuatan Preparat Histologi Ginjal

Preparat histologi ginjal dilakukan dengan metode parafin dan selanjutnya dilakukan pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE). Proses pewarnaan meliputi tahapan sebagai berikut:

1. Tahap Fiksasi

Sampel organ ginjal dibersihkan terlebih dahulu dengan NaCl fisiologis 0,9%. Setelah itu organ ginjal di potong secara *sagittal* dan difiksasi ke dalam toples berisi larutan NBF 10% selama 24 jam.

2. *Tissue processing*

Pada tahap ini organ ginjal dimasukkan Kembali menggunakan NBF sebanyak 2 kali. Selanjutnya, kadar air di dalam organ diekstraksi menggunakan proses dehidrasi yang melibatkan pengaplikasian alkohol 70% satu kali, diikuti dengan dua putaran alkohol 96% dan dua putaran alkohol 100%. Selanjutnya organ tersebut dilakukan dua siklus pembersihan menggunakan xylol dengan perbandingan 3:1, dan selanjutnya direndam dalam parafin cair sebanyak dua kali. Proses pengeluaran cairan xylol (infiltrasi) biasanya dilakukan sebanyak tiga kali. Tahapan *tissue processing* berlangsung selama 15-16 jam dengan menggunakan alat *tissue processor automatic*.

3. Tahap *Embedding*

Pada tahap ini, ginjal dimasukkan ke dalam blok paraffin kemudian dibiarkan hingga membeku.

4. Tahap *Sectioning*

Organ ginjal yang mengeras ditarik dari kaset dan dipasang pada mikrotom, di mana selanjutnya dipotong dengan ketebalan 10 μ dengan mikrotom. Hasil potongan dimasukkan ke dalam *water bath* untuk ditempatkan diatas *hot plate* untuk menghilangkan paraffin.

5. Tahap *Staining*

Proses ini dilakukan sebelum pewarnaan dimulai dengan perendaman pada xylol I, II, III, masing-masing 5 menit, lalu dehidrasi menggunakan alkohol 70% selama 5 menit kemudian jaringan dicuci dengan air mengalir sampai bersih selama 2 menit. Selanjutnya *nuclear counter staining* menggunakan hemtoksilin selama 5-8 menit kemudian tahap *nuclear counter staining* menggunakan eosin sebanyak 1-2 tetes selama 1-3 menit lalu I dehidrasi, kembali menggunakan alkohol 70% dan alkohol 96% sebanyak 2 kali.

6. Tahap *mounting*

Jaringan yang telah diwarnai kemudian diletakkan pada objek glass lalu direkatkan menggunakan *ez-mount*.

3.5.11 Pengamatan Preparat Histologi

Preparat histologi diamati sesuai dengan metode skoring yang dikemukakan oleh Suhita (2013). Setiap preparat jaringan ginjal diperiksa pada lima lapang pandang dengan perbesaran 400x. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan menyeluruh pada setiap area visual untuk mengidentifikasi perubahan histologis sesuai dengan kriteria yang telah ditentukan. Perubahan histologis yang dilaporkan pada sistem ini meliputi degenerasi tubulus, nekrosis, dan dilatasi tubulus proksimal.

Berikut kriteria ginjal secara mikrokopis berdasarkan metode skoring (Suhita. 2013) :

Skor	Item
0	Tidak terjadi nekrosis inti, degenerasi tubulus, dilatasi tubulusproksimal tiap lapang pandang
1	Ditemukan lesi fokal seperti nekrosis inti, degenerasi tubulus, dilatasi tubulus proksimal tiap lapang pandang.
2	Ditemukan lesi difus (merata) seperti nekrosis inti, degenerasi tubulus, dilatasi tubulus proksimal tiap lapang pandang.

3.6 Analisis Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini dianalisis, khususnya data skoring. Analisisnya menggunakan uji One Way ANOVA yang dilakukan dengan menggunakan alat Statistical Product of Service Solution (SPSS). Selain itu analisisnya meliputi pemeriksaan data kreatinin dan ureum. Jika terdapat perbedaan yang signifikan, langkah selanjutnya adalah melakukan uji Duncan.

3.7 Skema Penelitian

