

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah temu hitam (*Curcuma aeruginosa*) dari Tawangmangu

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang dilakukan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang temu hitam (*Curcuma aeruginosa*) yang diambil secara acak dari perkebunan temu hitam di Tawangmangu

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol temu hitam (*Curcuma aeruginosa*) sebagai imunomodulator. Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah kadar SGOT dan SGPT serta gambaran toksisitas subkrosik ekstrak etanol temu hitam (*Curcuma aeruginosa*) sebagai imunomodulator yang meliputi parameter gejala toksik, gejala klinis. Variabel utama ketiga adalah tikus putih galur Wistar.

2. Klasifikasi Variabel utama

Variabel utama dapat dipecah menjadi beberapa kategori berbeda, antara lain variabel terkontrol, variabel terikat, dan variabel bebas. Faktor bebas merupakan variabel yang sengaja dimaksudkan untuk melihat pengaruhnya terhadap variabel ketergantungan. Faktor bebas pada eksplorasi ini adalah konsentrat etanol temu hitam (*Curcuma aeruginosa*).

Variabel tergantung adalah variabel akibat dari variabel utama. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek toksisitas sub kronis ekstrak etanol temu hitam (*Curcuma aeruginosa*) terhadap organ hati melalui pemeriksaan kadar SGOT dan SGPT serta histopatologi tikus galur Wistar.

Variabel terkontrol adalah variabel yang diduga mempunyai pengaruh terhadap variabel terikat selain variabel bebas. Kualifikasi

mereka perlu ditentukan agar hasil yang diharapkan tidak tertukar dan dapat direplikasi dengan tepat pada penelitian lain. Berat badan, umur, lingkungan hewan uji, dan perlakuan peneliti merupakan variabel kontrol penelitian.

3. Operasional Variabel utama

Pertama, simpilisia temu hitam adalah bagian rimpang temu hitam (*Curcuma aeruginosa*) yang diambil dari Tawangmangu.

Kedua, serbuk temu hitam adalah serbuk yang diperoleh dari bagian rimpang tanaman yang telah dihaluskan menggunakan mesin penggiling dan kemudian diayak dengan mesh 40.

Ketiga, ekstrak etanol temu hitam adalah hasil maserasi menggunakan etanol 96% sebagai pelarut kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*.

Keempat, hewan uji dalam penelitian ini adalah tikus putih galur Wistar yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kelima, efek toksisitas subkronik meliputi kenaikan kadar SGOT dan SGPT dalam darah serta histopatologi pada organ hati setelah pemberian ekstrak etanol temu hitam dengan dosis yang bervariasi selama 28 hari.

C. Alat, Bahan dan Hewan Uji

1. Alat

Alat untuk pengeringan temu hitam adalah oven, alat yang digunakan dalam proses pembuatan ekstrak adalah batang pengaduk, gelas piala, kain flannel, botol penampung, gelas corong, botol gelap untuk maserasi, *rotary evaporator* dan corong *buchner*.

Alat yang digunakan untuk perlakuan hewan uji adalah kandang tikus, spuit injeksi, dan jarum oral. Alat yang digunakan untuk pengambilan darah, penumpulan serum, pemeriksaan SGOT dan SGPT yaitu gunting, tabung sentrifugasi, tabung reaksi, mikropipet, fotometer.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang temu hitam (*Curcuma aeruginosa*) yang diperoleh dari Tawangmangu. Reagen SGOT dan SGPT untuk pemeriksaan biokimia serta paraffin cair, Hematoksilin Eosin (HE) untuk pembuatan preparate histopatologi

dan CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) sebagai sebagai control negatif. Etanol 96% digunakan untuk pembuatan ekstrak.

3. Hewan uji

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih jantan dan betina galur Wistar. Usia hewan uji yang digunakan antara 2-4 bulan dengan berat badan antara 120-200 gram.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan sampel

Rimpang temu hitam diperoleh dari perkebunan di Tawangmangu. Rimpang temu hitam dicuci bersih untuk menghilangkan tanah dan kotoran. Rimpang temu hitam dibelah halus, kemudian dikeringkan dalam kompor dengan suhu 50 °C hingga kering. Setelah itu, digunakan mesin penggiling untuk menggiling rimpang jahe hitam yang telah dikeringkan, dan digunakan ayakan 40 mesh untuk menyaringnya. Hasil berupa bubuk disimpan dalam wadah kering yang tertutup rapat dan akan digunakan untuk penelitian.

2. Penetapan kadar air serbuk temu hitam

Kepastian kandungan air dalam bubuk temu hitam dilakukan dengan menggunakan alat *sterling bidwell*. Jaminan fokus ini diharapkan dapat menjamin mutu dan viabilitas serbuk tetap terjaga dan menentukan kewajaran contoh untuk pengujian. Cairan pengangkut yang digunakan adalah Xilena. Penjaminan kadar air dilakukan berkali-kali, yaitu ditambahkan 20 gram contoh temu hitam dan 100 ml larutan, kemudian didiamkan selama kurang lebih 30 menit. Kadar air yang memenuhi syarat dibawah 10% (Depkes, 1995).

Akar kuning digiling dengan mesin penggiling dan diayak dengan ayakan 40 mesh setelah dikeringkan. Serbuk kering yang dihasilkan akan digunakan untuk penelitian dan disimpan dalam wadah kering yang tertutup rapat.

3. Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan ekstrak dilakukan menggunakan alat *mouisture balance*. Serbuk sebanyak 2 gram dimasukkan pada lempeng *moisture balance* dan ditetapkan pada suhu 105 °C selama 10

menit. Pengukuran akan berhenti jika sudah terdengar bunyi. Persen pengeringan secara otomatis akan terlihat pada alat tersebut.

4. Pembuatan ekstrak temu hitam

Sebanyak 1500 gram bubuk akar kuning dipisahkan menggunakan 10L etanol yang dilarutkan menggunakan metode maserasi. Kemudian ditutup rapat dan dijauhkan dari cahaya selama tiga hari (setiap hari dikocok). Konsentrat tersebut kemudian dipisahkan menggunakan kertas saluran untuk memperoleh maserasi. Kemudian penumpukan dimaserasi ulang menggunakan 5L etanol yang dilarutkan dengan metode serupa selama 3 hari sampai diperoleh maserat bening. Setelah itu, digunakan alat penguap putar vakum pada suhu 65°C untuk menggabungkan seluruh etanol maserat dan menguapkannya hingga diperoleh ekstrak kental.

5. Pembuatan larutan uji

Menimbang 0,5 gram bubuk CMC dan melarutkannya dalam 100 mL air sulingan panas sambil diblender untuk membuat larutan CMC 0,5%. Temu hitam dibuat dengan menimbang konsentrat temu hitam dan dicampur dengan CMC 0,5% dalam volume 100 mL hingga halus.

6. Uji fitokimia kandungan tanaman

6.1 Uji alkaloid. Sebanyak 1 mL HCl 2N dan 9 mL air suling ditambahkan ke 0,5 gram serbuk simplisia. Kemudian dipanaskan di atas penangas air selama dua menit, kemudian didinginkan dan disaring. Endapan merah bata terbentuk ketika preaksi Dragendorff dicampur dengan filtrat yang diperoleh. Alkaloid yang terbentuk dianggap positif (Harborne, 1987).

6.2 Uji flavonoid. Ditambahkan 10% NaOH ke dua gram serbuk simplisia. Tunggu beberapa saat hingga terbentuk warna kuning, oranye, atau merah, yang menunjukkan adanya flavonoid (Harborne, 1987).

6.3 Uji saponin. Dalam tabung reaksi, dua gram serbuk simplisia dimasukkan dan dicampur dengan sepuluh mililiter air panas. Setelah didinginkan, dikocok dengan kuat selama sepuluh detik. Jika banyak buih terbentuk dalam waktu kurang dari satu menit, ukurannya

antara 1 cm hingga 10 cm, dan tidak hilang meskipun ditambahkan satu tetes HCl 2N, ini menunjukkan adanya saponin (Harborne, 1987).

6.4 Uji tannin. Dalam 10 mililiter air suling, dua gram serbuk simplisia dididihkan selama tiga menit. Kemudian, didinginkan dan disaring. Setelah filtrat diencerkan sampai hampir tidak berwarna, 1-2 tetes pereaksi Besi (III) klorida ditambahkan. Munculnya warna biru kehitaman menunjukkan adanya tannin (Harborne, 1987).

7. Perlakuan hewan uji

Tikus galur Wistar berusia dua hingga tiga bulan dengan berat badan antara 200 dan 300 gram adalah hewan uji dalam penelitian ini. Larutan asam pikrat 10% dalam alkohol diberikan kepada setiap tikus untuk mengidentifikasinya. Tikus dilatih selama tujuh hari sebelum perlakuan, setelah 60 hewan uji dibagi menjadi enam kelompok, masing-masing dengan 10 hewan, masing-masing terdiri dari 5 hewan jantan dan 5 hewan betina. Perlakuan hewan uji dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: Volume larutan uji oral maksimum adalah 5 mL.

Kelompok 1 : kontrol negatif (-) dengan larutan CMC 0,5%

Kelompok 2 : kontrol perlakuan dosis rendah 250 mg/KgBB

Kelompok 3 : kontrol perlakuan dosis sedang 500 mg/KgBB

Kelompok 4 : kontrol perlakuan dosis tinggi 1000 mg/KgBB

Kelompok 5 : Satelit kontrol negative (-) dengan larutan CMC 0,5%

Kelompok 6 : kontrol satelit dosis tinggi 1000 mg/KgBB

Pengujian toksisitas subkronis ekstrak etanol temu hitam (*Curcuma aeruginosa*) dilakukan selama 28 hari dan dilanjutkan kelompok satelit selama 14 hari untuk mengetahui efek toksik tertunda yang bersifat *reversibel*.

8. Pengamatan gejala toksik dan gejala klinis

Pemeriksaan biokimia klinis menurut OECD setidaknya dua enzim yang menunjukkan efek hepatoseluler seperti GOT (*glutamat oksaloasetat transaminase*), GPT (*glutamat piruvat transaminase*), *fosfatase alkali*, *gamma glutamil transferase* (GGT), *glutamat dehidrogenase*), serta asam empedu (bile acids). Dalam beberapa kasus, pengukuran enzim tambahan, seperti bilirubin dan enzim dari organ lain, dapat memberikan informasi. Hewan sebaiknya dipuasakan semalam sebelum diambil darah, terutama untuk pengukuran glukosa (BPOM, 2022). Setiap 28 hari, pengamatan dilakukan untuk mengidentifikasi gejala toksik, termasuk mata merah, piloereksi,

perubahan perilaku, dan perubahan perasa dan sensori. Selain itu, pengamatan dilakukan untuk kelompok satelit selama 14 hari tambahan untuk mengetahui apakah toksik telah sembuh (BPOM, 2014).

9. Monitoring berat badan dan konsumsi makanan

Setiap hewan ditimbang setiap minggunya. Berat badan hewan diperhitungkan saat menentukan volume pengaturan pengujian. Informasi berat badan biasanya diplot pada satu titik setiap minggu dalam perincian untuk membuat penurunan berat badan. Perkiraan konsumsi pakan mingguan direkomendasikan. Perkiraan konsumsi air mingguan juga harus dibuat jika zat uji dikontrol dengan air minum.

10. Pengambilan darah

Sebelum hewan-hewan tersebut dibawa pergi pada akhir pemeriksaan, mereka untuk sementara waktu abstain. Pengaturan umum digunakan untuk melaksanakan metode pengambilan darah. Untuk tujuan evaluasi hematologi, 0,5 mililiter darah digabungkan dengan 0,5 mililiter darah untuk membuat apusan darah dan 10 mililiter antikoagulan (EDTA) untuk jaminan diferensial leukosit. Sisanya ditempatkan ke dalam ruang rotator dan dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit, kemudian dipindahkan ke dalam pancuran es selama hampir 20 menit dan segera disentrifugasi selama 10 menit pada 3000 rpm. Serum kemudian diisolasi dan disimpan pada suhu -200°C di lemari es untuk analisis biokimia klinis.

11. Penimbangan organ

Untuk mengetahui berat total organ, organ tersebut harus dikeringkan terlebih dahulu dengan kertas spons sebelum diukur. Hati, limpa, jantung, ginjal, paru-paru, dan organ target tambahan yang diidentifikasi secara khusus termasuk di antara setidaknya lima organ utama yang ditimbang. Rumus berikut dapat digunakan untuk menentukan beban relatif organ:

$$\text{Bobot organ relatif} = \frac{\text{bobot organ absolut}}{\text{bobot badan}}$$

12. Pemeriksaan aktivitas SGOT dan SGPT

Menjelang awal dan akhir percobaan, darah diambil untuk penilaian biokimia klinis SGOT dan SGPT. Penilaian dilakukan pada saat penyusunan rencana pengujian untuk menentukan apakah ada

dampak ekstrak etanol jahe hitam terhadap fungsi hati. Darah diambil dengan menggunakan jarum steril sebanyak 3-5 ml, satu jarum digunakan untuk satu makhluk hidup dan dijauhkan dari jangkauan air untuk menghindari terjadinya hemolisis. Darah dimasukkan ke dalam rotator silinder dan dibiarkan pada suhu kamar selama 1 saat, kemudian segera disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 300 rpm. Pengujian aktivitas SGOT dan SGPT pada hewan uji dilakukan secara fotomerik dan panjang gelombang 340 nm, tebal kuvet 1 cm pada temperatur 37°C penetapan kadar SGOT/SGPT dapat dilihat pada **tabel 1**.

Tabel 1. Penetapan Kadar SGOT/SGPT

Prosedur	Pada suhu 37°C
Sampel/Serum	100 µL
Reagen kerja	1000 µL
Dicampur lalu didiamkan selama 1 menit kemudian dibaca pada panjang gelombang 340 spektrofotometer nm	

Hasil latihan SGOT dan SGPT yang ditentukan dikomunikasikan dalam satuan/liter dan ditentukan pada setiap pertemuan mencit. Semakin kuat bahan uji hepatoprotektifnya, semakin besar kemampuannya untuk mengimbangi pergerakan aminotransferase. Semakin tinggi kadar SGOT dan SGPT maka semakin tinggi pula derajat kerusakan hati. Pengujian aktivitas SGOT dan SGPT pada hewan uji dilakukan kesimpulan secara fotometrik dengan metode kinetik GPT-ALAT (*Alanin Amino Transferase*) dan GPT-ASAT (*Aspartat Amino Trasferase*).

13. Pembuatan preparat histopatologi

Tikus hidup dibius dan hatinya diambil sebelum dibilas dengan natrium klorida 0,9% untuk pemeriksaan histopatologi. Hati tersebut kemudian ditimbang dan dimasukkan ke dalam panci yang berisi larutan *Bounin*. Sediaan terlindungi dari kerusakan selama proses fiksasi. Kemudian, contoh-contoh tersebut dikeringkan dengan etil minuman keras untuk menghilangkan kelebihan bahan pengikat. Selanjutnya, jaringan dipindah ke Xylena untuk menghilangkan etanol. Paraffin panas kemudian dimasukkan ke dalam jaringan dan menginfiltrasi selama delapan belas hingga enam belas jam. Setelah itu, jaringan akan mengeras dan dibelah menjadi ukuran 3-5 mikrometer.

Lapisan tersebut diaplikasikan pada objek kaca untuk melakukan pengecatan pada tahap selanjutnya. *Hematoxylin* dan *eoxin*, yang mewarnai sitoplasma menjadi merah muda, adalah pewarna yang digunakan. Jaringan tersebut kemudian ditetaskan di atas sedikit air sambil dihangatkan, kemudian diberi setetes kaca, dibiarkan kering, kemudian jaringan tersebut dilihat di bawah lensa pembesar (Leeson *et al.*, 1995)

14. Pemeriksaan histopatologi hati

Preparat histopatologi diperiksa di bawah mikroskop masing-masing pada 5 lapang pandang mikroskopik. Pemeriksaan dengan mikroskop dilakukan dengan pembesaran 1000 kali. Perubahan histopatologi yang diamati meliputi adanya kerusakan sel (piknosis, karioreksis dan kariolisis).

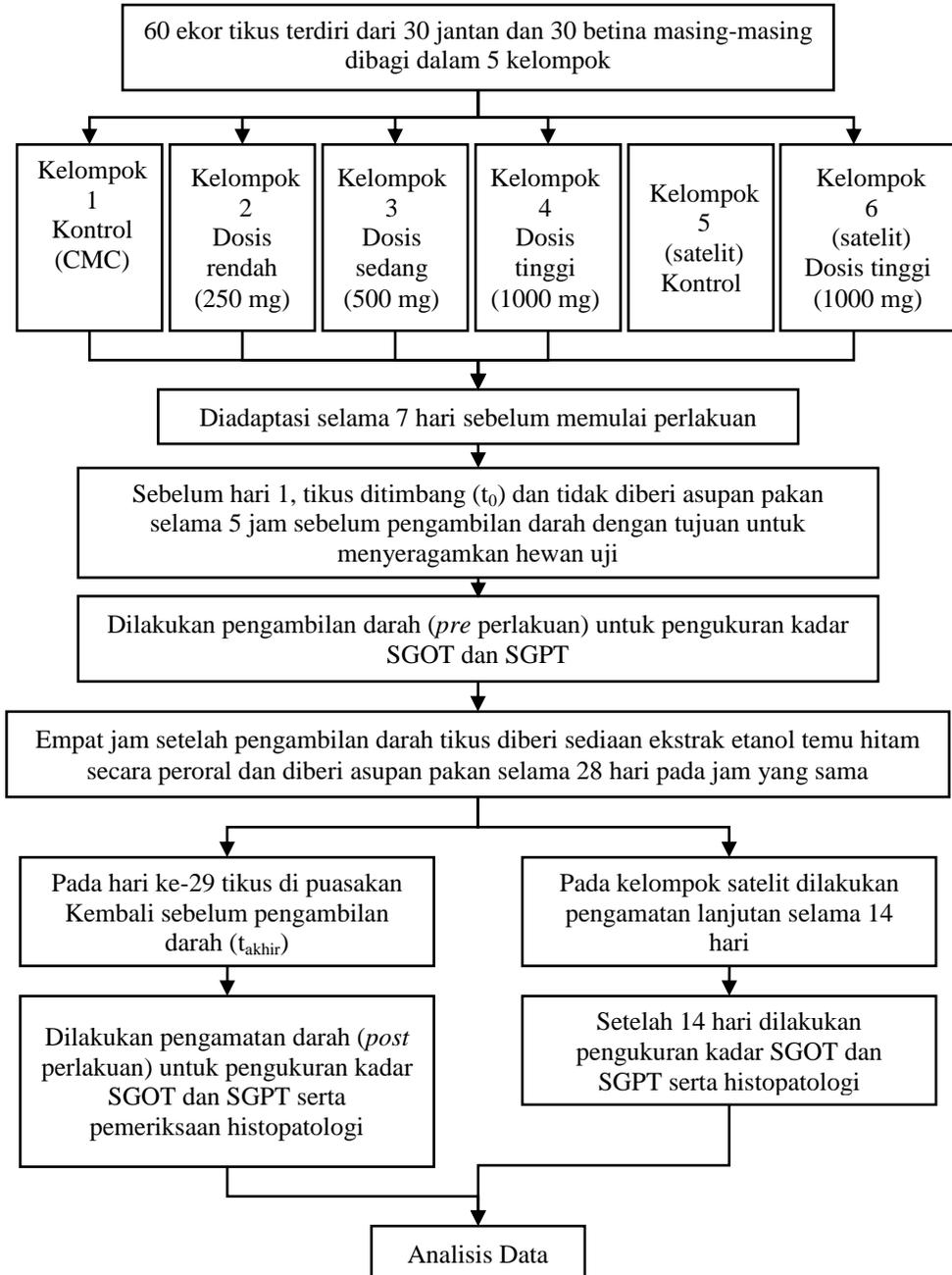
E. Analisa Data

Data yang diperoleh berasal dari penimbangan berat badan dan hasil pemeriksaan biokimia klinis untuk kadar SGOT dan SGPT hewan yang diuji. Untuk menentukan apakah data tersebut terdistribusi normal, uji distribusi normal (*Kolmogorov smirnov*) digunakan sebagai analisis statistik pertama dalam penelitian ini.

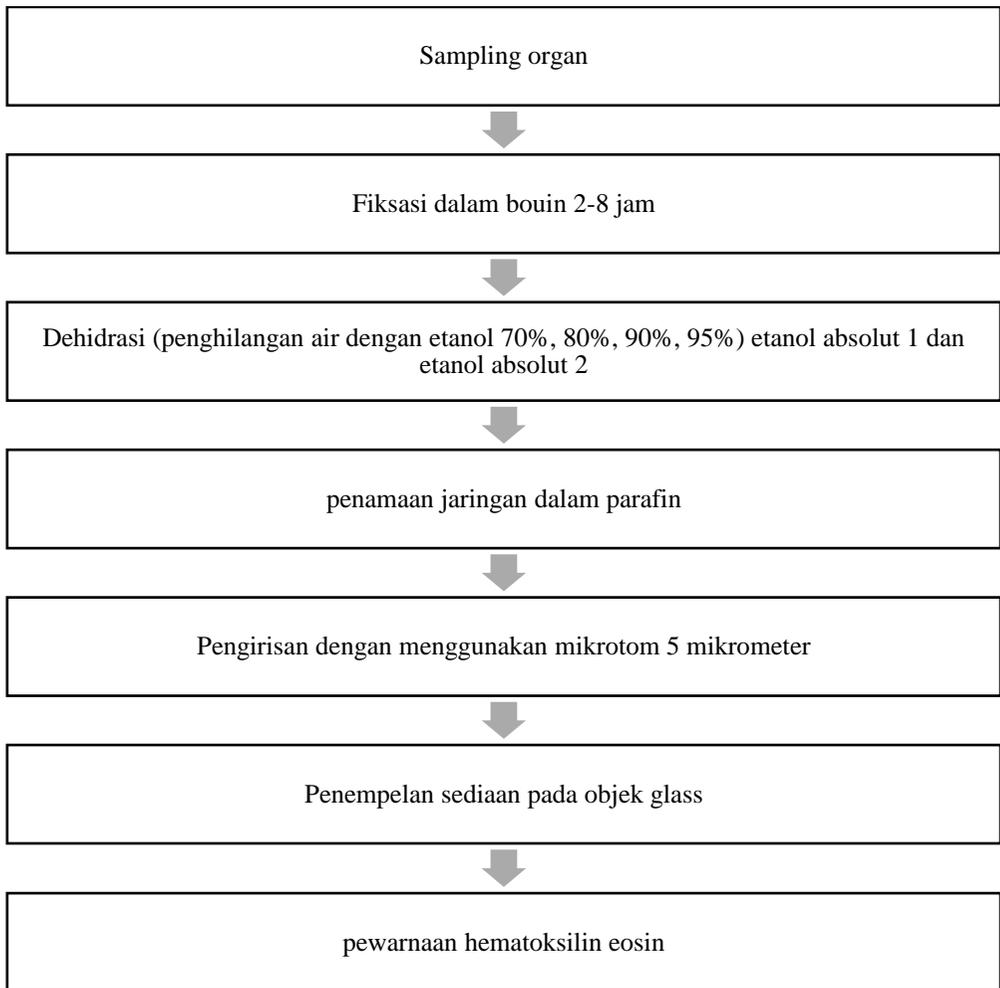
Data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan data terdistribusi tidak normal ($p < 0,05$). Kedua untuk melihat apakah data tersebut memiliki homogenitas varian yang sama atau tidak yaitu dengan menggunakan uji *Levene*. Analisa hasil data presentase kerusakan organ hati dilanjutkan dengan uji parametik (*One Way ANOVA*) untuk mengetahui perbedaan yang bermakna diantara kelompok perlakuan. Apabila hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan ($p < 0,05$) memiliki arti bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan (hasil norma). Sedangkan jika hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan ($p > 0,05$) memiliki arti bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan (hasil tidak norma).

Selanjutnya dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Apabila terdapat perbedaan yang bermakna yang mengetahui kelompok-kelompok yang memiliki perbedaan tersebut.

F. Skema Alur penelitian



Gambar 3. Skema jalan penelitian



Gambar 4. Skema pembuatan preparate histopatologi hati