BAB III METODE PENELITIAN

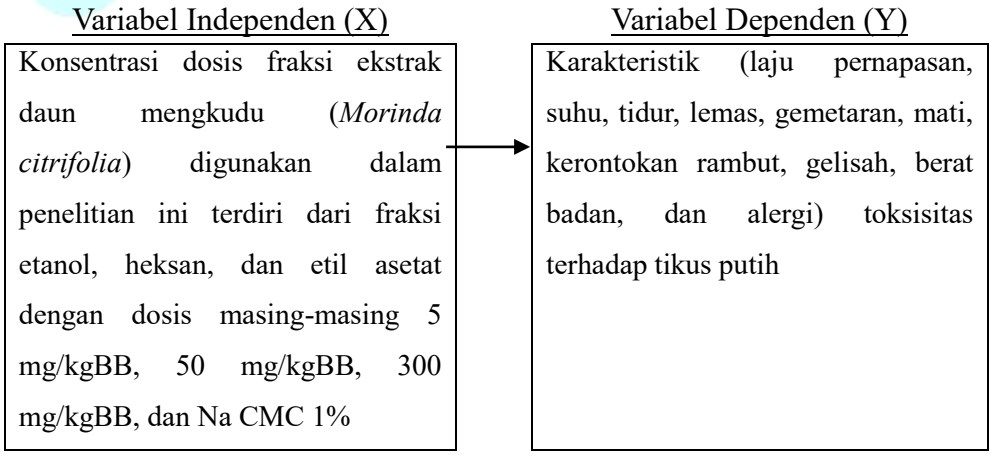
A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *post-only* dengan kelompok kontrol. Pengujian dilakukan menggunakan metode Kelas Toksik Akut, yaitu metode yang memungkinkan penentuan nilai LD_{50} hanya dengan dua dosis: satu dosis yang menghasilkan angka kematian lebih dari 0% dan dosis lainnya yang menghasilkan angka kematian kurang dari 100%.(BPOM, 2022).

Dalam penelitian ini, hewan uji dibagi secara acak menjadi 10 kelompok, yang terdiri dari 1 kelompok kontrol negatif dan 9 kelompok perlakuan. Preparat uji diberikan secara bertahap sesuai prosedur, dengan semua kelompok menggunakan hewan uji jantan sebagai satu-satunya jenis kelamin yang digunakan.

B. Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini variabel digunakan untuk mengamati hubungan antara variabel bebas (X) yang berperan sebagai faktor yang mempengaruhi, dengan variabel terikat (Y) yang merupakan variabel yang dipengaruhi.



Gambar 3.1: Pengaruh Variabel Independent dan Variabel Dependent

C. Definisi Operasional

Tabel 3.1: Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat Ukur/Metode	Hasil Ukur	Skala
Independen				
Dosis ekstrak etanol, heksan ,etil asetat daun mengkudu (*Morinda citrifolia*)	Konsentrasi sediaan fraksi ekstrak etanol, heksan, etil asetat daun mengkudu (*Morinda citrifolia*) 5mg/mgBB, 50 mg/kgBB, 300 mg/kgBB,	Timbangan	Mg/kgBB	Rasio
Dependen				
Karakteristik (laju pernapasan, suhu, tidur, lemas, makan, gemetaran, mati, kerontokan rambut, gelisah, berat badan, dan alergi) toksisitas terhadap tikus putih	Kejadian toksik selama 14 hari pengamatan	Lembar pengamatan	Iya/tidak	Ordinal

Kemenkes Poltekkes Bengkulu

D. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada November 2024 – Mei 2025, bertempat di Laboratorium Farmakologi Poltekkes Kemenkes Bengkulu.

E. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih, sedangkan sampel penelitian berupa daun mengkudu. Sampel yang digunakan telah diseleksi berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

1. **Kriteria Inklusi**
   a. Tikus Jantan
   b. Memiliki berat badan antara 120-200 gram, dengan variasi bobot tidak lebih dari 20%
   c. Umur 6-8 minggu
2. **Kriteria Eksklusi**

   Tikus putih yang dalam masa penelitian ditemukan dalam kondisi sakit atau mengalami kematian.
3. **Jumlah Sampel**

   Penelitian ini menggunakan 10 kelompok hewan uji, yang terdiri dari 9 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol negatif. Setiap kelompok terdiri dari 3 ekor tikus jantan.

F. Tahap Pelaksanaan Penelitian

1. **Tahap Pra Analitik**
   a. Pengurusan Perizinan

      Mahasiswa memproses izin secara mandiri melalui beberapa tahap. Pertama, mereka mendaftar daring melalui situs web resmi Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Bengkulu. Setelah menyelesaikan proses input data penelitian, mereka mengunjungi bagian Administrasi Akademik (ADAK) Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Bengkulu untuk mencetak izin pra-penelitian. Izin yang telah dicetak kemudian dapat diambil dan digunakan untuk keperluan penelitian.

   b. Pengurusan Etik Penelitian

      Pengurusan etik penelitian dilakukan mandiri oleh mahasiswa, dengan cara mengakses lewat link, kemudian membuat akun yang disertakan slip pembayaran

Kemenkes Poltekkes Bengkulu

Etical Clereance(EC), terlebih dahulu daftar akun kemudian itu login menggunakan akun yang sudah dibuat, mahsiswa mengisi bagian pengajuan, protokol, assessment, lalu mengirimkan berkas tersebut ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan di Poltekkes Kemenkes Bengkulu.

c. Alat dan Bahan

1) Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain timbangan analitik, blender, batang pengaduk, gelas ukur, gelas kimia, lumpang dan alu, kertas saring, spuit, probe oral untuk mencit, cawan porselin, sendok tanduk, sarung tangan, kain, timbangan khusus untuk hewan uji, dan tisu.

2) Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi pakan tikus berupa pelet, jagung, air sebagai air minum tikus, daun mengkudu yang diperoleh dari Kota Bengkulu, Provinsi Bengkulu, etil asetat, tikus putih, dan CMC Na 1%.

2. Tahap Analitik

a. Persiapan Sampel

Tahap pertama adalah identifikasi tanaman. Selanjutnya, sampel daun mengkudu (*Morinda citrifolia*) dikumpulkan dari Kota Bengkulu, Provinsi Bengkulu.

b. Pengolahan Sampel

1) Pengumpulan Bahan

Tahap pengumpulan bahan baku memainkan peran krusial dalam menentukan kualitas bahan yang dihasilkan. Faktor utama yang memengaruhi tahap ini adalah proses dan teknik pemanenan mengkudu, yaitu pemilihan

daun yang cukup matang tetapi belum layu, dan berukuran sedang tidak terlalu besar maupun terlalu kecil.

2) Sortasi Basah

Penyortiran basah adalah proses penyortiran dan pemisahan bagian tanaman yang diinginkan dari bagian yang tidak diinginkan, termasuk kotoran dan bahan asing lainnya, saat tanaman masih segar.

3) Pencucian

Proses pencucian bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang menempel, terutama tanah dan residu pestisida. Pencucian dilakukan dengan menggunakan air bersih yang mengalir untuk memastikan bahan benar-benar bebas dari kotoran.

4) Perajangan

Daun mengkudu dirajang agar memudahkan pada saat proses pengeringan.

5) Pengeringan

Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air pada sampel guna mencegah pertumbuhan bakteri dan kerusakan. Selain itu, proses ini juga menyederhanakan pemrosesan pada tahap selanjutnya.

6) Sortasi Kering

Sortasi kering adalah tahap pemilihan bahan yang dilakukan setelah proses pengeringan selesai. Tujuan penyortiran kering adalah untuk memisahkan bagian-bagian bahan yang rusak dan menghilangkan sisa kotoran atau pengotor dari tanaman obat kering.

7) Pengepakan dan Penyimpanan

Kemenkes Poltekkes Bengkulu

Setelah melalui proses pengeringan dan penyortiran, tanaman obat disimpan dalam wadah tertutup rapat untuk mencegah kontaminasi oleh zat asing. Wadah berisi tanaman obat kemudian diletakkan di rak penyimpanan. Tanaman obat kering dapat disimpan pada suhu ruangan, antara 15-30°C.

c. Pembuatan Ekstraksi Sampel

Sebanyak 1,5 kg simplisia daun mengkudu kering ditimbang, kemudian dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Simplisia direndam hingga terendam seluruhnya selama 3-5 hari sambil sesekali diaduk. Setelah proses perendaman selesai, campuran disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat atau ekstrak kasar dari ampasnya. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental.

d. Pembuatan Fraksinasi Sampel

Setelah mendapatkan ekstrak kental daun mengkudu menggunakan etanol sebagai pelarut, langkah selanjutnya adalah memisahkan senyawa berdasarkan polaritasnya. Fraksinasi cair-cair dilakukan dengan melarutkan ekstrak kental dalam air, kemudian mengocoknya dengan pelarut organik nonpolar, heksana, dengan rasio 1:1 (v/v). Campuran kemudian didiamkan selama 10–15 menit hingga terbentuk dua lapisan terpisah, dan lapisan heksana terpisah. Proses ini diulang beberapa kali untuk memastikan semua senyawa nonpolar telah dihilangkan. Setelah itu, pelarut diganti dengan etil asetat sebagai pelarut semipolar, diikuti dengan etanol, menggunakan prosedur yang sama seperti untuk fraksi heksana, menghasilkan fraksi etil asetat dan etanol. Metode ini memisahkan senyawa dengan tingkat polaritas yang berbeda-beda menjadi fraksi-fraksinya masing-masing. Setiap fraksi kemudian diuapkan dengan pemanasan dalam penangas air hingga diperoleh fraksi kental yang siap untuk pengujian lebih lanjut.

e. Desain Eksperimen

Estimasi besar sampel dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus:

$n = (15 + p) : p$

$n = (15 + 9) : 9$

$n = 2,66 \approx 3$

Keterangan: p = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah sampel

15 = nilai konstanta (Indra, 1999)

Jadi, jumlah subjek per kelompok 3 ekor.

Hewan percobaan dalam penelitian ini dibagi menjadi 10 kelompok, yang terdiri dari 9 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol negatif. Setiap kelompok terdiri dari 3 ekor tikus putih, sehingga total hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 ekor.

f. Fase Adaptasi Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus putih jantan dengan berat minimal 120 gram. Setelah ditimbang untuk memastikan keseragaman, tikus-tikus tersebut dibagi secara acak menjadi 10 kelompok yang masing-masing terdiri dari tiga ekor dan ditempatkan di kandang terpisah. Sebelum perlakuan, tikus-tikus tersebut diaklimatisasi selama 7 hari dengan diberi pakan pelet dan air minum.

g. Pembuatan Larutan Na CMC 1%

Larutan Na CMC 1% dibuat dengan melarutkan 1 gram Na CMC dalam 10 mL air suling panas. Larutan ini kemudian diaduk hingga homogen, kemudian ditambahkan air suling hingga mencapai volume 100 mL.

h. Pembuatan Sediaan Uji Fraksi Ekstrak Etanol, Heksan, Etil Asetat Daun Mengkudu

Kemenkes Poltekkes Bengkulu

Sediaan uji disiapkan dalam tiga dosis: 5 mg/kgBB, 50 mg/kgBB, dan 300 mg/kgBB. Setiap ekstrak ditimbang sesuai dosis, kemudian dimasukkan ke dalam lumpang berisi suspensi Na CMC 1%, dan digiling hingga tercampur homogen. Sediaan uji ini disiapkan setiap hari sebelum perlakuan, karena berat ekstrak disesuaikan dengan berat badan mencit pada hari pemberian.

i. Prosedur Kerja

Dalam penelitian ini, prosedur kerja dilakukan dengan mengikuti tahapan-tahapan sebagai berikut:

1) Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan, termasuk 30 ekor tikus jantan, larutan Na CMC 1%, serta fraksi ekstrak etanol, heksan, dan etil asetat daun mengkudu.
2) Tikus putih dengan berat badan minimal 120 gram ditimbang terlebih dahulu, kemudian dikelompokkan dan dibagi menjadi 10 kelompok, masing-masing kelompok berisi 3 ekor tikus.
3) Tikus diberikan nomor atau kode pada bagian ekor tikus
4) Tikus putih diaklimatisasi selama 7 hari di kandang individu, diberi pakan standar berupa pelet dan air minum selama masa adaptasi.
5) Hari ke 8 tikus ditimbang berat badannya dan dicatat.
6) Tikus pada masing-masing kelompok diberi perlakuan mulai hari ke-8 sampai hari ke-21, dengan rincian sebagai berikut:
   a) Perlakuan 1 (P1)

      Sebelum perlakuan, hewan uji ditimbang dan setiap kematian selama periode aklimatisasi dicatat. Selanjutnya, hewan uji diberikan 2 mL ekstrak etanol daun mengkudu dengan dosis 5 mg/kgBB yang dilarutkan

dalam CMC 1% Na, secara oral sekali sehari selama 14 hari. Pengamatan intensif dilakukan selama 6 jam setelah pemberian.

b) Perlakuan 2 (P2)

Sebelum perlakuan, hewan uji ditimbang dan setiap kematian selama periode aklimatisasi dicatat. Selanjutnya, hewan uji diberikan 2 mL ekstrak etanol daun mengkudu dengan dosis 50 mg/kgBB yang dilarutkan dalam CMC 1% Na, secara oral sekali sehari selama 14 hari. Pengamatan intensif dilakukan selama 6 jam setelah pemberian.

c) Perlakuan 3 (P3)

Sebelum perlakuan, hewan uji ditimbang dan setiap kematian selama periode aklimatisasi dicatat. Selanjutnya, hewan uji diberikan 2 mL ekstrak etanol daun mengkudu dengan dosis 300 mg/kgBB yang dilarutkan dalam CMC 1% Na, secara oral sekali sehari selama 14 hari. Pengamatan intensif dilakukan selama 6 jam setelah pemberian.

d) Perlakuan 4 (P4)

Sebelum perlakuan, hewan uji ditimbang dan setiap kematian selama periode aklimatisasi dicatat. Selanjutnya, hewan uji diberikan 2 mL ekstrak heksan daun mengkudu dengan dosis 5 mg/kgBB yang dilarutkan dalam CMC 1% Na, secara oral sekali sehari selama 14 hari. Pengamatan intensif dilakukan selama 6 jam setelah pemberian.

e) Perlakuan 5 (P5)

Sebelum perlakuan, hewan uji ditimbang dan setiap kematian selama periode aklimatisasi dicatat. Selanjutnya, hewan uji diberikan 2 mL ekstrak heksan daun mengkudu dengan dosis 50 mg/kgBB yang dilarutkan

dalam CMC 1% Na, secara oral sekali sehari selama 14 hari. Pengamatan intensif dilakukan selama 6 jam setelah pemberian.

f) Perlakuan 6 (P6)

Sebelum perlakuan, hewan uji ditimbang dan setiap kematian selama periode aklimatisasi dicatat. Selanjutnya, hewan uji diberikan 2 mL ekstrak heksan daun mengkudu dengan dosis 300 mg/kgBB yang dilarutkan dalam CMC 1% Na, secara oral sekali sehari selama 14 hari. Pengamatan intensif dilakukan selama 6 jam setelah pemberian.

g) Perlakuan 7 (P7)

Sebelum perlakuan, hewan uji ditimbang dan setiap kematian selama periode aklimatisasi dicatat. Selanjutnya, hewan uji diberikan 2 mL ekstrak etil asetat daun mengkudu dengan dosis 5 mg/kgBB yang dilarutkan dalam CMC 1% Na, secara oral sekali sehari selama 14 hari. Pengamatan intensif dilakukan selama 6 jam setelah pemberian.

h) Perlakuan 8 (P8)

Sebelum perlakuan, hewan uji ditimbang dan setiap kematian selama periode aklimatisasi dicatat. Selanjutnya, hewan uji diberikan 2 mL ekstrak etil asetat daun mengkudu dengan dosis 50 mg/kgBB yang dilarutkan dalam CMC 1% Na, secara oral sekali sehari selama 14 hari. Pengamatan intensif dilakukan selama 6 jam setelah pemberian.

Perlakuan 9 (P9)

Sebelum perlakuan, hewan uji ditimbang dan setiap kematian selama periode aklimatisasi dicatat. Selanjutnya, hewan uji diberikan 2 mL ekstrak etil asetat daun mengkudu dengan dosis 5 mg/kgBB yang

dilarutkan dalam CMC 1% Na, secara oral sekali sehari selama 14 hari. Pengamatan intensif dilakukan selama 6 jam setelah pemberian.

i) Kontrol Negatif (P10)

Hewan uji diberi 2 mL larutan Na CMC 1% secara oral setiap hari selama 14 hari.

7) Pengamatan dilanjutkan hingga 14 hari, meliputi pengamatan gejala toksik dan tanda-tanda klinis seperti perubahan pada kulit, tidur, lemas, kerontokan rambut, gelisah, kejang, mata memerah, dan berjalan mundur.

8) Menganalisis LD_{50} selama 14 hari pada penelitian diharapkan dapat mengetahui 50% kematian hewan uji.

3. Tahap Pasca Analitik

Interpretasi hasil pengamatan potensi toksisitas berdasarkan LD_{50} ini dilakukan untuk mengukur 50% angka kematian pada kelompok hewan uji.

4. Pengumpulan dan Analisis Data

a. Pengumpulan Data

Data didapatkan dari perolehan catatan harian selama observasi efek toksik dikumpulkan masing-masing kelompok perlakuan. Seperti alergi, mata memerah, kerontokan rambut, mati, gelisah, kejang, cenderung mengarah pada tempat air, diare, lemes, berat badan berkurang, tidur, dan koma.

b. Analisis Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini meliputi data kualitatif, termasuk perubahan berat badan dan perilaku hewan uji (disajikan dalam tabel terlampir), serta data kuantitatif, termasuk jumlah kematian hewan. Data kuantitatif ini kemudian dianalisis menggunakan skala klasifikasi toksisitas Hodge dan Sterner untuk memperoleh nilai LD_{50}.