

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi dalam penelitian ini adalah daun sirsak dan kulit buah naga.

Sampel dalam penelitian ini adalah kulit buah naga merah segar dari buah naga merah segar yang dipetik dari kabupaten gunung kidul provinsi DIY dan daun sirsak segar hijau yang dipetik dari pohon sirsak di kabupaten gunung kidul provinsi DIY serta akan diberikan kepada tikus yang telah diinduksi hiperkolesterolemia dengan telur burung puyuh

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit buah naga dan daun sirsak terhadap klasifikasi aorta tikus. Variabel utama kedua adalah keelastisitas aorta tikus. Variabel utama ketiga pada penelitian ini adalah gambaran histopatologi aorta tikus yang telah diinduksi.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah variabel yang diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak kulit buah naga dan ekstrak daun sirsak yang pernah digunakan sebagai anti hiperkolesterolemia.

Variabel tergantung yang digunakan dalam penelitian ini adalah perubahan klasifikasi dan elastisitas aorta tikus yang telah diinduksi hiperkolesterolemia, serta gambaran histopatologi aorta tersebut.

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah aorta tikus dan telur burung puyuh yang digunakan sebagai induksi hiperkolesterolemia. Variabel terkontrol dianggap berpengaruh terhadap variabel tergantung dan variabel bebas, sehingga perlu ditetapkan kualitasnya agar hasil yang diperoleh dapat diulang dalam penelitian lain.

### 3. Definisi operasional variabel utama.

Pertama, Daun sirsak adalah tanaman yang banyak belum dimanfaatkan lebih, daun sirsak memiliki banyak khasiat salah satunya diketahui dari penelitian terdahulu memiliki aktivitas sebagai obat aterosklerosis.

Kedua, Kulit Buah Naga adalah bagian dari buah naga yang masih belum dimanfaatkan dengan baik, padahal menurut penelitian ekstrak kulit buah naga memiliki efek penurunan aterosklerosis yang baik

Ketiga, Aorta tikus adalah bagian dari arteri yang terbesar. Aorta ini yang diinduksi hiperkolesterolemia dengan telur puyuh untuk melihat pertumbuhan aterosklerosis.

Keempat, Klasifikasi pembuluh darah, dapat dilihat perubahan sebelum dan sesudah induksi.

Kelima, Elastisitas aorta tikus yang dapat kita hitung perbedaan elastisitasnya sesudah induksi dan setelah pemberian ekstrak campuran.

Keenam, Gambaran Histopatologi aorta tikus yang dapat kita lihat perbedaannya sebelum induksi, sesudah induksi, dan setelah perlakuan.

## C. Bahan dan Alat

### 1. Alat:

Tempat untuk melakukan maserasi atau bejana, evaporator, corong, peralatan gelas ( *Pyrex*), timbangan analitik, vortex (Brandstead), pengaduk, *blender*, mikropipet, lemari pendingin, pipet tetes, *laminar air flow*, pipet eppendrof, *inverted microscope*, mikroskop binokuler, *incubator*, corong pisah, alat-alat bedah (gunting, pinset, kapas), timbangan analitik (Ohaus), ayakan nomor 40, timbangan hewan, kandang hewan, *moisture balance*, mortar, stamper, jarum oral, spatel, kaca arloji, cover glass, kaca objek, rotary mikrotom, *cover glass*, *water bath*, cawan porselen, *skin analyzer*, *hot plate*.

### 2. Bahan:

Bahan yang digunakan adalah daun sirsak dan kulit buah naga, telur

puyuh, NaOH, asam nitrat, NaCl 0,9%, formalin 10 %, alkohol 70 %, 95 %, 100 %, xylol, paraffin cair, Haematoxyllin, HCl (Asam chloride) 0,4 N, PTU, Na CMC, simvastatin 10 mg, mayer's albumin glyserin eosin dan bahan lain untuk membuat preparat dari histologi aorta tikus.

### **3. Hewan Percobaan:**

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus galur wistar jantan berjumlah 25 ekor dengan usia 3-4 bulan dengan berat badan 150-220 gram. Tikus diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta. Tikus ditempatkan di kandang dengan sesuai kelompoknya dan ditutup kawat besi.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi tanaman**

Determinasi tanaman berfungsi untuk membuktikan dan memastikan kebenaran sampel dari kulit buah naga merah dan daun sirsak dengan masing-masing dicocokkan ciri-ciri mikroskopis dan makroskopis pada tanaman-tanaman tersebut. Dilakukan keputusannya oleh Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta

### **2. Pengambilan bahan**

Bahan yang digunakan adalah daun sirsak dan kulit buah naga merah, diambil daun sirsak yang masih segar berwarna hijau segar dari pohonnya dan pengambilan buah naga dari pohonnya dengan mengambil buah yang merah segar dan dagingnya disisihkan untuk mengambil kulitnya

### **3. Preparasi sampel**

Daun sirsak di rajang, kemudian dilakukan pengeringan menggunakan oven pada suhu  $<60^{\circ}\text{C}$ . simplisia di sortasi kering kemudian dihaluskan dengan blender. Kulit buah naga merah di rajang, kemudian dilakukan pengeringan menggunakan oven pada suhu  $<60^{\circ}\text{C}$ . simplisia di sortasi kering kemudian dihaluskan dengan blender.

### **4. Pembuatan serbuk**

Daun Sirsak dan Kulit buah naga merah masing-masing sebanyak 3 kg dicuci dengan air mengalir, kemudian udara disirkulasikan dan diatur basah.

Pengeringan diukur dengan kompor pada suhu 45°C sampai kering. Simplisia kering yang diperoleh kemudian disusun kering. Simplisia yang telah kering ditimbang dan dijadikan serbuk melalui blender kemudian diayak dengan ayakan ukuran penampang 40 dan kadar airnya ditaksir menggunakan moisture balance.

### **5. Susut pengeringan serbuk**

Serbuk daun sirsak ditimbang 2 g dimasukan ke dalam Moisture Balance, kemudian ditutup. Lalu mesin menyala dan dicatat nilai % LOD yang ada pada layer untuk diambil sebagai data uji susut pengeringan (Hadisoewignyo dan Fudholi, 2013). serbuk kulit buah naga merah ditimbang 2 g dimasukan ke dalam Moisture Balance, kemudian ditutup. Lalu mesin menyala dan dicatat nilai % LOD yang ada pada layer untuk diambil sebagai data uji susut pengeringan (Hadisoewignyo dan Fudholi, 2013).

### **6. Pembuatan Ekstrak**

Serbuk daun sirsak 500 g dimaserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 selama 2 hari, lalu disaring, dan didapatkan ekstrak cair dipekatkan dengan evaporator sehingga didapatkan ekstrak kental (FHI, 2017)

Serbuk daun sirsak 500 g dimaserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 selama 2 hari, lalu disaring, dan didapatkan ekstrak cair dipekatkan dengan evaporator sehingga didapatkan ekstrak kental (FHI, 2017)

### **7. Kadar air ekstrak**

Ditimbang seksama 1 gram ekstrak kulit buah naga dalam kualiti porselen tertutup yang telah dipanaskan sebelumnya pada 105 ° C selama 30 menit dan telah dicairkan. Luruskan dengan cara digoyang-goyangkan hingga menjadi lapisan yang tebal (5 mm – 10 mm) dan dikeringkan pada suhu pengaturan hingga berat tetap, buka bagian atasnya, biarkan panci tertutup dan didinginkan dalam desikator hingga suhu kamar, kemudian pada saat itu. catat berat tetap yang diperoleh dari hasil ini untuk memastikan tingkat hasil penguapan kadar air dari ekstrak.

Ditimbang seksama 1 gram ekstrak daun sirsak dalam kualiti porselen tertutup yang telah dipanaskan sebelumnya pada 105 ° C selama 30 menit dan telah dicairkan. Luruskan dengan cara digoyang-goyangkan hingga menjadi

lapisan yang tebal (5 mm – 10 mm) dan dikeringkan pada suhu pengaturan hingga berat tetap, buka bagian atasnya, biarkan panci tertutup dan didinginkan dalam desikator hingga suhu kamar, kemudian pada saat itu. catat berat tetap yang diperoleh dari hasil ini untuk memastikan tingkat hasil penguapan kadar air dari ekstrak.

## 8. Kandungan kimia ekstrak

**8.1. Uji Flavonoid.** Ekstrak masing-masing diambil 0,5 g kemudian dimasukan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan aquadest panas. Panaskan hingga larut. Kemudian tambahkan mg 0,1 g dan 2 tetes HCl + amil alkohol. Flavonoid ditandai lapisan etanol berwarna merah (Anggreany *et al.*, 2020)

**8.2. Uji Alkaloid.** Tes Mayer, 2 ml ekstrak diambil dalam tabung reaksi, tambahkan 0,2 ml HCl dan 0,1 ml reagen mayer. Pembentukan presipitat berwarna kekuningan membuktikan tes positif. Tes Dragendroff 0,2 ml HCl dan 0,1 ml reagen Dragendroff ditambahkan dalam 2 ml larutan ekstrak. Endapan berwarna coklat jingga menentukan adanya alkaloid. Tes Wagner 2 ml ekstrak yang dilarutkan dalam HCl 0,2 ml dan 0,1 ml reagen wagner. Pembentukan presipitat coklat kemerahan menandakan respon positif alkaloid

**8.3. Uji Saponin.** 2 ml ekstrak dipanaskan kemudian disaring filtratnya lalu setelah dingin dikocok searah vertikal. Jika masih terbentuk busa 1 cm maka positif senyawa saponin (Anggreany *et al.*, 2020)

**8.4. Uji Tanin.** Ekstrak 2 ml dimasukan ke dalam tabung reaksi ditambah 5 ml tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%. Hasil positif jika berwarna hijau kehitaman (Puspita Sari *et al.*, 2015)

## 9. Uji Kolesterol Tikus

Tikus berjumlah 25 ekor tikus yang telah diinduksi hiperkolesterolemia dengan telur puyuh 2ml/hari dan PTU 0,02% dengan dosis 10 mg/kg BB Tikus dalam suspensi *Na CMC* 0,5%. Lalu akan dibagi menjadi 5 kelompok yaitu (kelompok I kontrol negatif *Na CMC* 0,5%, kelompok II positif Simvastatin 18 mg/kg BB tikus, kelompok III, IV, dan V ekstrak kombinasi perbandingan dosis kulit buah naga merah: daun sirih, 200:100 mg/kg; 150:150 mg/kg dan 100:200 mg/kg BB tikus. Penentuan kadar kolesterol dilakukan pada sebelum perlakuan

(T0), sesudah diinduksi hiperkolesterolemia (T1) dan setelah dilakukan perlakuan kelompok (T2). Pengukuran ini bertujuan untuk melihat tingkat kenaikan dan penurunan dari kadar kolesterol yang dapat terjadi akibat pemberian induksi dan perlakuan kelompok. Pengambilan sampel dilakukan dengan tes stik kolesterol.

#### **10. Klasifikasi Aorta Tikus**

Tikus yang telah diuji diambil pembuluh darah untuk menghitung kadar kalsium dalam pembuluh darah sebagai salah satu klasifikasi terjadinya pembentukan sel busa atau kerusakan pada pembuluh darah tikus yang telah diberi perlakuan kelompok. Pengambilan jaringan pembuluh darah aorta tikus dilakukan pada minggu ke-4, sampel yang diambil langsung dianalisis kadar kalsiumnya yang berada pada jaringan aorta tikus tersebut menggunakan *Atomic Absorbance Spectrophotometric* (AAS) Hitachi.

#### **11. Uji Elastisitas Kulit Tikus**

Penentuan kadar kolagen dari tikus dilakukan dengan menggunakan alat skin analyzer. Kulit tikus di cukur rambutnya lalu kulit punggung di scan atau dibaca dengan alat skin analyzer dan melihat kadar kolagen dari tiap kelompok tikus yang ada. Diharapkan kadar kolagen yang ada dari alat skin analyzer dapat merujuk sebagai hasil elastisitas aorta tikus yang telah diinduksi dan diberikan perlakuan uji.

#### **12. Uji Histopatologi Aorta**

Organ jantung Tikus dibedah dan proses clearing (dicuci xylol 2 kali) kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9%, kemudian difiksasi dengan larutan formalin 10% selama 3 jam dan dibersihkan kembali dengan cairan, kemudian dimasukan ke dalam cairan parafin selama 2 jam dan didiamkan (3,5 jam pada 56-60°C), kemudian jaringan tersebut dibenamkan ke dalam cetakan dengan media parafin murni. Kemudian, buatlah kayu persegi dan kemudian potong menggunakan mikrotom berputar dengan ketebalan 5  $\mu\text{m}$ . Digabungkan dengan slide yang baru saja ditempel dengan semen gliserin putih telur Mayer, kemudian dikeringkan di udara. Dimasukan ke dalam pancuran air yang berisi air dengan suhu paling besar 40°C. Kemudian potongan yang telah diletakkan pada kaca objek tersebut di deparafinisasi dengan xylol beberapa kali selama 5 menit.

Kemudian, kemudian cuci dan rehidrasi dengan alkohol. Pewarnaan dengan hematoxylin selama 2 menit. Dichelupkan ke dalam 2-3 tetes larutan HCl 0,4 N, kemudian diwarnai dengan eosin selama 5 menit. Keringkan menggunakan alkohol 70%, 95%, 100% beberapa kali selama 2 menit, kemudian, pada saat itu bersihkan xylol beberapa kali 2 menit. Udara kering. Kemudian, kemudian lihat di bawah lensa pembesar.

### **E. Analisis Hasil**

Data yang diperoleh dianalisis dengan program yaitu SPSS (Statistical and Product Service Solution) versi 18. Untuk mengetahui perbedaan antara kadar kalsium dan kadar kolagen antar kelompok uji dengan metode anova satu jalan, dimana apabila ada perbedaan yang signifikan maka akan dilanjutkan dengan uji Tukey dengan akurasi 95%. Gambaran histopatologi aorta secara semikuantitatif akan mendukung penjelasan dari 2 data yaitu klasifikasi aorta dan elastisitas aorta.