

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis atau Rancangan Penelitian

Rancangan pada penelitian ini adalah eksperimental. Hewan uji yang digunakan adalah mencit betina (*Mus musculus*) dan metode yang digunakan yaitu OECD 425 *Up and Down Procedure* yang terdiri dari *limit test* dan *main test*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Farmakologi STIKES Borneo Lestari pada bulan Januari – April 2022.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas, spuit, sonde oral, *stopwatch*, thermometer, timbangan analitik, *waterbath*, *rotary evaporator* (IKA RV 10), kandang mencit, sarung tangan, dan masker.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah simplisia daun kersen (*Muntingia calabura L*) yang diperoleh dari BanjarBaru, Kalimantan Selatan, aquadest, Na-CmC, dan larutan etanol 70%.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

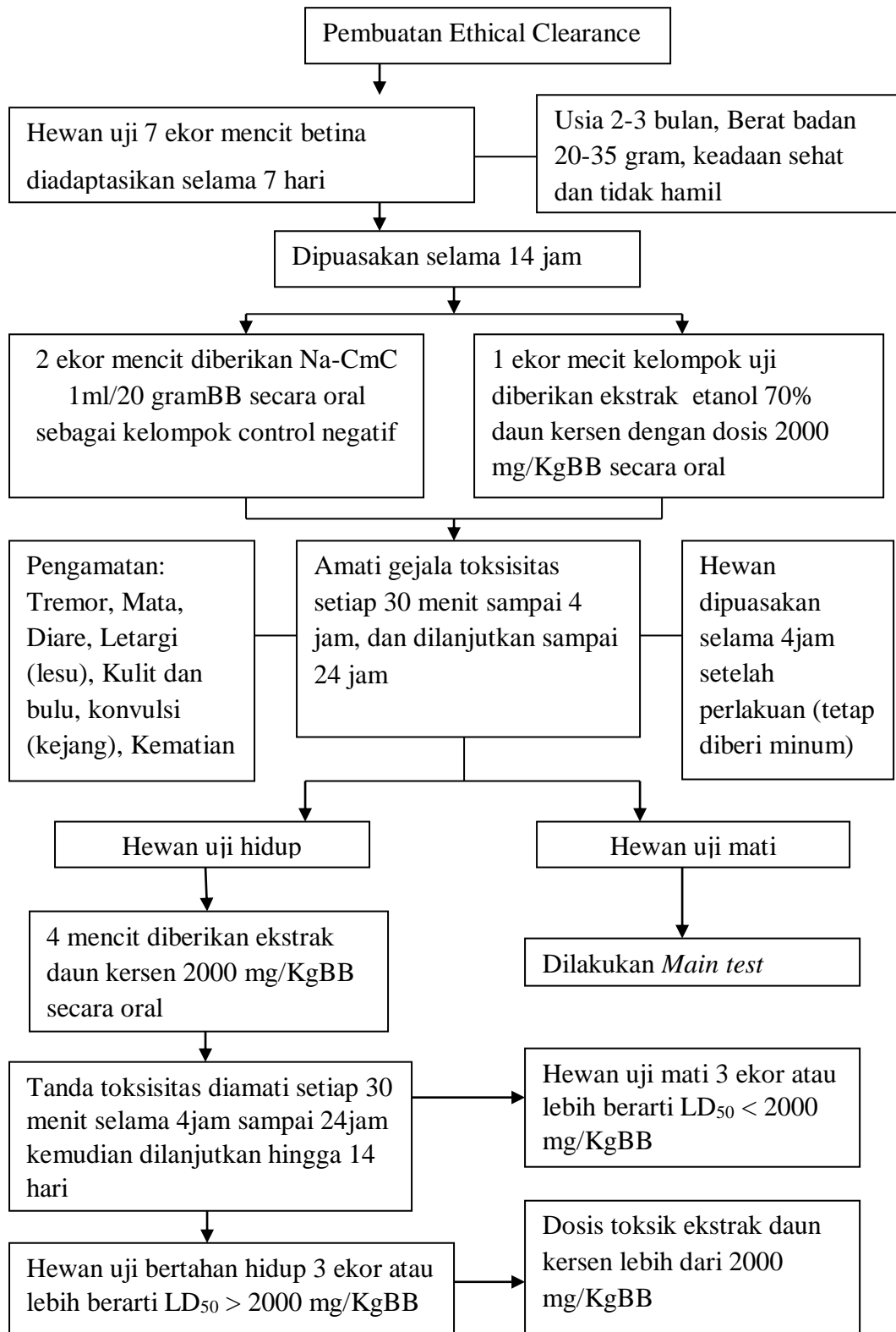
Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis ekstrak etanol 70% daun kersen (*Muntingia calabura L*).

2. Variabel Terikat

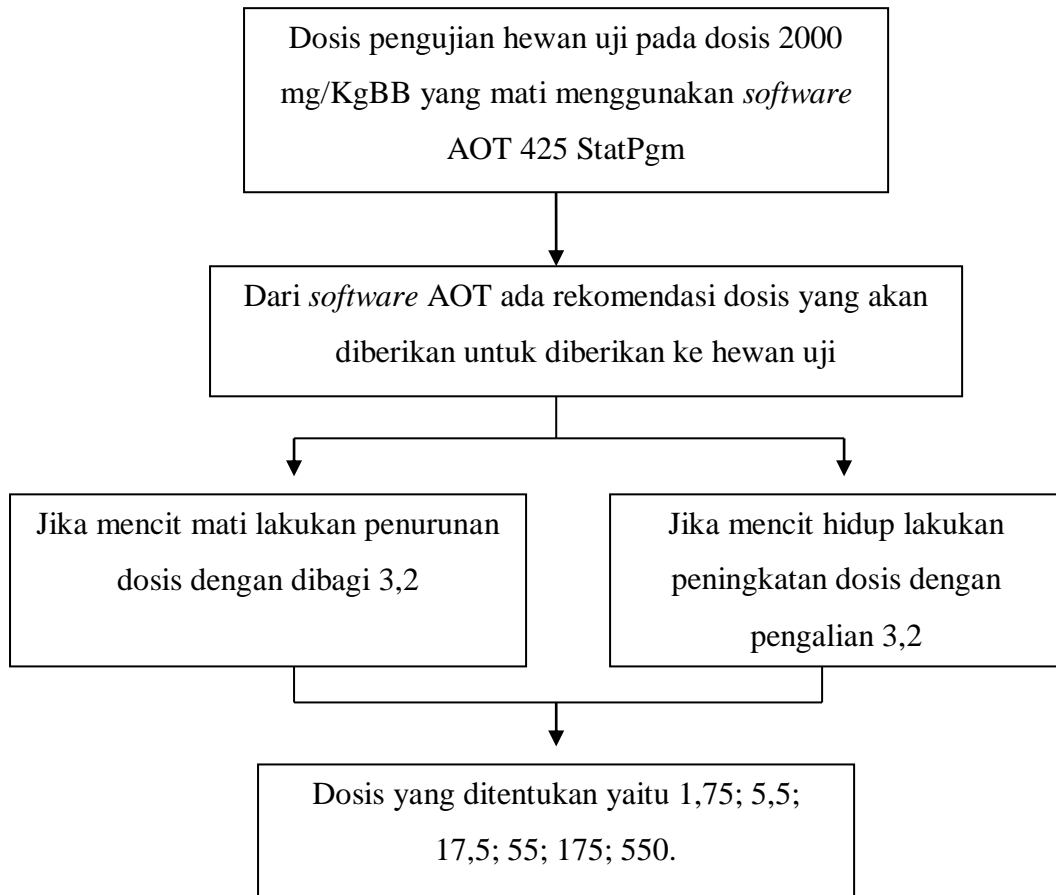
Variabel terikat pada penelitian ini adalah gejala toksik seperti kulit dan bulu, mata, diare, tremor, letargi, konvulsi, dan nilai LD₅₀ berdasarkan jumlah kematian hewan uji dan berat badan hewan uji.

E. Kerangka Konsep

1. Limit Test



2. Main Test



F. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan *Ethical Clearance*

Pembuatan surat keterangan kelayakan etik dilakukan dengan mengikuti Bagan Alur Permohonan Surat Kelayakan Etik (*Ethical Approval*) pada Komite Etik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru. Hasil untuk mengetahui apakah layak etik atau tidak penelitian tersebut.

2. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru. Tujuan dari determinasi adalah untuk mengetahui kebenaran identitas tanaman dengan benar yang akan diteliti dan menghindari kesalahan dari pengumpulan bahan utama penelitian.

3. Pembuatan Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura L*)

Bahan utama yang digunakan adalah daun kersen (*Muntingia calabura L*) yang diperoleh di Banjarbaru, Kalimantan Selatan. Tahap pertama daun kersen (*Muntingia calabura L*) dicuci dengan air mengalir untuk membersihkan dari kotoran, daun yang sudah bersih selanjutnya dirajang dan kemudian di keringkan tanpa terkena sinar matahari langsung. Setelah kering daun kersen di sortasi kering untuk memisahkan kotoran yang kemungkinan masih ada. Kemudian simplisia dihaluskan dengan cara di blender. Simplisia yang sudah

dihaluskan kemudian di ekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:3 selama 24 jam sambil sesekali diaduk. Filtrat yang diperoleh ditampung dan ampas dimaserasi kembali sebanyak dua kali menggunakan metode serta pelarut yang sama. Ekstrak etanol yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C kemudian diuapkan menggunakan *waterbath* untuk memperoleh ekstrak kental sampai bobot tetap (Fauziah *et al.*, 2018). Selanjutnya dilakukan perhitungan persen rendemen ekstrak, yaitu :

$$\% \text{ Rendemen} : \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh}}{\text{Bobot simplisia yang diekstraksi}} \times 100\%$$

Rendemen merupakan perbandingan berat ekstrak yang dihasilkan dengan berat simplisia sebagai bahan baku. Perhitungan rendemen ekstrak dilakukan untuk menentukan perbandingan jumlah ekstrak yang dihasilkan dari suatu bahan terhadap awal berat bahan simplisia serta untuk mengetahui banyaknya senyawa bioaktif yang terkandung dalam bahan yang terekstraksi (Sani *et al.*, 2014).

4. Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit putih betina yang berjumlah 7 ekor (2 ekor untuk kontrol negatif dan 5 ekor untuk pengujian toksisitas), dengan usia 2- 3 bulan, berat badan 20-35 gram yang sudah diadaptasikan, dan mencit dalam keadaan sehat dan tidak hamil. Hewan dipelihara dalam kandang yang terbuat dari material yang kedap air, kuat, dan mudah dibersihkan, ruang

pemeliharaan bebas dari kebisingan. Luas kandang minimal 80cm² dan tinggi kandang minimal 15cm, kandang dapat dibuat dengan bak plastik dan ditutup dengan kawat berlubang, kemudian ditempatkan pada lemari khusus. Hewan diberi pakan yang sesuai standar laboratorium yaitu BR2 dan diberikan dengan takaran yang sama pada setiap hewan uji (BPOM, 2014).

5. Dosis Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura L*)

Dosis ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura L*) yang digunakan untuk *limit test* pada penelitian ini adalah 2000 mg/KgBB diberikan dalam bentuk tunggal secara oral. Penggunaan dosis selanjutnya tergantung hasil yang didapat dari *limit test* (OECD, 2001). Jika dalam waktu 24 jam hewan mati maka *limit test* dihentikan dan dilanjutkan dengan *main test*, tetapi jika hewan masih hidup maka 4 mencit lainnya diberikan ekstrak etanol 70% daun kersen 2000 mg/KgBB dan pengamatan dilanjutkan maksimal 14 hari (OECD, 2008). Jika hewan uji yang mati sebanyak 3 atau lebih maka dilakukan *main test* dan jika hewan uji yang bertahan hidup sebanyak 3 atau lebih maka dosis toksisitas ekstrak daun kersen lebih dari 2000 mg/KgBB.

6. Pembuatan Kontrol Negatif

Larutan kontrol negatif yang digunakan adalah larutan Na-CmC 0,5% yang diberikan secara oral dengan volume 1 ml/20 gramBB. Pembuatan Na-CmC 0,5% yaitu dengan melarutkan Na-CmC serbuk

sebanyak 0,5 gram ke dalam 100 ml aquadest dengan bantuan pemanasan diatas *hot plate*.

7. Pembuatan Larutan Stok

Penetapan volume oral pada penelitian ini adalah 1 ml/20 gramBB. Larutan stok yang dibuat adalah sebanyak 10ml, larutan stok untuk Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura L*) adalah sebesar 40 mg/20 gramBB. Dosis 40 mg/20 gramBB setara dengan 40 mg/1 ml larutan stok. Sehingga bobot yang dilarutkan dalam 10 ml Na-CmC adalah 400 mg.

8. Pengujian Toksisitas Dengan Metode OECD 425

Hewan uji yang digunakan adalah mencit betina nulipara dan tidak hamil dengan berat badan 20- 35 gram yang berumur 2- 3 bulan. Mencit betina dipuasakan selama 14 jam kemudian sebelum dilakukan perlakuan mencit ditimbang untuk menentukan volume pemberian. Mencit dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol negatif dan kelompok uji (Yazid & Aznam, 2018). Kelompok kontrol yang terdiri dari dua mencit diberi larutan Na-CmC dengan volume 1ml secara oral dan pada kelompok uji yang terdiri dari lima mencit, pengamatan dimulai dari satu ekor mencit yang diberikan ekstrak etanol 70% daun kersen dengan dosis 2000 mg/KgBB. Setelah perlakuan, mencit kemudian dipuasakan kembali selama 4 jam dan boleh diberi minum. Pengamatan dilakukan selama 30 menit pertama setelah perlakuan dan diamati secara berkala selama 4 jam pertama, 8

jam, 20 jam, dan 24 jam tanda dan gejala toksisitas yang diamati seperti diare, tremor, letargi (kelesuan), konvulsi (kejang) dan kematian pada hewan uji. Jika dalam 24 jam hewan masih hidup maka 4 mencit lainnya diberikan ekstrak etanol 70% daun kersen 2000 mg/KgBB dan pengamatan dilanjutkan maksimal 14 hari (OECD, 2008). Jika hewan uji yang mati sebanyak 3 atau lebih maka dilakukan *main test* dan jika hewan uji bertahan hidup sebanyak 3 atau lebih maka dosis toksisitas ekstrak daun kersen lebih dari 2000 mg/KgBB (OECD, 2008). *Main test* dilakukan dengan cara memberikan dosis zat aktif pada seekor mencit dari 4 hewan uji berikutnya. Dosis 2000 mg/KgBB dimasukkan pada *software* AOT 425 StatPgm. Faktor perkembangan dosis yang digunakan menurut OECD (2008) adalah pengalihan atau pembagian 3,2. Dosis dipilih dari urutan berikut: 1,75; 5,5; 17,5; 55; 175; 550; 2000. Hewan uji pertama diberikan dosis *main test* yang paling rendah yaitu 1,75. Kemudian jika hewan uji hidup maka dosisnya dilanjutkan sesuai dengan urutan dosis yang ditentukan yaitu 5,5. Jika hewan uji masih hidup maka ditingkatkan lagi dengan dosis 17,5. Jika hewan uji mati pada dosis 17,5 maka dosis diturunkan sesuai dengan urutan yang telah ditentukan yaitu 5,5. Untuk hewan uji selanjutnya dilanjutkan dengan dosis perlakuan pada hewan uji yang hidup kemudian diamati selama 14 hari. *Main test* dihentikan jika hewan uji bertahan hidup 3 ekor atau lebih yang berarti nilai LD₅₀

>5,5 mg/KgBB. Apabila hewan uji mati 3 ekor atau lebih maka LD₅₀ <5,5 mg/KgBB (OECD, 2008).

Apabila tidak ada tanda toksisitas pada dua kelompok selama 48 jam dua hari berikutnya pengujian toksisitas ekstrak etanol 70% daun kersen dilanjutkan pada empat mencit dengan dosis yang sama dan bisa diamati kembali tanda toksisitasnya setiap hari sampai hari ke 14. Selanjutnya data bobot mencit yang diperoleh diolah secara statistik menggunakan SPSS *for Windows* dan penentuan LD₅₀ diamati dengan AOT 425StatPgm. Menurut penggolongan sediaan uji BPOM (2014) semakin kecil nilai LD₅₀ semakin toksik senyawa tersebut, dan semakin besar nilai LD₅₀ semakin rendah toksisitasnya.

G. Analisis Data

Data yang diperoleh berupa data kuantitatif dan kualitatif. Data kualitatif berupa gejala toksisitas akut yang terjadi pada hewan uji yaitu meliputi tremor, diare, kulit dan bulu, *letargi*, *konvulsi* atau kejang, mata, dan kematian. Data kuantitatif meliputi jumlah hewan uji yang mati dan berat badan hewan uji sebelum, sesudah hari ke 7, dan hari ke 14 setelah dilakukan perlakuan. Pengamatan gejala pada hewan uji yaitu dengan membandingkan tingkah laku mencit kelompok negatif dengan mencit kelompok uji. Analisis data dilakukan dengan cara menghitung selisih berat badan hari ke 0 dan hari ke 14, kemudian data tersebut dianalisis menggunakan aplikasi SPSS *for windows*. Uji yang digunakan adalah uji normalitas dan uji homogenitas. Jika kedua nilai sig terdistribusi normal

(>0,05) maka selanjutnya dianalisa menggunakan uji parametrik yaitu uji Anova. Namun apabila jika tidak memenuhi persyaratan tes normalitas ataupun tes homogenitas, maka dilanjutkan dengan uji non parametrik. Perhitungan nilai LD₅₀ menggunakan *software* AOT 425 StatPgm. Dosis yang digunakan pada perlakuan dimasukkan ke dalam software untuk mengetahui nilai LD₅₀.