

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan pada rancangan penelitian ini adalah metode eksperimental in vivo yang bertujuan untuk menguji efek toksik ekstrak etanol 70% bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) terhadap tikus betina galur wistar dengan metode OECD 425.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian toksisitas akut ekstrak etanol 70% bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) terhadap tikus betina galur wistar dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Farmakologi Toksikologi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Borneo Lestari pada bulan Januari – Juni 2022.

3.3 Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas (sebab) : Dosis ekstrak etanol 70% bunga telang (*Clitoria ternatea L.*).

b. Variabel Terkait (akibat): Gejala toksik, LD₅₀ dan berat badan.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

Alat-alat gelas, kandang tikus, sonde oral, *stopwatch*, timbangan analitik, termometer, masker, *hot plate*, *rotary evaporator*, labu ukur 100 ml, labu ukur 25 ml, *waterbath* dan sarung tangan.

3.4.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

Simplisia ekstrak etanol 70% bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) yang diperoleh dari Banjarbaru Kalimantan Selatan, Na-CMC, dan larutan etanol 70%.

3.5 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus betina galur wistar berjumlah 7 ekor. Pengujian untuk perlakuan digunakan 5 ekor hewan uji dan 2 ekor untuk kontrol negatif. Dengan usia tikus 8-12 minggu, berat badan 120-200 gr, tikus dalam keadaan sehat dan tidak hamil. Hewan uji melakukan penyesuaian diri selama 5 hari sebelum dilakukan perlakuan. Hewan dipelihara dalam kandang yang terbuat dari material kedap air, kuat, dan mudah dibersihkan. Ruang yang digunakan untuk percobaan dengan persyaratan suhu, kelembaban, cahaya dan kebisingan yang sesuai dengan kebutuhan hewan uji. Luas area kandang per ekor tikus dengan berat 100-200 gr, luas kandang 148,4 cm², tinggi 17,8 cm, suhu ruangan diatur menjadi 22° ± 3°C, dengan kelembaban relatif 30-70%, dan penerangan 12 jam terang dan 12 jam gelap. Hewan diberi pakan yang sesuai standar laboratorium dan diberikan tanpa batas (BPOM RI, 2014).

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) di Universitas Lambung Mangkurat.

3.6.2 Pembuatan *Ethical Clearance*

Pembuatan *Ethical Clearance* dilakukan di Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat.

3.6.3 Pembuatan Simplisia

Bunga telang diambil di kota Banjarbaru sebanyak yang diperlukan, kemudian sortasi basah dan dicuci dengan air mengalir kemudian kemudian dikeringkan di oven dengan suhu 40 °C

3.6.4 Pembuatan Ekstrak

Bunga telang (*Clitoria ternatea L*) dilakukan ekstraksi metode maserasi pada suhu kamar dengan pelarut etanol 70%. Bunga telang yang sudah dikeringkan di oven dengan suhu 40°C di blender sehingga diperoleh serbuk, kemudian ditambahkan etanol 70% sebanyak 500 mL dalam gelas beker yang sudah berisi serbuk simplisia selama 3 hari (Cahyaningsih dkk, 2019). Selanjutnya dilakukan pengadukan kemudian ampasnya di remaserasi dengan pelarut etanol 70% selama 2 hari. Ekstrak yang diperoleh di uapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* suhu <50°C kemudian

dimasukkan ke dalam *waterbath* dengan suhu 60°C sehingga didapatkan ekstrak kental (Puspitasari, 2020).

3.6.5 Dosis Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea L.*)

Dosis yang digunakan untuk *limit test* pada penelitian ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) ini adalah 2000 mg/kgBB diberikan secara oral. Penggunaan dosis selanjutnya tergantung hasil dari *limit test* untuk dilanjutkan ke *main test*, jika 3 dari 5 hewan uji mengalami gejala toksik atau kematian maka *limit test* dihentikan dan dilanjutkan ke *main test* (OECD, 2008).

3.6.6 Pembuatan Larutan Stok

Penetapan volume untuk tikus pada penelitian ini adalah 2 ml/200 grBB. Larutan stok yang dibuat sebanyak 25 mL. Larutan stok untuk ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) adalah dosis pada hewan uji sebesar 400 mg/200 grBB. Dosis 400 mg/200 grBB setara dengan 400 mg/2 ml larutan stok. Maka ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) yang dibutuhkan untuk membuat larutan stok sebanyak 25 ml Na- CMC adalah 5.000 mg.

Pembuatan larutan stok dosis 2000 mg/kgBB (*limit test*)

$$\frac{400 \text{ mg}}{x} = \frac{2 \text{ ml}}{25 \text{ ml}}$$

$$X = \frac{400 \text{ mg} \times 25 \text{ ml}}{2 \text{ ml}} = 5000 \text{ mg}$$

3.6.7 Pembuatan Kontrol Negatif Na-CMC 0,5%

Larutan kontrol negatif yang digunakan pada penelitian ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) adalah Na-CMC 2 mL/200 grBB. Na-CMC ditimbang 0,5 gr kemudian dilarutkan dalam gelas beker yang berisi 5 ml *aquadest* yang dipanaskan menggunakan *hot plate*, lalu dicampurkan larutan Na-CMC yang sudah di timbang sebanyak 0,5 gr, kemudian dicukupkan volume larutan stok Na-CMC dengan *aquadest* hingga 100 mL.

3.6.8 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian pada ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) terhadap tikus galur wistar menggunakan metode OECD 425 yang terdiri dari *limit test* dan *main test*. Hewan uji diadaptasi sedikitnya 5 hari sebelum dilakukan pengujian. Hewan uji dipuasakan selama 14-18 jam, air minum boleh diberikan, setelah dipuasakan hewan uji ditimbang. Tikus dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol negatif dan kelompok uji. Pada kontrol negatif diberikan Na-CMC 2 mL gramBB secara oral. Pada *limit test* diberikan 2000 mg/kgBB secara oral. Setelah perlakuan boleh diberikan pakan setelah 3-4 jam (BPOM RI, 2014).

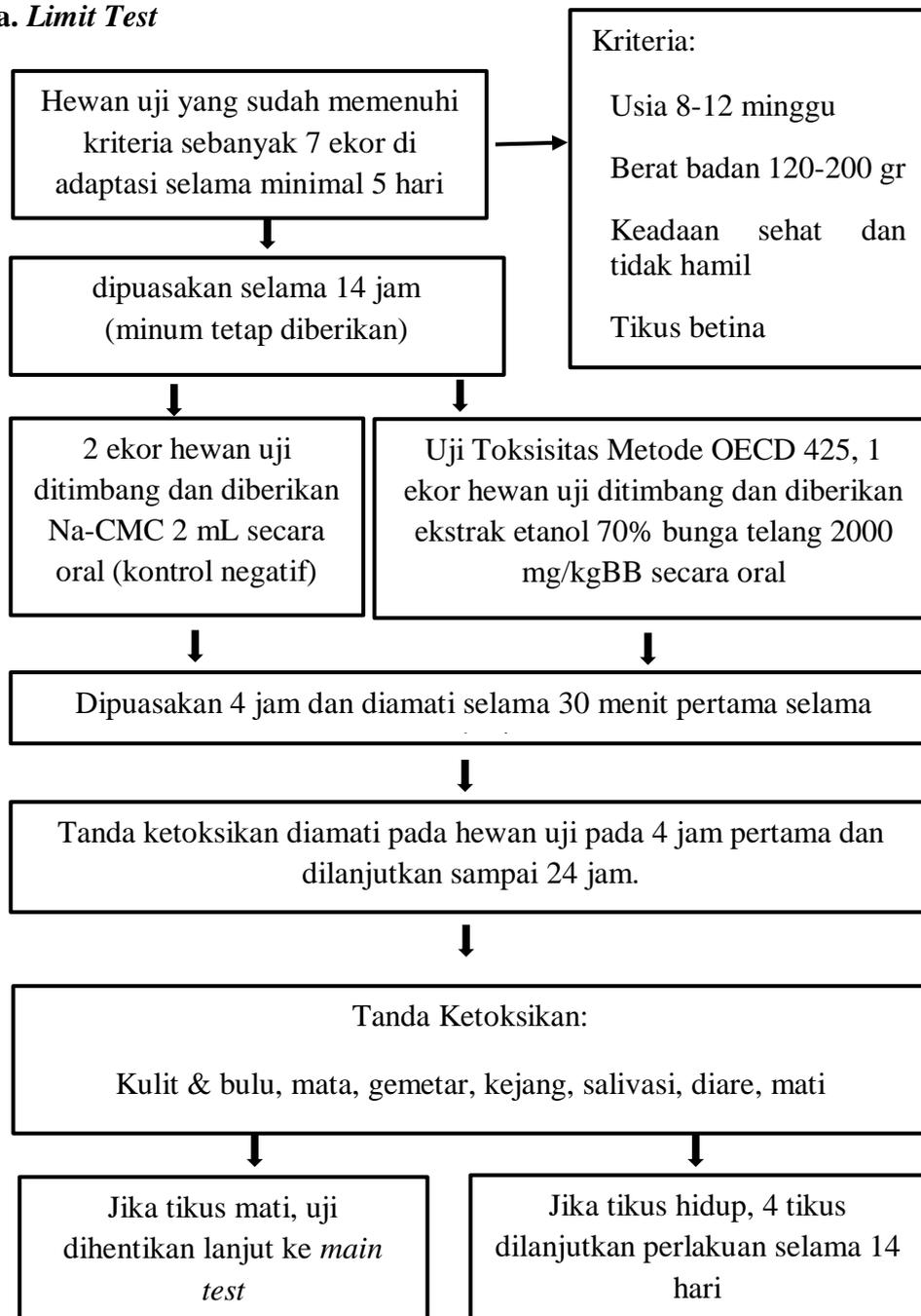
Pengamatan dilakukan pada 30 menit pertama setelah pemberian perlakuan, kemudian dilanjutkan secara khusus pada 4 jam pertama selama 24 jam pertama dan sehari sekali selama 14 hari. Lakukan pengamatan tanda-tanda toksisitas seperti pada kulit, bulu,

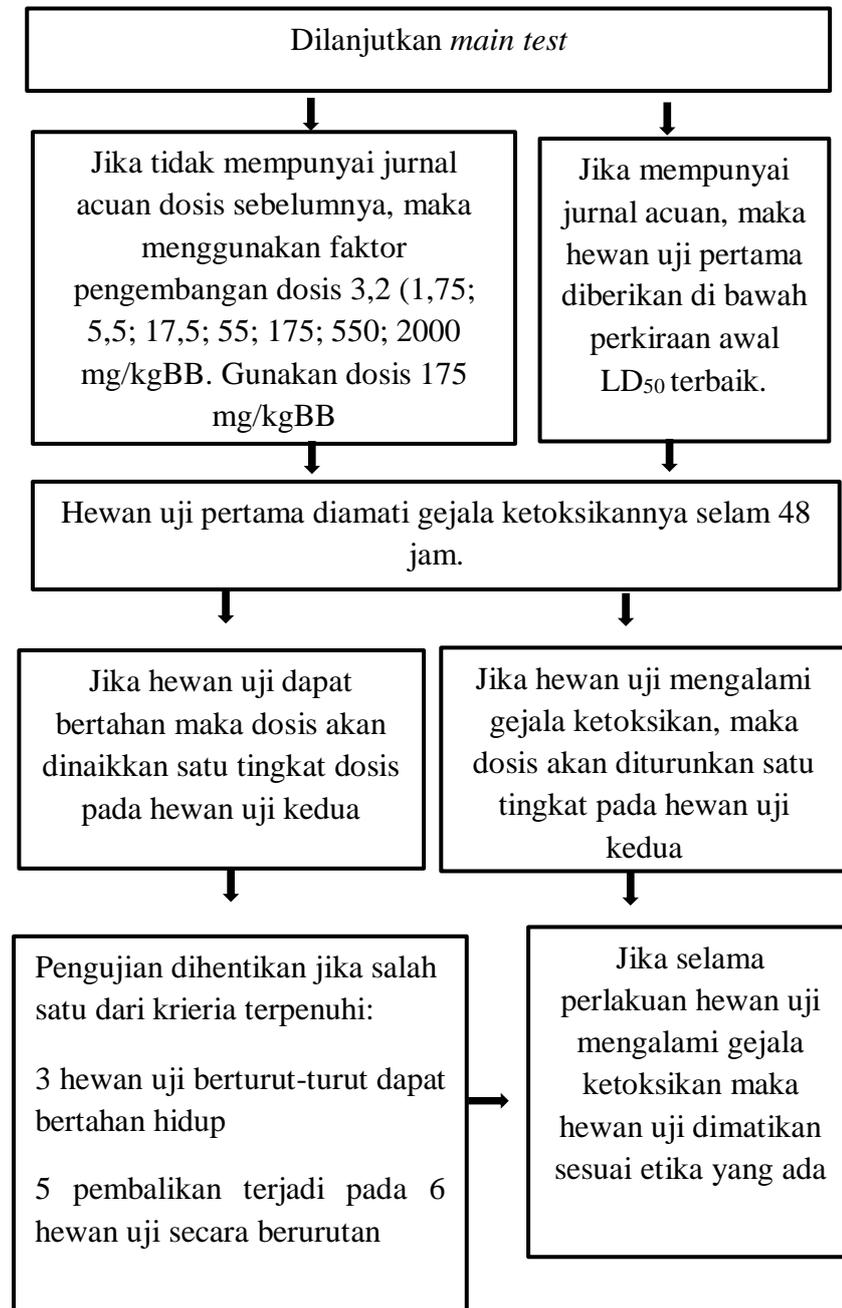
mata, membran mukosa dan sistem pernafasan. Selain itu amati pula hewan uji pada kondisi gemetar, kejang, salivasi, diare, lemas, tidur dan koma. Pengamatan meliputi waktu timbul dan hilangnya gejala toksik serta saat terjadinya kematian. Hewan uji yang sekarat (hendak mati) dikorbankan dan dimasukkan dalam perhitungan sebagai hewan yang mati (BPOM RI, 2014). Jika dalam 24 jam hewan mati maka *limit test* dihentikan dan dilanjutkan dengan *main test*. Namun, jika hewan uji bertahan hidup maka dilanjutkan menggunakan 4 hewan uji lainnya, diamati satu kali sehari selama 14 hari. Kelima hewan uji 3 atau lebih hewan uji hidup maka dosis toksik dari senyawa tersebut lebih dari 2000 mg/kgBB (OECD, 2008).

Main test dilakukan dengan cara memberikan dosis zat aktif pada seekor tikus dari 4 hewan uji berikutnya. 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 mg/kgBB. Tikus pertama diberi dosis mulai dari 175 mg/BB. Apabila tikus hidup, dosis ditingkatkan sesuai urutan di atas dan seterusnya. Namun, jika hewan uji mati, maka dosis diturunkan tingkatannya sesuai urutan dosis (OECD, 2008).

3.6.9 Desain Penelitian

a. *Limit Test*



b. Main Test

3.6.10 Pengumpulan Data dan Analisis Data

Data yang dikumpulkan adalah data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif yaitu berupa gejala-gejala toksisitas akut yang terjadi seperti tremor, kulit dan bulu, diare, letargi, konvulsi atau kejang, mata, dan kematian. Kemudian data tersebut dimasukkan ke dalam tabel dengan diberikan tanda ada tidaknya gejala yang timbul. Data kuantitatif diantaranya jumlah hewan uji yang mati dan berat badan hewan uji sebelum, sesudah hari ke-7 dan hari ke-14 setelah diberi perlakuan. Pengamatan gejala hewan uji yaitu dengan membandingkan tingkah laku tikus kelompok kontrol negatif dengan tikus kelompok uji. Kemudian hasil tersebut dimasukkan ke dalam tabel pengamatan gejala.

Analisa 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 di analisis menggunakan *Independent Sample T-Tes* (Wati, 2021). Namun, jika tidak memenuhi persyaratan tes normalitas ataupun tes homogenitas, maka dilanjutkan ke uji *Mann Whitney*. Perhitungan nilai nilai LD_{50} menggunakan *software* AOT 425 StatPgm. Dosis yang digunakan pada perlakuan dimasukkan ke dalam *software* untuk mengetahui nilai LD_{50} .