

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

3.1.1 Metode penelitian

Metode penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorium untuk memperoleh data hasil uji toksisitas infusa daun sirsak (*Annona muricata* L.) pada hewan uji mencit. Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yaitu ekstraksi dengan menggunakan metode infundasi dan uji toksisitas akut.

3.1.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2020 sampai dengan Februari 2021. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Sains, Teknologi, dan Kesehatan Universitas Sahid Surakarta.

3.1.3 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini, yaitu blender (*miyako*), kandang mencit (*metabolic cage*), timbangan (*ohaus*), kain flanel, kertas saring, panci (aluminium), hot plate (Maspion), termometer alco, sonde oral (BioMed), sarung tangan (OneMed), alat-alat gelas (*pyrex*): gelas ukur, pipet volume, batang pengaduk, dan beaker glass.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini, yaitu daun sirsak (*Annona muricata* L) diperoleh dari rumah warga daerah Gentan Kartasura Jawa Tengah, aquadest, dan mencit (*Mus musculus* L.) yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan UGM Yogyakarta.

3.2 Besar Sampel

Mencit yang digunakan berjumlah 5 ekor tiap dosis infusa. Pada penelitian ini dibuat empat dosis konsentrasi infusa daun sirsak (*Annona muricata* L) dan satu kontrol negatif. Setiap konsentrasi dan kontrol negatif dilakukan triplo. Jadi, jumlah total sampel yang diperlukan adalah 25 ekor mencit (*Mus musculus* L.).

3.3 Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas : Konsentrasi dosis infusa daun sirsak (*Annona muricata* L.).
- b. Variabel tergantung : Nilai LD₅₀ optimum pada infusa daun sirsak (*Annona muricata* L.)
- c. Variabel terkontrol : Metode ekstraksi pembuatan infusa, metode uji toksisitas akut, berat badan mencit, dan jenis kelamin mencit (jantan).

3.4 Definisi Operasional

3.4.1 Infusa daun sirsak

Infusa daun sirsak diperoleh dengan cara merebus simplisia kering daun sirsak sebanyak 6,0 gram dalam pelarut aquadest 100 mL pada suhu 90°C selama 15 menit, kemudian disaring menggunakan kain flanel (Imelda, 2013).

3.4.2 Uji Toksisitas akut

Uji toksisitas akut merupakan uji ketoksikan infusa daun sirsak yang diberikan dengan tingkatan dosis yang berbeda pada dosis tunggal selama 1 x

24 jam sebanyak 0,5 mL dengan dosis 5.565, 78.623, 175.362, 386.956 mg/kgBB dan aquadest sebagai kontrol negatif.

3.5 Bahan Penelitian

3.5.1 Subyek Uji

Subyek uji yang digunakan adalah mencit jantan galur *swiss webster*, berat badan 20 – 25 gram, berumur 2 – 3 bulan, diperoleh dari “Unit Pengembangan Hewan Percobaan UGM Yogyakarta”

3.5.2 Bahan Uji

Daun sirsak yang dipilih adalah daun antara pucuk dan pangkal daun, memiliki warna yang hijau dan segar, mulus dan tidak berbintik. Daun sirsak ini diperoleh dari kebun warga Kartasura, Jawa Tengah.

3.5.3 Kontrol Negatif

Kontrol negatif berupa aquadest yang didapat dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Sains, Teknologi dan Kesehatan Universitas Sahid Surakarta.

3.6 Rencana Jalannya Penelitian

3.6.1 Determinasi Daun Sirsak

Determinasi daun sirsak dilakukan dengan cara mencocokkan ciri-ciri tanaman sirsak yang didapatkan dari kebun warga Kartasura, Jawa Tengah dan dilakukan determinasi di Universitas Setia Budi Jl. Letjen Sutoyo, Mojosongo, Kec. Jebres, Kota Surakarta, Jawa Tengah.

3.6.2 Pembuatan Simplisia serbuk daun sirsak

Daun sirsak yang telah dipetik dari kebun, dibersihkan terlebih dahulu dari debu yang menempel pada daun dengan cara diusap dengan tissue kering atau kain lap. Selanjutnya daun sirsak di cuci dengan air mengalir kemudian dikeringkan lagi dengan tissue kering atau kain lap.

Setelah proses pencucian dan pengeringan maka daun sirsak diiris-iris halus dan kemudian di oven dengan suhu 50°C selama 3 hari atau 72 jam. Daun sirsak yang telah dioven, dihaluskan untuk memperkecil ukuran partikel dan menjadi simplisia serbuk dengan cara diblender, lalu diayak dengan ayakan no.40.

Simplisia serbuk daun sirsak ditempatkan dalam stoples kering yang kemudian ditutup rapat untuk meminimalkan kontaminasi dengan lingkungan.

3.6.3 Pembuatan infusa daun sirsak

Serbuk ditimbang sesuai dengan dosis yang telah ditentukan, kemudian dilarutkan dalam panci infusa dengan aquades 100 mL, dipanaskan di atas tangas air selama 15 menit terhitung mulai suhu mencapai 90°C sambil sekali-sekali diaduk. Diserkai selagi panas dengan kain flanel, kemudian ditambahkan air panas secukupnya pada ampas hingga diperoleh volume infusa sebanyak 100 mL.

3.6.4 Prosedur Uji Pendahuluan

a. Uji Alkaloid

Pengujian dilakukan dengan mengambil masing-masing 2 mL sampel

daun sirsak yang telah diekstraksi dengan pelarut air ke dalam 2 buah

tabung reaksi yang berbeda. Setelah itu masing-masing ekstrak ditambah dengan 5 tetes reagen dragendroff. Jika masing-masing larutan terbentuk endapan jingga maka positif mengandung alkaloid. Selanjutnya untuk pengujian Alkaoid dengan menggunakan reagen mayer dilakukan dengan cara mengambil masing-masing sebanyak 2 mL sampel daun sirsak yang telah diekstraksi dengan pelarut air ke dalam 2 buah tabung reaksi yang berbeda. Setelah itu masing-masing ekstrak ditambah 3 tetes asam klorida pekat dan 5 tetes reagen mayer. Jika masing-masing larutan terbentuk endapan putih maka sampel positif mengandung alkaloid (Mustikasari and Ariyani, 2010).

- b. Uji Flavonoid Pengujian dilakukan dengan cara mengambil masing-masing sebanyak 2 mL sampel daun sirsak yang telah diekstraksi dengan pelarut air. Ditambahkan dengan beberapa tetes larutan soda api (NaOH). Terbentuknya warna kuning yang terang dan berubah menjadi tidak berwarna (jernih) jika ditambah dengan larutan asam encer menunjukkan adanya kandungan flavonoid (Roopashree dkk., 2008).
- c. Uji Terpenoid Pengujian dilakukan dengan cara mengambil masing-masing sebanyak 2 mL sampel daun sirsak yang telah diekstraksi dengan pelarut air dan etanol. Setelah itu masing-masing ekstrak, ditambahkan dengan 2 mL chloroform. Selanjutnya 3 mL H₂SO₄ pekat ditambahkan ke dalamnya secara bertetes-tetes hingga terbentuk lapisan. Jika terbentuk warna coklat kemerahan pada batas antar lapisan, maka ekstrak tersebut mengandung terpenoid (Abbas dkk., 2012)

- d. Uji Tanin Pengujian dilakukan dilakukan dengan cara mengambil masing-masing sebanyak 2 mL sampel daun sirsak yang telah diekstraksi dengan pelarut air, kemudian dipanaskan kurang lebih 5 menit. Setelah dipanaskan masing-masing ditambahkan beberapa tetes FeCl₃ 1%. Jika masing-masing larutan terbentuk warna coklat kehijauan atau biru kehitaman maka positif mengandung tanin (Marlinda dkk, 2012).

3.6.5 Penetapan dosis infusa daun sirsak

Penentuan peringkat dosis berdasarkan pengobatan di masyarakat sehari-hari, yaitu menggunakan kurang lebih 10 lembar daun sirsak, setara dengan 2 gram, maka dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2 g/70 kgBB manusia. Diperoleh konversi manusia ke mencit 0,0026 gram/kgBB (Imelda, 2013).

Dosis untuk mencit 20 gram : $f_k \times$ dosis absolut

$$: 0,0026 \times 2 \text{ gram/kgBB}$$

$$: 0,0052 \text{ gram/20gramBB mencit}$$

Range BB mencit 22-25 gram (Depkes, 2008)

Dosis untuk mencit 22 gram :

$$\frac{22 \text{ g}}{20 \text{ g}} \times 0,0052 \text{ g} = 0,00572 \text{ g} = 5,72 \text{ mg/22gBB mencit}$$

Penetapan dosis infusa daun sirsak berdasarkan hasil orientasi diperoleh konsentrasi infusa daun sirsak (C): 6,0 gram/100 mL (Imelda, 2013). Untuk memperoleh dosis tertinggi infusa daun sirsak, maka dihitung menggunakan konsentrasi 6,0 gram/100 mL dengan rumus:

Berat mencit 25 gram :

$$D \times BB = C \times V$$

$$D \times 25 = \frac{6,0}{100} \times 0,5$$

$$D = 0,0012 \text{ g/gBB}$$

$$D = 1,200 \text{ mg/gBB}$$

$$D = 1200 \text{ mg/kgBB}$$

Dosis yang diberikan perlakuan pada mencit yaitu 5.565, 78.623, 175.362, 386.956 mg/kgBB dan kontrol negatif yang digunakan adalah aquadest dengan volume pemberian 0,5 mL

3.6.6 Prosedur pelaksanaan penelitian

Dua puluh lima mencit ditempatkan didalam *metabolic cage*, kemudian dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok. Kelompok 1 sebagai kontrol negatif berupa aquadest dengan volume 0,5 mL, kelompok II-V sebagai kelompok perlakuan yang diberi infusa daun sirsak berturut-turut dengan dosis 76,800mg/kgBB, 86,800mg/kgBB, 96,800mg/kgBB, dan 108,600mg/kgBB, dengan pemberian sonde secara oral sebanyak 0,5 mL 1 x 24 jam.

Tabel 3.6 Prosedur Pelaksanaan Penelitian

No	Dosis					Pengamatan
	5.565 mg/kgBB	78.623 mg/kgBB	175.362 mg/kgBB	389.956 mg/kgBB	Kontrol Negatif	
1	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL aquadest (sonde oral → mencit)	
2	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL aquadest (sonde oral → mencit)	
3	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL aquadest (sonde oral → mencit)	1 x 24 jam
4	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL aquadest (sonde oral → mencit)	
5	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL infusa (sonde oral → mencit)	0,5 mL aquadest (sonde oral → mencit)	

3.6.7 Pengamatan

Pengamatan pada mencit dilakukan 1x24 dihitung setelah pemberian infusa daun sirsak hingga efek toksisitas akut dari infusa daun sirsak tercapai dan mencit mati.

3.7 Analisa Data

Data kuantitatif yang diperoleh yaitu jumlah hewan coba dari hasil uji toksisitas akut yang mati kemudian dihitung nilai hasil LD₅₀ menggunakan metode *Thomson and Weil* dengan menggunakan rumus yang telah ditetapkan, apabila nilai hasil LD₅₀ > 1mg/KgBB maka dinyatakan sangat toksik

Jika tidak terdapat hewan uji yang memberikan efek toksik selama perlakuan atau 1 x 24 jam, maka akan dilakukan pengamatan gejala klinik meliputi gerakan (tremor, konvulsi, paralisis, bringas (aktif), pasif), perubahan tingkah laku (perubahan sikap atau aneh seperti lompat dan berputar berlebihan atau menggeliat, penjilatan, pencakaran, vokalisasi luar biasa, gelisah, lakrimasi, salivasi), pernapasan (bradipnea dan takipnea), vasodilatasi (merah pada ekor dan telapak kaki), perubahan warna kulit dan bulu, kerontokan bulu, saluran cerna (diare dan sembelit) dilakukan selama 14 hari setelah perlakuan pemberian infusa. Penimbangan berat badan dilakukan pada hari ke-0 (sebelum perlakuan) dan hari ke-14 (setelah perlakuan) (Hutapea, 2003).

3.8 Jadwal Penelitian

Penelitian dilakukan bertempat di Laboratorium Farmakologi Prodi Farmasi Universitas Sahid Surakarta.