

BAB III

METODE PENELITIAN

1.1. Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan pada rancangan penelitian ini adalah metode eksperimental *in vivo* yang bertujuan untuk menguji efek toksik pada ekstrak kulit batang Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) terhadap tikus betina galur wistar dengan metode OECD 425 dengan parameter darah dan berat indeks organ.

1.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian toksisitas akut ekstrak Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) terhadap tikus galuh wistar dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Farmakologi Toksikologi Universitas Borneo Lestari pada bulan Januari – Mei 2024.

1.3. *Ethical Clearance*

Pembuatan surat keterangan kelayakan etik dilakukan dengan mengikuti Bagan Alir Permohonan Surat Kelayakan Etik (*Ethical Approval*) dengan Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Banjarmasin.

1.4. Variabel Penelitian

1. **Variabel Bebas** : Dosis ekstrak kulit batang Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.).
2. **Variabel Terikat** : Parameter hematologi dan biokimia darah serta penimbangan berat indeks organ hewan uji

1.5. Prosedur Penelitian

1.5.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas laboratorium, kandang tikus, sonde oral, *stopwatch*, timbangan analitik, termometer, masker, *rotary evaporator*, alat-alat bedah, *waterbath*, sarung tangan spuit cc *onemed*, sarung tangan latex, tabung edta.

1.5.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Simplisia kulit batang Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) yang diperoleh dari kota Barabai, Kalimantan Selatan dan larutan etanol 70%.

1.6. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus betina galur wistar berjumlah 10 ekor, 5 ekor digunakan untuk perlakuan dan 5 ekor untuk kontrol negatif, dengan usia 8 sampai 12

minggu, berat badan 200 ± 40 gram, dan tikus dalam keadaan sehat. Sebelum perlakuan hewan uji diaklimatisasi terlebih dahulu selama 5 – 7 hari. Seluruh hewan uji yang digunakan harus ditentukan nilai normal terhadap parameter yang akan diujikan. Ruangan yang digunakan untuk pengujian yaitu suhu ruangan diatur menjadi $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, dengan kelembaban relative 30% – 70%, dan penerangan 12 jam terang 12 jam gelap. Hewan dipelihara dalam kandang yang terbuat dari material yang kedap air, kuat dan mudah dibersihkan, ruang pemeliharaan bebas dari kebisingan. Luas area kandang per ekor hewan mengacu pada *Committee for the Update of the Guide for the care and Use of Laboratory Animals by National Reseach Council Amerika Serikat* (2011) (BPOM, 2022).

a) Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Tikus galur wistar
2. Jenis kelamin betina
3. Berat badan 200 ± 40 gram
4. Usia 8-12 minggu
5. Tingkah laku dan aktivitas normal
6. Tikus dalam keadaan sehat

b) Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi yang tidak digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Tikus betina dalam keadaan hamil
2. Tikus yang sakit pada saat sebelum penelitian
3. Tikus yang mati pada saat sebelum penelitian

1.7. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Fakultas Matematika dan Ilmu Pengatahuan Alam (FMIPA) di Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan sesuai dan tidak adanya kesalahan pada saat pengambilan sampel.

1.8. Pembuatan Simplisia

Kulit batang Tandui diambil dari kota Barabai Kalimantan Selatan sebanyak yang diperlukan, Setelah disortasi basah dan dicuci dengan air mengalir, kulit batang Tandui dipotong kecil-kecil dan dikeringkan di bawah sinar matahari dan ditutup dengan kain hitam sampai kering. Setelah kering, kulit batang Tandui diblender sampai menjadi serbuk, dan kemudian diayak dengan mesh 40 dan disimpan dalam wadah tertutup (Rachman, 2018).

$$\text{Randemen Simplisia} = \frac{\text{Bobot akhir simplisia}}{\text{Bobot awal simplisia}} \times 100\%$$

1.9. Ekstraksi

Serbuk kering kulit batang Tandui diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan etanol 70%. Simplisia ditimbang sebanyak 200 gram, kemudian dimasukkan ke dalam bejana maserasi dan ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 1L. Ekstraksi simplisia selama 24 jam, dan dilakukan remaserasi selama dua kali dengan prosedur dan jumlah pelarut yang sama. kemudian ekstrak disaring hingga menghasilkan filtrat, lalu pekatkan ekstrak kulit batang Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kemudian diuapkan di atas *waterbath* pada suhu 50°C sampai didapatkan bobot tetap ekstrak yang ditimbang sebanyak dua kali dan hasil perbedaan penimbangan tidak melebihi 0,5 mg dengan timbangan analitik (Saputri *et al.*, 2023). Selanjutnya dilakukan perhitungan persen rendemen ekstrak, yaitu:

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

1.10. Skrining Fitokimia Kulit Batang Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.)

Skrining Fitokimia yang akan dilakukan yaitu alkaloid, fenol, flavpnoid, saponin, steroid terpenoid, dan tanin. Uji Metabolit Sekunder (Syahrian *et al.*, 2022).

1.10.1. Identifikasi Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram sampel dicampur dengan sepuluh mililiter etanol, kemudian ditambahkan lima tetes asam klorida 2 N. Setelah dipanaskan, didinginkan, dan disaring, sampel dibagi menjadi tiga tabung reaksi, masing-masing mengandung pereaksi. Jika pereaksi Mayer ditambahkan, positif mengandung alkaloid yang membentuk endapan putih atau kuning; jika pereaksi Wagner ditambahkan, positif mengandung alkaloid yang membentuk endapan coklat; dan jika pereaksi Dragendrof ditambahkan, positif mengandung alkaloid yang membentuk endapan jingga.

1.10.2. Identifikasi Fenol

Sebanyak 0,5 gram ekstrak kental dilarutkan dalam 5 ml *aquadest*, kemudian ditambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 1%. Indikator positif dari uji fenol adalah terbentuknya warna biru kehitaman.

1.10.3. Identifikasi Flavonoid

Sampel sebanyak 1 gram ditambahkan 10 ml air panas, didihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas, filtrat yang diperoleh kemudian diambil 5 ml lalu ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah dan diperhatikan warna yang terbentuk pada lapisan amil alkohol.

1.10.4. Identifikasi Saponin

Dalam penangas air, 0,5 gram didihkan dengan 9 ml air. Setelah mengocok filtrat, tambahkan dua tetes HCl 2N hingga terbentuk busa (busa tidak hilang selama tujuh menit), yang menunjukkan adanya saponin.

1.10.5. Identifikasi Steroid/Triterpenoid

Dalam reaksi Liberman Buchard, 0,5 gram sampel dilarutkan dengan lima mililiter kloroform, dua mililiter asam sulfat pekat, dan dua mililiter asam asetat anhidrat. Warna yang berubah menjadi biru atau hijau menunjukkan adanya steroid, sedangkan warna yang berubah menjadi merah atau ungu menunjukkan adanya triterpenoid.

1.10.6. Identifikasi Tanin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak didihkan dengan 10 ml etanol 70% lalu disaring, kemudian ditambahkan beberapa tetes FeCl₃ 1% terbentuknya warna coklat kehijauan atau biru kehitaman menunjukkan adanya tanin.

1.11. Dosis

Dosis yang digunakan untuk *limit test* pada penelitian ekstrak kulit batang Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) ini adalah 2000mg/kgBB yang diberikan secara oral. Penggunaan dosis

selanjutnya tergantung hasil yang didapat dari *limit test* untuk dilanjutkan ke *main test*.

1.12. Pembuatan Larutan Stok

Penetapan volume pemberian untuk hewan uji tikus yaitu 1ml/200gBB. Larutan stok yang akan dibuat untuk ekstrak kulit batang Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) sebanyak 10ml. Larutan stok untuk ekstrak adalah dosis pada hewan uji sebesar 400mg/200gramBB setara dengan 400ml/1ml. Sehingga bobot yang dilarutkan dalam 10ml Na-CMC adalah 400mg.

1.13. Pembuatan Kontrol Negatif Na-CMC

Ditimbang 0,5 gram Na-CMC kemudian dilarutkan dalam gelas beker yang berisi 10 ml aquadest yang telah dipanaskan dan didiamkan selama 15 menit. Kemudian, larutan Na-CMC dipindahkan ke labu ukur dan ditambahkan aquadest hingga 100 mililiter larutan stok Na-CMC (Marcedes, 2017).

1.14. Prosedur Penelitian Uji Toksisitas Akut

Prosedur penelitian pada ekstrak kulit batang Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) terhadap tikus galur wistar menggunakan metode OECD 425 yang terdiri dari *limit test* dan *main test*. Tikus betina biasanya digunakan karena sedikit lebih sensitif dibandingkan tikus jantan.. Hewan uji diaklimatisasi untuk proses

adaptasi sedikitnya 5 hari sebelum dilakukan pengujian, dimana adaptasi dilakukan dengan mengkondisikan lingkungan yang bersih, hewan dipelihara dalam kandang dengan ukuran yang sesuai dengan pedoman BPOM (2014) yaitu seluas 148 cm² dan tinggi 17,8 cm yang cukup kuat dan mudah dibersihkan, 1 kandang diisi dengan 1 ekor tikus. Kandang diletakkan di ruangan tidak bising, mendapat cukup sinar matahari dengan siklus masing-masing 12 jam gelap dan terang, bebas dari asap dan polutan lainnya, serta sirkulasi udara yang baik, bagian atas kandang ditutup dengan kawat. Selanjutnya hewan uji dipuaskan selama 14-18 jam, tetapi untuk air minum boleh diberikan, setelah dipuaskan hewan uji ditimbang terlebih dahulu sebelum dilakukan pengujian, pemberian ekstrak kulit batang Tandui dalam dosis tunggal dengan menggunakan sonde. Pada *limit test* diberikan 2000 mg/kgBB secara oral. Setelah perlakuan boleh diberikan pakan setelah 3-4 jam (BPOM 2014).

Pengamatan dilakukan selama 30 menit pertama setelah perlakuan, kemudian dilanjutkan terutama selama 4 jam pertama selama 24 jam pertama dan sekali sehari selama 14 hari. Perhatikan tanda-tanda toksisitas seperti kulit, bulu, mata, selaput lendir, dan saluran pernapasan. Selain itu, amati pada hewan yang di uji untuk mengetahui adanya tremor, kejang, air liur, diare, kematian. Pada kurun waktu 24 jam hewan mati maka *limit test* dihentikan dan

dilanjutkan dengan *main test*, namun apabila hewan uji bertahan hidup maka dilanjutkan menggunakan 4 hewan uji lainnya, diamati satu kali sehari selama 14 hari. Jika dari lima hewan uji hidup sebanyak tiga ekor 3 atau lebih maka dosis toksik dari senyawa tersebut lebih dari 2000 mg/kgBB (BPOM, 2022).

1.15. Pengorbanan Hewan Uji

Kematian hewan tidak dipersyaratkan sebagai parameter akhir yang mutlak harus dicapai hewan dalam uji toksisitas. Hewan yang menunjukkan indikasi rasa nyeri, sakit dan distress dapat dikorbankan lebih dini (tanpa menunggu kematian) sesuai prinsip kesejahteraan hewan (*humane endpoint*). Pedoman OECD dapat digunakan sebagai acuan menentukan kondisi tersebut. Hewan yang dikorbankan dalam kondisi tersebut dihitung sebagai hewan mati yang berkaitan dengan pemberian sediaan uji. Prinsip Eutanasia yang dimana Sebelum hewan uji dikorbankan, dilakukan anestesi terlebih dahulu. Hewan dipegang secara hati-hati tanpa menimbulkan rasa takut, lalu hewan dikorbankan dengan salah satu teknik di tempat terpisah dari hewan lain, dan dijaga agar tidak ada hewan hidup disekitarnya (BPOM, 2022).

1.16. Pengukuran Hematologi

Secara umum, prosedur ini dilakukan, tetapi dapat disesuaikan dengan petunjuk produsen prosedur. Darah diambil dari jantung dengan

menggunakan spuit cc. Sampel dapat diperoleh dari jantung sebanyak 0,5 cc dan ditambahkan antikoagulan EDTA-2K (*Ethylendiamine Tetra-Acetic Acid, 2K salt.*) 5% sebanyak 10 μ L. Selanjutnya darah diperiksa menggunakan alat Hematoanalyzer sesuai dengan kebutuhan data yang diperlukan (BPOM, 2022).

Tabel 1. Nilai normal parameter biokimia (BPOM, 2022).

| No. | Biokimia | Nilai Normal |
|-----|-----------|----------------|
| 1 | SGOT | (20,8 – 470,2) |
| 2 | SGPT | (2,1-426,9) |
| 3 | Kreatinin | (0,2 – 1,2) |

1.17. Pengukuran Biokimia

Sejumlah 100 μ L serum uji direaksikan dengan 1000 μ L pereaksi uji untuk pemeriksaan SGOT di dalam tabung reaksi 5 mL dihomogenkan dengan bantuan vortex. Absorbansinya diukur dengan spektrofotometer pada suhu 37°C tepat setelah menit ke 1, 2, dan 3 pada panjang gelombang 340 nm. Hal yang sama dilakukan terhadap blangko (pereaksi + aquades) (BPOM, 2022). Sejumlah 100 μ L serum uji direaksikan dengan 1000 μ L pereaksi uji untuk pemeriksaan SGPT dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada suhu 37°C tepat setelah menit ke 1, 2, dan 3 pada panjang gelombang 340 nm. Hal

yang sama dilakukan terhadap blangko (pereaksi +aquades) (BPOM, 2022).

Sejumlah 50 μ L serum uji direaksikan dengan 1000 μ L pereaksi uji untuk pemeriksaan kreatinin dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada suhu 37°C tepat setelah 60 detik pada panjang gelombang 492 nm (A1), diukur lagi absorbansi tepat setelah 120 detik (A2). Hal yang sama dilakukan terhadap blangko (pereaksi + aquades) dan standar (pereaksi + standar kreatinin). Kadar kreatinin dapat dihitung dengan membandingkan absorbansi sampel dengan absorbansi kreatinin standar yang dikalikan dengan konsentrasi kreatinin standar (BPOM, 2022).

Tabel 2. Nilai normal parameter biokimia (BPOM, 2022).

| No. | Biokimia | Nilai Normal |
|-----|-----------|----------------|
| 1 | SGOT | (20,8 – 470,2) |
| 2 | SGPT | (2,1-426,9) |
| 3 | Kreatinin | (0,2 – 1,2) |

1.18. Pengukuran Indeks Organ

Untuk menentukan berat organ secara keseluruhan, organ harus terlebih dahulu dikeringkan dengan kertas penyerap sebelum ditimbang. Hati, limpa, jantung, ginjal, dan paru-paru adalah lima organ

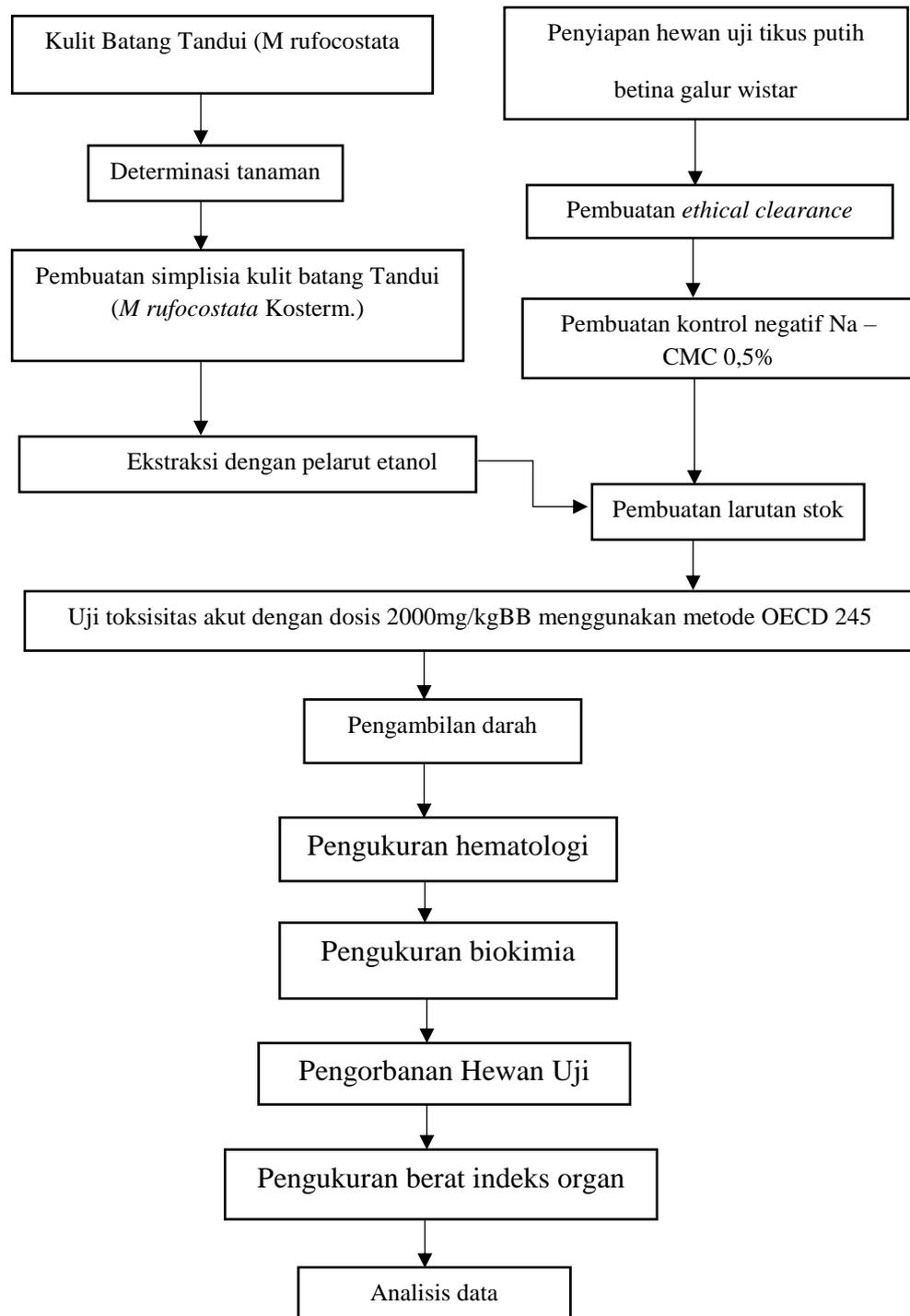
utama yang ditimbang (BPOM, 2022). Bobot organ relatif dapat diperoleh dengan rumus berikut:

$$\text{Bobot organ relatif} = \frac{\text{Bobot organ absolut}}{\text{Bobot badan}} \times 100\%$$

1.19. Pengumpulan Data Toksisitas Akut

Hasil penelitian dipelajari untuk mengetahui apakah pemberian bahan uji berdampak pada parameter hematologi, biokimia, dan indeks berat organ. Perhitungan parameter darah dan dirata-ratakan dan dilihat perbandingan apakah terdapat perbedaan nilai pada parameter darah hewan uji kemudian di analisis menggunakan SPSS. Analisis yang dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas, jika nilai sig nya $>0,05$ maka selanjutnya dilakukan analisis uji t *independent* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan bermakna antara tikus yang diberikan perlakuan terhadap tikus kontrol negatif setelah 14 hari, apabila terdapat nilai sig $<0,05$ pada uji normalitas atau homogenitas maka dilakukan uji *mann whitney*. Perhitungan menggunakan *software* AOT 426 StartPgm.

1.20. Alur Penelitian



Gambar 1. Alur Penelitian

