

BAB III

METODOLOGI 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 dibuat homogen dan perlakuan sampel dilakukan secara acak.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian gambaran histopatologi hati tikus galur wistar pasca pemberian ekstrak etanol 70% bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang diinduksi isoniazid dilakukan di Laboratorium Farmakologi Toksikologi Universitas Borneo Lestari dan Laboratorium Patologi Balai Veteriner pada bulan Februari – April 2024.

3.3. Variabel Penelitian

3.3.1. Variabel Bebas

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

3.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu hasil gambaran histopatologi nekrosis dan degenerasi hati tikus galur wistar setelah pemberian ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), berupa skor tingkat kerusakan hati 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 Hepatoprotektor : 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 preparat histopatologi : gelas beker (*Pyrex*®), *hot plate* (*HMS-79*), pipet tetes (*Pyrex*®), kandang hewan uji (tikus), alat bedah (gunting, pinset, dan pisau bedah) (*Braun*), botol spesimen (*Aviamed*), *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 hepatoprotektor : 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*®), FeCl₃ (*Braco*®), gelatin (*Merck*®), HCl pekat (*Braco*®), HCl 2N (*Braco (Teknis)*), isoniazid (*Kimia Farma*®), ketamine, kloroform (*Emsure*®), Na-CMC (*Teknis*), NaCl (*Teknis*), NH₄OH (*Teknis*), reagen *Dragendroff* (*Teknis*), reagen Mayer (*Teknis*), reagen *Wagner* (*Teknis*), reagen *Liebarmann-Burchard* (*Teknis*), reagen SGPT SGOT (*Human*®) , serbuk magnesium (*Teknis*).
2. Pembuatan preparat histopatologi : 24 organ hati tikus galur wistar, formalin buffer fosfat (BNF) 10% p.a, akuades, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, dan etanol absolute, xylol p.a, paraffin cair p.a, *hematoxylin* p.a, *eosin* p.a, dan entelan *distirene plasticizer xilen* (DPX), ketamine.

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) di 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 Makassar.

3.5.3. Pembuatan Simplisia

Bunga telang diambil di kota Banjarbaru Kalimantan Selatan sebanyak yang diperlukan, kemudian disortasi basah dan dicuci dengan air mengalir kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari. Setelah dikeringkan bunga telang di sortasi kering dan dihaluskan dengan menggunakan blender sampai menjadi serbuk dan diayak dengan ayakan mesh 40. Selanjutnya serbuk ditimbang dan dilakukan dan dilakukan perhitungan rendemen simplisia. Rumus perhitungan rendemen simplisia yaitu: (Anggraini, 2023).

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

3.5.4. Pembuatan Ekstrak

Simplisia bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) ditimbang 150 gram, kemudian dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi pada suhu kamar dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:5 yaitu 750 ml pelarut yang digunakan. Kemudian, dilakukan perendaman 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 1 : 2,5. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* suhu <50°C kemudian dimasukkan ke dalam waterbath dengan suhu <50°C sehingga didapatkan ekstrak kental dan mencapai bobot tetap. Rumus perhitungan rendemen ekstrak yaitu : (Anggraini, 2023).

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

3.5.5. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia simplisia dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat dalam suatu simplisia. Skrining fitokimia terdiri dari alkaloid, fenol, flavonoid, saponin, steroid/ triterpenoid, dan tanin.

a. Uji Alkaoid

Sampel ekstrak bunga telang ditimbang sebanyak 0,1 g dilarutkan dalam 10 ml etanol 70% dan ditetesi HCL 2N sebanyak 2- 3 tetes, dipanaskan selama 2 menit, kemudian dinginkan lalu disaring dan diambil filtratnya, kemudian bagi dalam tiga tabung, dan ditambahkan reagen,. Reagen Mayer membentuk endapan berwarna putih jika mengandung alkaloid, untuk reagen Wagner apabila positif mengandung senyawa alkaloid akan menghasilkan endapan coklat dan untuk reagen Dragendroff akan menghasilkan endapan jingga atau merah apabila mengandung senyawa alkaloid (Anggraini, 2023).

b. Uji Fenol

Sampel ekstrak bunga telang ditimbang 0,1 g dilarutkan dalam 10 ml etanol 70%, kemudian ditambahkan FeCl_3 1% sebanyak 1-2 tetes. Apabila larutan berwarna merah, ungu, biru, atau hitam pekat menunjukkan adanya fenol (Nugrahani *et al.*, 2016).

c. Uji Flavonoid

Sampel ekstrak bunga telang ditimbang 0,1 g dilarutkan dalam 10 ml etanol 70%. Tambahkan 0,1 gram magesium, 1 ml HCl pekat dan 3 ml amil alcohol. Kemudian dikocok dan biarkan memisah. Apabila larutan berwarna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alcohol maka positif mengandung senyawa falavonoid (Nugrahani *et al.*, 2016).

d. Uji Saponin

Sampel ekstrak bunga telang ditimbang 0,1 g dilarutkan dalam *aquadest* 10 ml. Selanjutnya panaskan selama 5 menit, kemudian dinginkan dan kocok kuat diamkan. Setelah itu, tambahkan 2 tetes HCL 2N hingga terbentuk busa (busa tidak hilang selama 7 menit) maka menandakan adanya senyawa saponin (Nugrahani *et al.* 2016).

e. Uji Steroid/Triterpenoid

Sampel ekstrak bunga telang ditimbang 0,1 g dilarutkan dengan 10 ml etanol 70%, kemudian ditambahkan pereaksi Libermann-Burchard. Selanjutnya apabila terdapat warna biru atau hijau menandakan adanya positif senyawa steroid, sedangkan apabila terdapat warna merah atau ungu menandakan adanya positif senyawa triterpenoid (Nugrahani *et al.*, 2016).

f. Uji Tanin

Sampel ekstrak bunga telang ditimbang 0,1 g dilarutkan dengan etanol 70%, kemudian ditambahkan 2-3 tetes gelatin 1% dan NaCl. Selanjutnya apabila terdapat endapan putih maka positif mengandung senyawa tannin (Anggraini, 2023).

3.5.6. Pembutan 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 menimbang 1250 mg Na-CMC ke dalam 250 ml aquades panas, kemudian dibiarkan 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 aquades hingga volume 250 ml (Anggraini, 2023). Perhitungan dapat dilihat dilampiran 3.

3.5.7. Pembuatan Larutan Penginduksi Isoniazid

Dosis induksi isoniazid yang digunakan untuk menimbulkan efek toksik pada hati sebesar 50 mg/kgBB per hari dan diberikan secara oral. Isoniazid tablet digerus dan dilarutkan dalam 10 ml Na-CMC (Anggraini, 2023). Perhitungan dapat dilihat dilampiran 3.

3.5.8. Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Bunga Telang

Penetapan volume pemberian pada penelitian ini adalah 2 ml/200gBB (BPOM, 2021). Nilai IC50 ekstrak etanol 70% bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) sebesar 41,36 ppm sangat kuat (Andriani & Murtisiwi, 2020). Jadi dosis ekstrak bunga telang yang digunakan untuk penelitian ini terbagi menjadi 3 dosis yaitu dengan dosis 20 mg/gBB, 50 mg/gBB dan 80 mg/gBB. Kemudian dilarutkan dengan Na CMC hingga 10 ml lalu diberikan secara oral (Anggraini, 2023). Perhitungan dapat dilihat dilampiran 4.

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 8-12 minggu dengan bobot tikus 100-200 gram.

Sebelum percobaan dimulai, hewan diaklimatisasi (adaptasi) di ruang percobaan selama 5-7 hari. Hewan dipelihara dalam kandang yang terbuat dari material yang kedap air, kuat dan mudah dibersihkan, serta ruangan pemeliharaan bebas dari kebisingan. Hewan uji diberi pakan dan minum sesuai standar laboratorium dan diberikan terus menerus (BPOM, 2021). Perhitungan dapat dilihat dilampiran 2.

Tabel 1. Kelompok Hewan Uji

Kelompok Perlakuan	Perlakuan
Kelompok I kontrol normal	Tanpa perlakuan
Kelompok II kontrol negative	Na CMC 0,5%
Kelompok III kontrol positif	Curly 37 mg/200gBB
Kelompok IV dosis 1	Ekstrak bunga telang 20 mg/200gBB
Kelompok V dosis 2	Ekstrak bunga telang 50 mg/200gBB
Kelompok VI dosis 3	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 tikus tidak sadarkan diri, kemudian pegang leher dan ekor tikus ditarik secara berlawanan. Setelah itu ditempatkan dengan punggung menempel pada meja atau *Styrofoam*, kemudian dilakukan proses nekropsi dengan cara pembukaan bagian tubuh tikus dan diambil organnya (Siregar, 2017).

3.5.11. Pembuatan Preparat

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

1. Fiksasi Jaringan (*Tissue Fixation*)

Organ hati 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 selanjutnya yaitu *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°C .

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

Blok paraffin dipotong dengan *rotary microtome* setebal 4-5 micron. Hasil potongan diletakkan di *waterbath* dengan suhu $< 50^{\circ}\text{C}$ 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 yang pertama pencelupan preparat dengan larutan *xylol* I, *xylol* II, dan *xylol* III masing-masing selama 5 menit, langkah kedua pencelupan preparat dengan larutan alkohol absolut I, alkohol absolut II, alkohol 80% I, dan alkohol 70% II masing-masing selama 3 menit, langkah ketiga preparat dilakukan pembilasan dengan air mengalir hingga bersih, langkah keempat Pewarnaan preparat dengan larutan *mayer hemotoxylin* selama 2-5 menit setelah itu preparat dilakukan pembilasan dengan air mengalir hingga bersih, langkah kelima Pewarnaan preparat dengan *eosin* selama 5 menit, dan pencelupan preparat secara berturut-turut dengan alkohol 70% III, alkohol 80%

IV, alkohol absolut III, dan alkohol absolut IV masing masing selama 3 menit, selanjutnya langkah terakhir yaitu 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 hati tikus galur wistar dilakukan dengan mikroskop pembesaran 400 kali. Pengamatan dilakukan pada lima lapang pandang terhadap berbagai perubahan yang terjadi, lalu diskorsing berdasarkan rata-rata perubahan jaringan degenerasi dan nekrosis.

3.5.13. Pengolahan Data

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

Tabel 2. Skor Penilaian Kerusakan Hati (Hayati, 2023)

<i>Score</i>	Degenerasi
0	Apabila tidak ada perubahan degenerasi hepar
1	Perubahan degenerasi ringan
2	Perubahan degenerasi sedang
3	Perubahan degenerasi berat
4	Perubahan degenerasi sangat berat
<i>Score</i>	Nekrosis
0	Apabila tidak ada perubahan nekrosis hepar
1	Perubahan nekrosis ringan
2	Perubahan nekrosis sedang
3	Perubahan nekrosis berat
4	Perubahan nekrosis sangat berat

Keterangan :

Skor 0 : tidak ada kerusakan sel

Skor 1 : tingkat kerusakan dengan nilai 1-20%

Skor 2 : tingkat kerusakan dengan nilai 21-50%

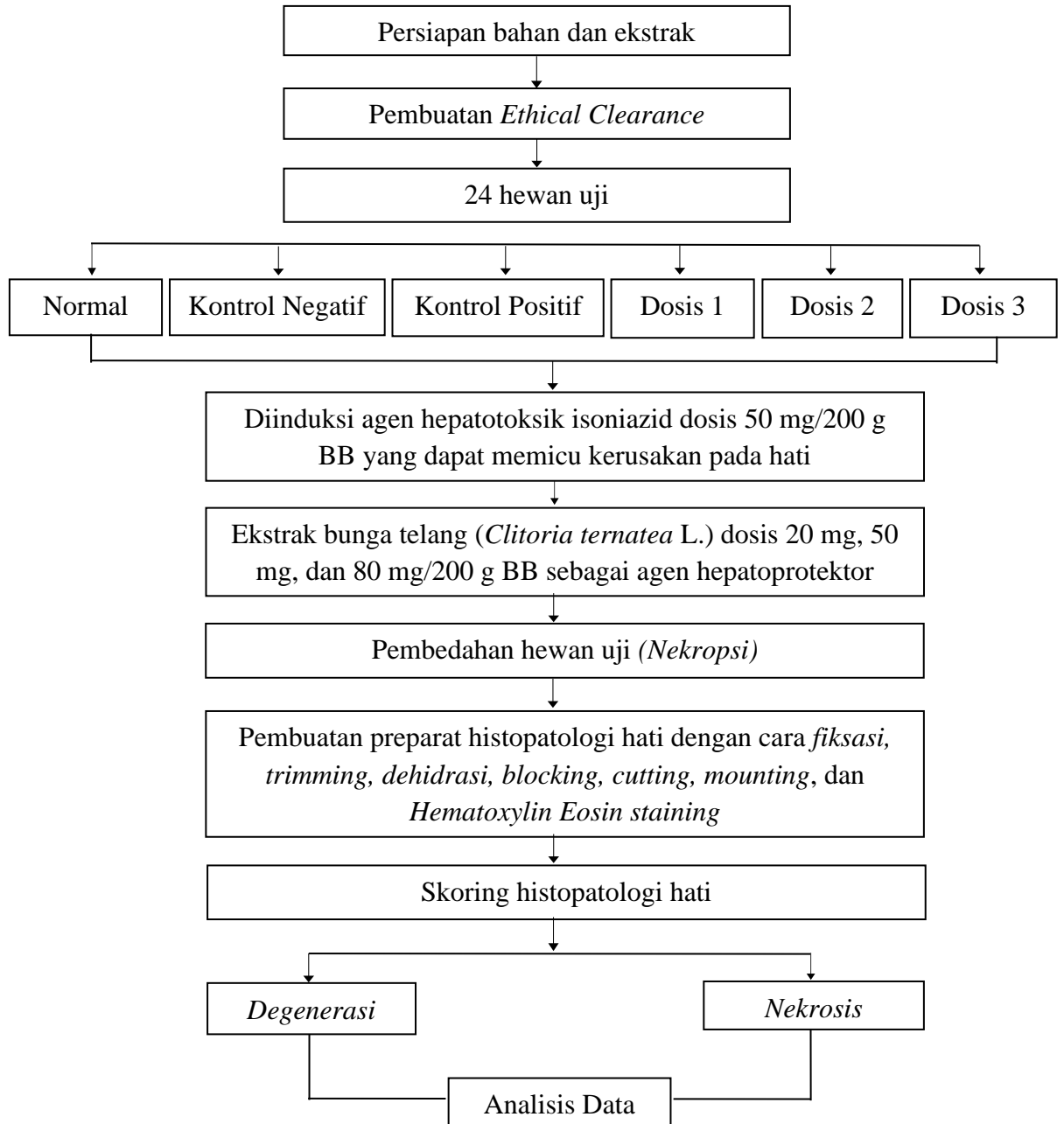
Skor 3 : tingkat kerusakan dengan nilai 51-75%

Skor 4 : tingkat kerusakan dengan nilai >75%

3.6. Analisis Data

Setelah mendapatkan data dari penelitian, data tersebut dianalisis dengan menggunakan program IBM SPSS versi 24. Dengan taraf kepercayaan 95% untuk menilai apakah datanya terdistribusi normal maupun homogen atau tidak secara statistik. Jika data terdistribusi secara normal maupun homogen ($>0,05$) akan dilanjutkan menggunakan uji parametrik, uji parametrik yang digunakan adalah one way ANOVA, jika nilai sig ($<0,05$) maka dilanjutkan dengan analisis *LSD*. Sebaliknya jika data tidak terdistribusi normal maupun homogen menggunakan uji nonparametrik, uji nonparametrik yang digunakan adalah uji *Kruskal Wallis*. Jika nilai sig ($>0,05$) maka tidak dilanjutkan lagi, sebaliknya jika nilai sig ($<0,05$) maka dilanjutkan menggunakan analisis *Mann Whitney* (Anggraini, 2023).

3.7. Alur Penelitian



Gambar 4. Kerangka Alur Penelitian