

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Rancangan Penelitian**

Penelitian dilakukan menggunakan metode eksperimental dengan rancangan penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penggunaan RAL dikarenakan semua kondisi lingkungan dan umur tikus galur wistar dibuat homogen dan perlakuan sampel dilakukan secara acak

#### **3.2. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari-April 2024 pada dua lokasi yaitu Laboratorium Farmakologi Universitas Borneo Lestari Banjarbaru untuk persiapan organ ginjal tikus galur wistar, dan Laboratorium Patologi Balai Veteriner Banjarbaru untuk pembuatan preparat dan pengamatan histopatologi ginjal tikus galur wistar.

#### **3.3. Variabel Penelitian**

##### **3.3.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis pemberian ekstrak bunga telang (*Clitoria ternate* L.) yaitu sebesar dosis 20 mg/200gBB, 50 mg/200gBB, dan 80 mg/200gBB.

### 3.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu hasil gambaran histopatologi *nekrosis* dan *degenerasi* ginjal tikus galur wistar setelah pemberian ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), berupa skor tingkat kerusakan ginjal yaitu *nekrosis* dan *degenerasi* pada jaringan.

## 3.4. Alat dan Bahan Penelitian

### 3.4.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

1. Pengujian nefroprotektor : batang pengaduk, bejana maserasi, ayakan nomor 40 (*Pharmlab*®), blender (*Maspion*), botol coklat, cawan penguap, *centrifuge*, corong kaca, gelas beker (*Pyrex*®), hot plate (*IKA*®), kertas perkamen, labu ukur (*Pyrex*®), masker (*Sensi*®), mortir dan stemper, neraca analitik (*Fujitsu*®), *rotary evaporator* (*IKA RV 10*®), saringan, sarung tangan (*PD Gloves*), spatula, spuit (*One Med*®), sonde oral, *syringe*, tabung EDTA (*vaculab*®), tabung reaksi (*Pyrex*®), timbangan hewan, oven (*Panel Power*), *waterbath* (*Memmert*®), penjepit tabung, pipet tetes, fotometer (*Mindray BA-88A*).
2. Pembuatan prepatan histopatologi : alat bedah (gunting, pinset, dan pisau bedah) (*Braun*), *biosafety cabinet* (*Esco*), *embedding cassette* (*Huida*), *stainless steel embedding cassette* (*Huida*), *histocore pearl tissue processor* (*Leica*), *histocore arcadia paraffin wax dispenser* (*Leica*), mikrotom (*Reichert-jung*),

*waterbath (GFL 1052), slide staining jar (Madbee), tissue-tek DRS 2000 multiple slide stainer (Sakura) cover glass & object glass (Marienfeld), dan mikroskop binokuler (Olympus).*

### **3.4.2. Bahan**

Bahan yang dipergunakan dalam penelitian antara lain :

1. Pengujian nefroprotektor : 24 ekor tikus galur wistar, amil alkohol (*Emsure*®), asam sulfat (*Emsure*®), *aquadest* (*Waterone*™), *curliv plus* kaplet (*Soho Industri Pharmasi*®), ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang diperoleh dari Banjarbaru Kalimantan Selatan, etanol 70% (*PT. PIM Pharmaceuticals*), eter (*Brataco*®),  $\text{FeCl}_3$  (*Braco*®), gelatin (*Merck*®), HCl pekat (*Braco*®), HCl 2N (*Braco (Teknis)*), isoniazid (*Kimia Farma*®), *ketamine*, Na-CMC (*Teknis*), NaCl (*Teknis*),  $\text{NH}_4\text{OH}$  (*Teknis*), serbuk magnesium (*Teknis*), reagen *Dragendroff* (*Teknis*), reagen *Mayer* (*Teknis*), reagen *Wagner* (*Teknis*), reagen *Liebarmann-Burchard* (*Teknis*), reagen *Urea Kreatinin* (*Human*®).
2. Pembuatan preparat histopatologi : *formalin buffer fosfat* (BNF) 10% p.a, *aquadest*, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, dan etanol absolute, *xylol* p.a, paraffin cair p.a, *hematoxylin* p.a, *eosin* p.a, dan *entellan*.

### **3.5. Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1. Determinasi Tanaman**

Determinasi adalah petunjuk yang dapat digunakan untuk menentukan kedudukan tanaman dalam taksonomi tumbuhan. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lambung Mangkurat.

#### **3.5.2. Pembuatan Ethical Clearance**

*Ethical Clearance* atau kelayakan etik merupakan keterangan tertulis yang diberikan oleh Komisi Etik Penelitian untuk riset yang melibatkan makhluk hidup yang menyatakan bahwa suatu proposal riset layak dilaksanakan setelah memenuhi persyaratan tertentu. Pembuatan *Ethical Clearance* dilakukan di Komite Etik Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin

#### **3.5.3. Pembuatan Simplisia**

Bunga telang diambil di daerah Banjarbaru Kalimantan Selatan sebanyak yang diperlukan, bunga telang disortasi basah terlebih dahulu kemudian dicuci dengan air mengalir. Setelah dicuci kemudian bunga telang dikeringkan di oven dengan suhu 50°C. Setelah dikeringkan simplisia bunga telang dilakukan sortasi kering kemudian dihaluskan dengan *blender* sampai menjadi serbuk dan diayak dengan ukuran mesh 40. Selanjutnya serbuk ditimbang dan dilakukan perhitungan rendemen simplisia (Octavia, 2023).

Rumus perhitungan rendemen simplisia :

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

#### 3.5.4. Pembuatan ekstrak

Serbuk bunga telang sebanyak 150 g dilakukan maserasi dengan pelarut etanol 70% (1 : 5) yaitu 750 ml selama 3 hari dan dilakukan pengadukan setiap hari selama 5 menit. Maserat berupa ekstrak cair yang diperoleh disaring untuk memisahkan filtrat dan ampas. Proses ini diulang sebanyak satu kali dengan prosedur yang sama tetapi dengan perbandingan pelarut (1 : 2,5) yaitu 375 ml. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C secara perlahan untuk memisahkan ekstrak dari pelarutnya kemudian dilakukan *waterbath* (Octavia, 2023)

Rumus perhitungan rendemen ekstrak :

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

#### 3.5.5. Skrining Fitokimia

Skirining fitokimia dilakukan dengan tujuan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol 70% bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), sehingga dapat diketahui metabolit sekunder yang berpotensi memiliki efektivitas sebagai antioksidan (Octavia, 2023).

**a. Uji Alkaloid**

Sebanyak 0,1 gram ekstrak bunga telang dilarutkan dalam 5 ml kloroform dan 4 tetes  $\text{NH}_4\text{OH}$  lalu disaring. Filtrat ditambahkan asam sulfat 2 N sebanyak 10 tetes, dikocok kuat, didiamkan sampai larutan asam sulfat dan kloroform memisah. Lapisan asam sulfat diambil sebanyak 3 tetes untuk ditambahkan kedalam reagen. Hasil positif alkaloid jika reagen *Mayer* membentuk endapan berwarna putih, reagen *Dragendorff* membentuk endapan jingga atau merah dan untuk reagen *Wagner* mengandung endapan coklat.

**b. Uji Fenol**

Sebanyak 0,1 gram ekstrak bunga telang dilarutkan dalam 5 ml etanol 70%, larutan yang dihasilkan diambil sebanyak 1 ml kemudian tambahkan  $\text{FeCl}_3$  1% sebanyak 2 tetes, hasil positif fenol jika larutan berwarna hitam pekat.

**c. Uji Flavonoid**

Sebanyak 0,1 gram ekstrak bunga telang dilarutkan dalam 5 ml etanol 70%. Tambahkan 1 ml logam magnesium, 1 ml HCl pekat, dan 1 ml amil alkohol. Kemudian dikocok dan biarkan memisah. Hasil positif flavonoid jika pada lapisan amil alkohol berwarna merah atau jingga.

**d. Uji Saponin**

Sebanyak 0,1 gram ekstrak bunga telang dilarutkan dalam 5 ml *aquadest*. Panaskan selama 5 menit, lalu didinginkan dan kocok

kuat selama 10 detik. Kemudian tambahkan 1 ml HCl 2N hingga terbentuk busa (busa tidak hilang selama 7 menit) menandakan hasil positif saponin.

**e. Uji Steroid/Triterpenoid**

Sebanyak 0,1 gram ekstrak bunga telang dilarutkan dalam 5 ml etanol 70%, kemudian ditambahkan pereaksi *Liebarmann-Burchard*. Hasil positif triterpenoid jika larutan berwarna merah/ungu dan positif steroid jika larutan berwarna biru/hijau.

**f. Uji Tanin**

Sebanyak 0,1 gram ekstrak bunga telang dilarutkan dalam 5 ml etanol 70%, lalu tambahkan 2-3 tetes gelatin 1% dan 2-3 tetes NaCl. Hasil positif tanin jika membentuk endapan putih.

**3.5.6. Pembuatan Larutan Stok Kontrol Negatif dan Kontrol Positif**

Penetapan volume pemberian pada penelitian ini adalah 2 ml/200gBB (BPOM, 2021). Sediaan larutan Na-CMC 0,5 % dibuat dengan menaburkan 1250 mg Na-CMC ke dalam 25 ml aquades panas, kemudian dibarkan selama kurang lebih 15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai gel. Selanjutnya diaduk hingga menjadi massa yang homogen dan diencerkan dalam labu ukur dengan *aquadest* hingga volume 250 ml (Octavia, 2023).

**3.5.7. Pembuatan Larutan Penginduksi Isoniazid**

Dosis induksi isoniazid yang digunakan untuk menimbulkan efek toksik pada ginjal sebesar 50 mg/kgBB per hari dan diberikan

secara oral. Sehingga dosis toksik untuk tikus BB 200 g adalah 63 mg, hal ini dikarenakan pemberian peroral dimana kadar puncak dicapai dalam waktu 2 jam setelah pemberian oral. Isoniazid tablet digerus dan dilarutkan dalam 10 ml Na-CMC (Octavia, 2023).

### **3.5.8. Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Bunga Telang**

Penetapan volume pemberian pada penelitian ini adalah 2 ml/200 gBB (BPOM, 2021). Nilai IC50 ekstrak etanol 70% bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) sebesar 41,36 ppm atau 41,36 mg/kg (Andriani & Murtisiwi, 2020). Setelah dikonversi ke dosis tikus didapatkan hasil 52,11 mg/200 gBB. Jadi dosis ekstrak bunga telang yang digunakan untuk penelitian ini terbagi 3 dosis yaitu dosis 20 mg/200 gBB, 50 mg/200 gBB dan 80 mg/200 gBB. Kemudian dilarutkan dengan Na CMC 0,5% hingga 100 ml (Octavia, 2023).

### **3.5.9. Persiapan Hewan Uji**

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar berjumlah 24 ekor, kemudian dibagi menjadi enam kelompok. Masing-masing kelompok berjumlah 4 ekor dalam keadaan sehat yang berusia 6-8 minggu dengan bobot tikus 100-200 gram. Hewan uji beradaptasi terlebih dahulu selama 7 hari. Hewan uji diberi penginduksi dan perlakuan setiap hari selama 14 hari secara oral dengan volume yang telah disesuaikan berdasarkan berat badan tikus. Semua kelompok uji kecuali kelompok normal diberikan penginduksi isoniazid 50 mg/kgBB kemudian diberikan perlakuan sesuai



kelompok uji. Hewan diberi pakan dan minum yang sesuai standar laboratorium dan diberikan tanpa batas (*ad libitum*) (Octavia, 2023).

**Tabel 1.** Kelompok Hewan Uji

<b>Kelompok Hewan Uji</b>	<b>Perlakuan</b>
Kontrol normal	Aquadest
Kontrol negative	Isoniazid + Na-CMC 0,5%
Kontrol positif	Isoniazid + Curliv 37 mg/200gBB
Dosis 1	Isoniazid + Ekstrak bunga telang 20 mg/200gBB
Dosis 2	Isoniazid + Ekstrak bunga telang 50 mg/200gBB
Dosis 3	Isoniazid + Ekstrak bunga telang 80 mg/200gBB

### 3.5.10. Pembedahan Hewan Uji (*Nekropsi*)

Tahap pertama dalam *nekropsi* tikus adalah melakukan anestesi, tikus dianestesi dengan menggunakan *ketamine*. Setelah hewan tidak sadarkan diri, hewan digenggam di dasar tengkorak dengan satu tangan dan di dasar leher dengan tangan yang lain, dan menarik dengan cepat dan tegas kearah yang berlawanan dengan kuat. Kemudian, hewan ditempatkan dengan punggung menempel pada meja atau *styrofoam*, dan dilakukan proses *nekropsi* dengan cara pembukaan bagian tubuh tikus dan pengambilan organnya (Siregar, 2017).

### 3.5.11. Pembuatan Preparat Histopatologi

Dalam pembuatan preparat histopatologi ada beberapa tahapan yang dilakukan yaitu (Hayati, 2023):

#### 1. Fiksasi Jaringan (*Tissue Fixation*)

Organ ginjal difiksasi dengan larutan *Buffer Neutral Formalin* (BNF) 10%. Tujuan utama dari *fiksasi* adalah mengusahakan agar sel-sel dan jaringan kembali ke kondisi yang sama ketika hewan uji masih hidup.

#### 2. Pengirisan Jaringan (*Tissue Trimming*)

Setelah selesai proses *fiksasi*, kemudian dilanjutkan dengan tahap *trimming*. *Trimming* adalah proses pemotongan tipis jaringan setebal kurang lebih 3 mm dengan diberi kode sampel.

#### 3. Proses Jaringan (*Tissue Processing/Dehidrasi*)

Proses jaringan ini dilakukan menggunakan alat *Tissue Processor* yang terdiri dari *dehydration*, *clearing*, dan *infiltration* dengan waktu antara 18-24 jam.

#### 4. *Blocking* (*Embedding Tissue*)

Jaringan yang berada dalam *embedding cassette* dipindahkan ke dalam *base mold* atau cetakan yang kemudian diisi dengan parafin cair dan dibiarkan hingga membeku dengan suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 5. Pemotongan *Block* Jaringan (*Cutting*)

Blok paraffin dipotong dengan rotary microtome setebal 3-6 *micron*. Hasil potongan diletakkan di *waterbath* dengan suhu  $\leq$

50°C hingga jaringan mengembang dan tidak ada kerutan. Hasil potongan diambil dengan kaca objek, dikeringkan, dan diberikan kode sampel.

6. Pewarnaan *Hemotoxylin Eosin* (HE)

Pewarnaan menggunakan *automated slide staine*. Preparat yang terletak di atas kaca objek dimasukkan ke dalam rak khusus (*tray*), kemudian pencelupan terjadi secara otomatis berurutan sebagai berikut :

- a. Pencelupan preparat dengan larutan *xylol* I, *xylol* II, dan *xylol* III masing-masing selama 5 menit.
- b. Pencelupan preparat dengan larutan alkohol absolut I, alkohol absolut II, alkohol 80% I, dan alkohol 70% II masing-masing selama 3 menit.
- c. Preparat dilakukan pembilasan dengan air mengalir hingga bersih.
- d. Pewarnaan preparat dengan larutan *mayer hematoxylin* selama 2-5 menit.
- e. Preparat dilakukan pembilasan dengan air mengalir hingga bersih.
- f. Pewarnaan preparat dengan *eosin* selama 5 menit.
- g. Pencelupan preparat secara berturut-turut dengan alkohol 70% III, alkohol 80% IV, alkohol absolut III, dan alkohol absolut IV masing masing selama 3 menit.

- h. Pencelupan preparat dengan larutan *xylol* IV, *xylol* V, *xylol* VI, dan *xylol* VII masing-masing selama 5 menit. Kemudian preparate diangkat dari *automated slide staine*.

#### 7. Perekatan (*Mounting*)

Dilakukan dengan meneteskan bahan untuk *mounting* (*entellan*) kemudian ditutup dengan *coverglass*.

### 3.5.12. Pemeriksaan Histopatologi

Pemeriksaan preparat histopatologi ginjal tikus galur wistar dilakukan dengan mikroskop pembesaran 400x. Pengamatan dilakukan pada lima lapang pandang terhadap berbagai perubahan yang terjadi, lalu diskorsing berdasarkan rata-rata perubahan jaringan (Kamaliani *et al.*, 2019).

### 3.5.13. Pengolahan Data

Data yang diperoleh dari pengaruh pemberian ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) terhadap gambaran histopatologi ginjal dengan melihat tingkat kerusakan ginjal dan pengamatan terhadap preparat histopatologi ginjal tikus yang dianalisis secara deskriptif, guna membedakan tingkat keparahan dan memudahkan dalam analisis maka penilaian dilakukan dengan *skoring*.

**Tabel 2.** Pengukuran Tingkat Kerusakan Ginjal Tikus Menggunakan *Skoring*

Tingkat kerusakan	Persen kerusakan (%)	<i>Skoring</i>	
		<i>Degenerasi</i>	<i>Nekrosis</i>
Normal	-	0	0
Ringan	1% - 30%	1	1
Sedang	31% - 70%	2	2
Berat	>70%	3	3

Sumber : (Asyura *et al.*, 2016).

**Keterangan :**

Skor 0 : tidak ada kerusakan sel

Skor 1 : tingkat kerusakan sel sebesar 1-30% dalam satu bidang pandang

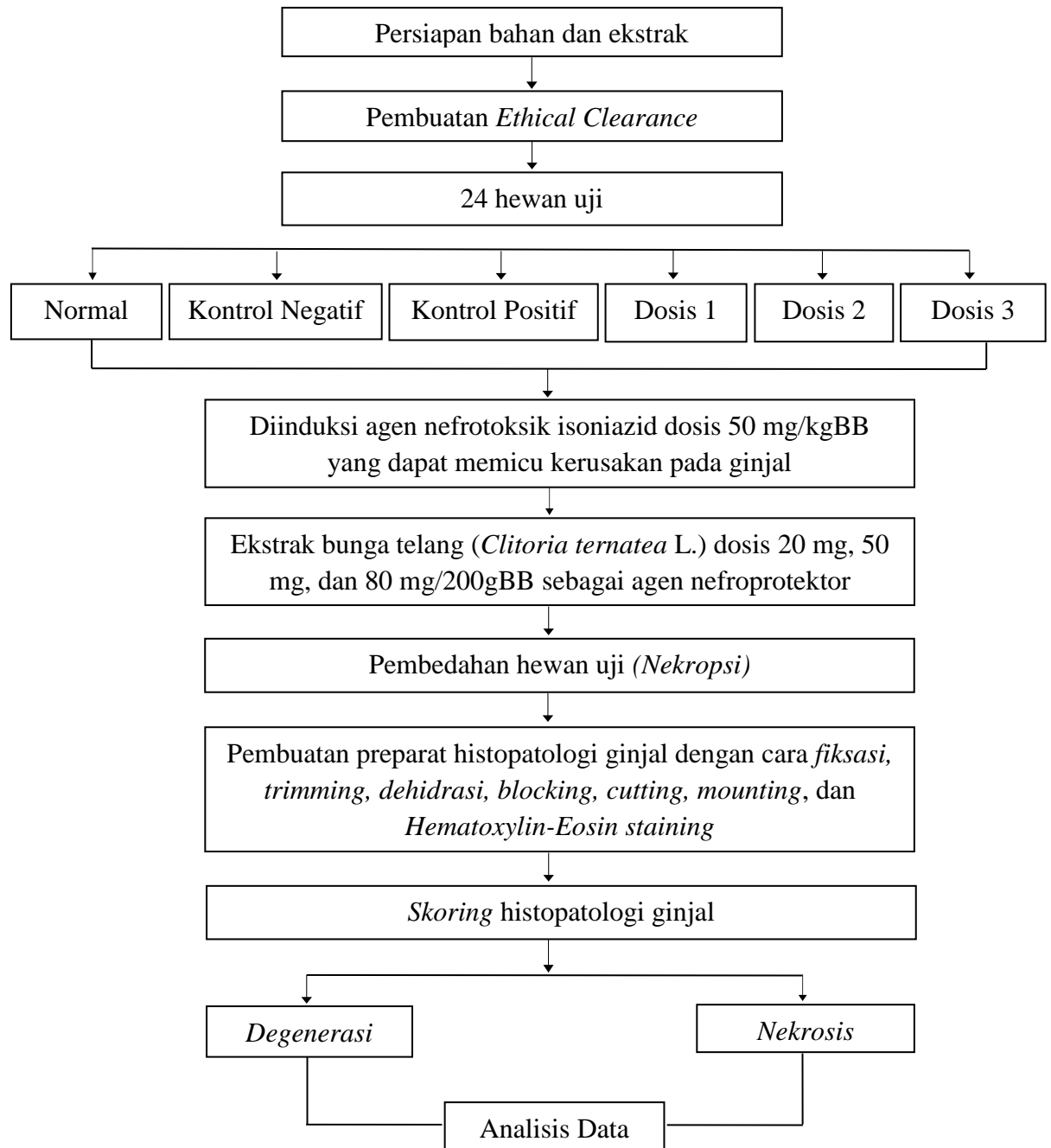
Skor 2 : tingkat kerusakan sel sebesar 31-70% dalam satu bidang pandang

Skor 3 : tingkat kerusakan sel sebesar >70% dalam satu bidang pandang

### 3.6. Analisis Data

Hasil data kuantitatif yang didapatkan berupa skoring histopatologi ginjal *degenerasi* dan *nekrosis* dari sampel 24 ekor tikus galur wistar, kemudian dianalisis secara statistik menggunakan aplikasi IBM SPSS 25. Pertama dengan melakukan uji normalitas dan homogenitas. Jika data terdistribusi normal dan homogen sig ( $>0,05$ ) maka menggunakan uji parametrik yaitu *one way ANOVA*, jika nilai sig ( $<0,05$ ) maka dilanjutkan dengan analisis *LSD*. Tapi jika data tidak terdistribusi normal maupun homogen, maka menggunakan uji non parametrik yaitu *Kruskal Wallis*, jika nilai sig ( $>0,05$ ) maka tidak dilanjutkan lagi, jika nilai sig ( $<0,05$ ) maka dilanjutkan dengan analisis *Mann Whitney* (Octavia, 2023).

### 3.7. Alur Penelitian



**Gambar 5.** Skema Alur Penelitian