

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Metode yang diterapkan dalam studi ini ialah eksperimen in vivo guna menguji efek toksik ekstrak kulit batang Tandui pada tikus betina galur Wistar dengan memakai metode OECD 425.

#### **3.2 Waktu serta Tempat Penelitian**

Studi toksisitas akut ekstrak Tandui pada tikus galur Wistar dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam serta Laboratorium Farmakologi Toksikologi Universitas Borneo Lestari antar Januari hingga Juni 2024.

#### **3.3 *Ethical Clearance***

Pembuatan surat keterangan kelayakan etik mengikuti Bagan Alir Permohonan Surat Kelayakan Etik (Ethical Approval) dari Komite Etik Universitas Muhammadiyah Banjarmasin, Kalimantan Selatan.

#### **3.4 Variabel Penelitian**

- a. **Variabel Bebas:** Dosis 2000mg/kgBB ekstrak kulit batang Tandui .
- b. **Variabel terikat:** Gejala toksik, LD<sub>50</sub> serta berat badan hewan uji.

### **3.5 Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1 Alat serta Bahan Penelitian**

##### **a. Alat Penelitian**

Alat yang dipakai meliputi gelas beker, kandang tikus, sonde oral, stopwatch, timbangan analitik, termometer, masker, rotary evaporator, labu ukur, waterbath, serta sarung tangan.

##### **b. Bahan Penelitian**

Bahan yang dipakai meliputi simplisia kulit batang Tandui dari Barabai, Kalimantan Selatan serta larutan etanol 70%.

#### **3.5.2 Hewan Uji**

Hewan uji studi ini ialah 10 ekor tikus betina galur wistar, dibagi menjadi 5 ekor guna perlakuan serta 5 ekor guna kontrol negatif. Usia hewan 8–12 minggu dengan berat badan  $200 \pm 40$  gram serta dalam keadaan sehat. Sebelum perlakuan, hewan diaklimatisasi selama 5–7 hari. Semua hewan uji wajib menginterpretasikan nilai normal guna parameter yang diuji. Ruang uji diatur pada suhu  $22^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{C}$ , kelembaban relatif 30–70%, serta penerangan 12 jam terang serta 12 jam gelap. Hewan dipelihara dalam kandang kedap air yang kuat, mudah dibersihkan, serta lingkungan tanpa kebisingan, dengan luas area selaras pedoman Committee for the Update of the Guide for the Care and Use

of Laboratory Animals National Research Council Amerika Serikat(2011)(BPOM,2020).

**a. Kriteria Inklusi**

Kriteria inklusi studi ini ialah:

1. Tikus Galur Wistar
2. Jenis kelamin betina
3. Berat badan 160-240 gram
4. Usia 8 – 12 minggu
5. Tingkah laku serta aktivitas normal
6. Tikus dalam keadaan sehat

**b. Kriteria Eksklusi**

Kriteria eksklusi yang tidak dipakai dalam studi ini ialah:

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

**3.5.3 Determinasi Tanaman**

Determinasi tanaman dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Matematika serta Ilmu Pengetahuan Alam(FMIPA), Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru guna memastikan kecocokan tanaman serta menghindari kesalahan saat pengambilan sampel.

### 3.5.4 Pembuatan Simplisia

Kulit batang Tandui yang diambil dari Barabai, Kalimantan Selatan, disortasi basah serta dicuci dengan air mengalir. Lalu, kulit batang dipotong kecil-kecil serta dikeringkan di bawah sinar matahari. Simplisia kering yang diperoleh lalu digiling memakai blender guna memperbesar kontak partikel dengan pelarut, hingga penyarian lebih efektif. Selanjutnya, perhitungan rendemen simplisia yaitu:

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

### 3.5.5 Pembuatan Ekstrak

Serbuk kering kulit batang Tandui diekstraksi dengan metode maserasi memakai etanol 70%. Sejumlah 200 gram simplisia ditimbang, dimasukkan ke dalam bejana maserasi, serta ditambahkan etanol 70% sejumlah 1 liter. Ekstraksi dilaksanakan selama 24 jam, diikuti dengan remaserasi dua kali memakai prosedur serta jumlah pelarut yang sama (Syahrian, 2022). Pasca penyaringan, ekstrak pekat diperoleh dengan memakai rotary evaporator pada suhu 40°C. Ekstrak selanjutnya diuapkan di waterbath pada suhu 50°C hingga meraih bobot tetap, yang ditimbang dua kali dengan selisih tidak melebihi 0,5 mg (Saputri et al., 2023). Lalu, dilaksanakan perhitungan persen rendemen ekstrak, yaitu:

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

### **3.5.6 Dosis**

Dosis yang dipakai dalam limit test studi ekstrak kulit batang Tandui ialah 2000 mg/kg BB secara oral. Dosis selanjutnya ditentukan merujuk hasil limit test guna melanjutkan ke main test.

### **3.5.7 Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Kulit Batang Tandui(*Mangifera rufocostata* Kosterm.)**

Volume pemberian guna hewan uji tikus ialah 1 ml/200 g BB. Larutan stok ekstrak kulit batang Tandui yang disiapkan sejumlah 10 ml. Larutan stok ini mengandung dosis 400 mg/200 g BB, setara dengan 400 mg dalam 10 ml Na-CMC.

### **3.5.8 Pembuatan Kontrol Negatif Na-CMC 0,5%**

Sejumlah 0,5 g Na-CMC ditimbang serta dilarutkan dalam 10 mL aquadest yang telah dipanaskan. Pasca didiamkan selama 15 menit, larutan Na-CMC dipindahkan ke dalam labu ukur serta volume ditambah aquadest hingga 100 mL. (Marcedes, 2017).

### **3.5.9 Skrining Fitokimia**

#### **a. Alkaloid**

Sejumlah 0,5 gram ekstrak kental dilarutkan dalam 5 mL aquadest serta HCL 2N di tabung reaksi, lalu dipanaskan selama 2 menit serta didinginkan. Filtrat sejumlah 3 tetes ditambahkan

dengan reagen. Reagen Mayer menghasilkan endapan putih bila terlihat alkaloid; reagen Wagner menghasilkan endapan coklat bila positif alkaloid; serta reagen Dragendorff menghasilkan endapan jingga ataupun merah bila mengandung alkaloid(Pertiwi et al.,2022).

**b. Fenol**

Sejumlah 0,5 gram ekstrak kental dilarutkan dalam 5 mL aquadest, lalu ditambahkan 3 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  1%. Uji fenol dikatakan positif bila terbentuk warna biru kehitaman(Akasia et al.,2021).

**c. Flavonoid**

Sejumlah 0,5 gram ekstrak kental dilarutkan dalam 5 mL aquadest di tabung reaksi, ditambah 0,1 gram logam magnesium, 1 mL HCl pekat, serta 3 mL amil alkohol, lalu dikocok serta dibiarkan memisah. Bila lapisan amil alkohol menginterpretasikan warna merah, kuning, ataupun jingga, maka positif mengandung senyawa flavonoid(Wulandari et al.,2019).

**d. Saponin**

Sejumlah 0,5 gram ekstrak kental dilarutkan dalam 9 mL aquadest di tabung reaksi, dipanaskan selama 3-5 menit,

didinginkan, lalu dikocok kuat. Tambahkan 2 tetes HCl 2N; bila terbentuk busa yang bertahan selama 7 menit, maka positif mengandung saponin(Pertiwi et al.,2022).

**e. Steroid/Terpenoid**

Sejumlah 0,5 gram ekstrak kental dilarutkan dalam 5 mL kloroform di tabung reaksi, lalu ditambahkan pereaksi Liebmman-Burchard. Warna biru ataupun hijau menginterpretasikan adanya steroid, sedangkan warna merah ataupun ungu menandakan triterpenoid positif(Pertiwi et al.,2022).

**f. Tanin**

Sejumlah 0,5 gram ekstrak direbus dengan 10 mL etanol, lalu disaring. Penambahan beberapa tetes FeCl<sub>3</sub> 1% yang menghasilkan warna coklat kehijauan ataupun biru kehitaman menginterpretasikan adanya tanin(Ikalinus et al.,2015).

**3.5.10 Prosedur Studi Uji Toksisitas Akut**

Prosedur studi ekstrak kulit batang Tandui pada tikus galur wistar mengikuti metode OECD 425, mencakup limit test serta main test. Tikus betina, yang lebih sensitif disandingkan jantan, dipakai dalam studi ini. Hewan uji diaklimatisasi selama minimal 5 hari sebelum pengujian dengan kondisi lingkungan bersih. Hewan dipelihara dalam

kandang selaras pedoman BPOM(2014), berukuran 148 cm<sup>2</sup> serta tinggi 17,8 cm, dengan satu tikus per kandang. Kandang ditempatkan di area tenang, dengan pencahayaan 12 jam terang serta gelap, bebas asap serta polutan, serta sirkulasi udara baik, ditutup kawat. Hewan uji dipuaskan 14-18 jam (air minum diperbolehkan), ditimbang sebelum pengujian, serta diberi ekstrak kulit batang Tandui dosis tunggal secara oral memakai sonde. Limit test melibatkan dosis 2000 mg/kgBB secara oral, dengan pakan boleh diberi 3-4 jam pasca perlakuan. (BPOM,2014).

Pengamatan selama 30 menit pertama pasca perlakuan, lalu dilanjutkan terutama selama 4 jam pertama dari 24 jam pertama serta sekali sehari selama 14 hari. Tanda-tanda toksisitas yang diamati meliputi kulit, bulu, mata, selaput lendir, serta saluran pernapasan. Turut diamati tremor, kejang, hipersalivasi, diare, serta kematian. Bila dalam 24 jam terlihat kematian, limit test dihentikan serta dilanjutkan ke main test. Bila hewan uji bertahan, 4 hewan uji tambahan dipakai serta diamati satu kali sehari selama 14 hari. Bila dari lima hewan uji, tiga ataupun lebih bertahan hidup, dosis toksik senyawa itu lebih dari 2000 mg/kgBB. (OECD,2008).

### **3.6 Pengumpulan Data Toksisitas Akut**

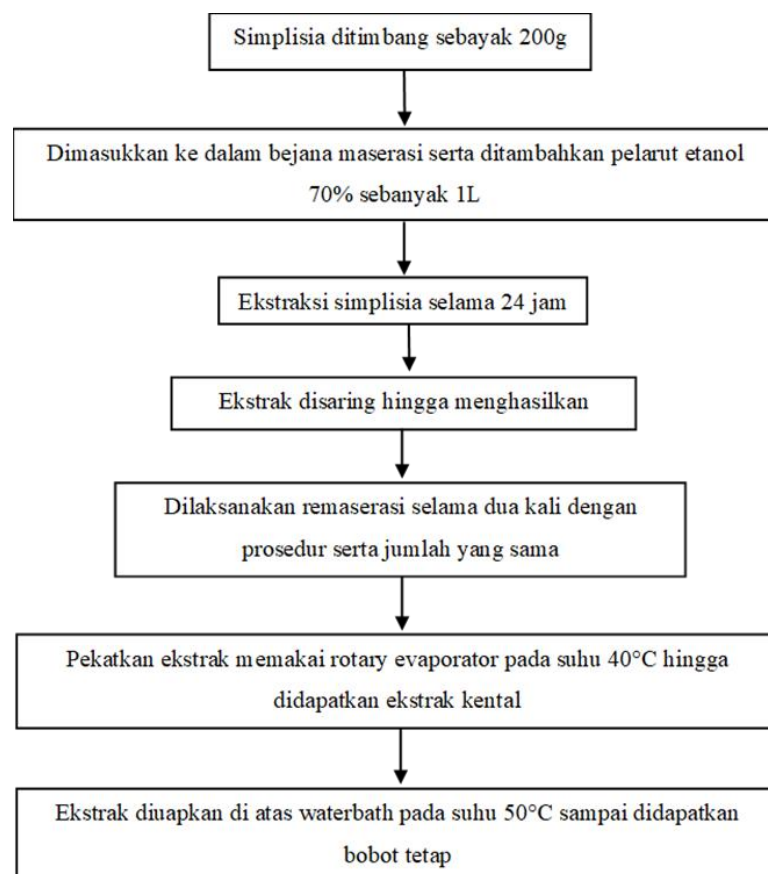
Hasil studi dianalisis guna mengamati implikasi pemberian bahan uji pada gejala toksisitas akut misal perubahan pada kulit, bulu, mata, tremor, diare, serta kematian. Berat badan tikus dihitung tiap hari, dirata-ratakan, serta



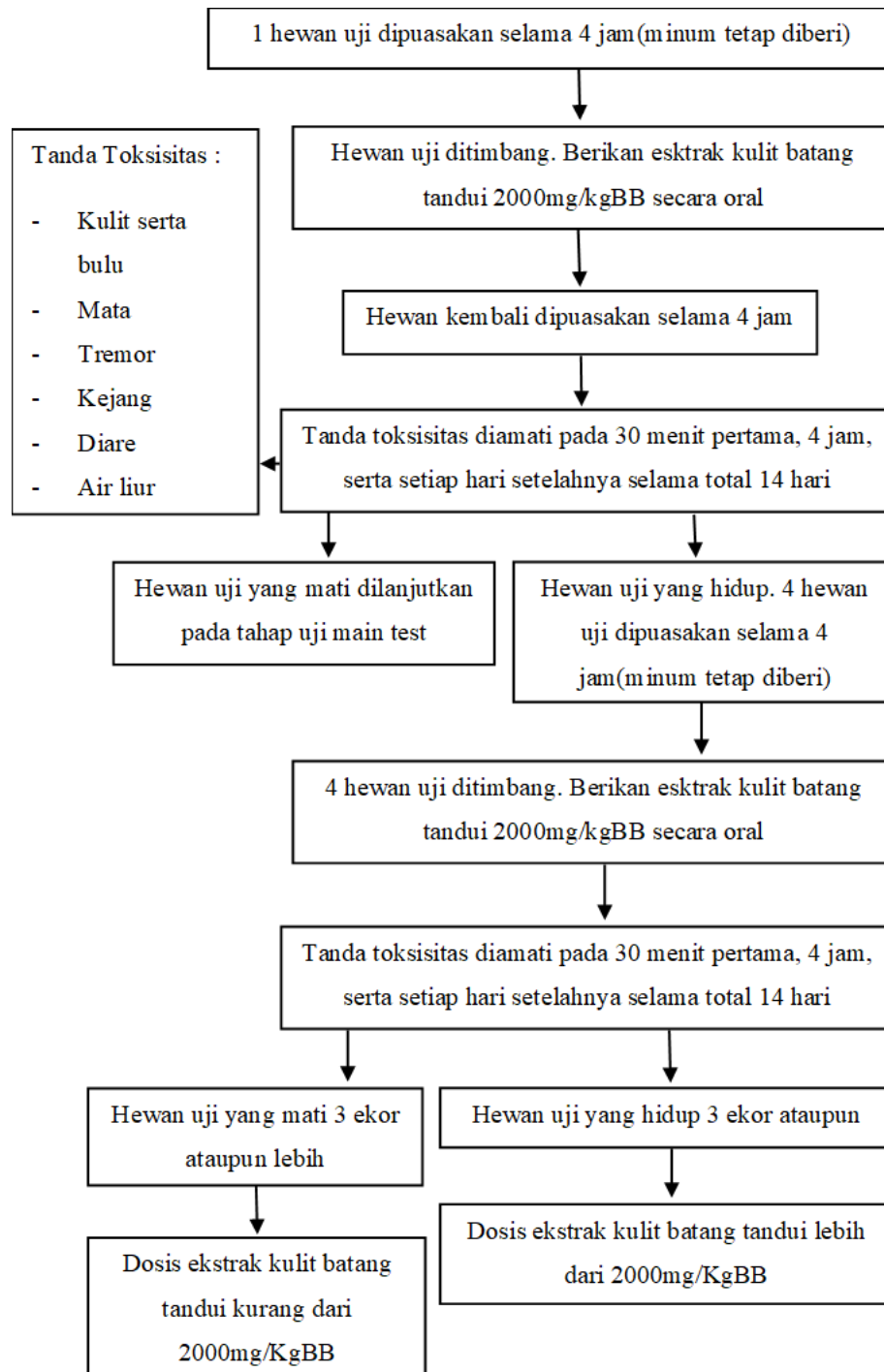
disandingkan guna mengidentifikasi perbedaan. Analisis dilaksanakan memakai SPSS dengan uji homogenitas serta normalitas; bila nilai  $\text{sig} > 0,05$ , dilanjutkan dengan Independent T-test guna menyandingkan tikus perlakuan dengan kontrol negatif pasca 14 hari. Bila tidak memenuhi syarat tes normalitas ataupun homogenitas, dipakai uji Mann Whitney. Perhitungan LD50 dilaksanakan dengan software AOT 425 StartPgm.

### 3.7 Alur Studi

#### a. Pembuatan Ekstrak



## b. Limit Test



### c. Main Test

