

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

A. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Departemen Farmasi FMIPA UI Depok selama tiga bulan dari Februari sampai April 2008.

B. ALAT DAN BAHAN

1. ALAT

Pada penelitian ini alat yang digunakan adalah sonde lambung, penangas air, timbangan analitik, PH meter, spektrofotometer UV-Vis, sentrifugator, pipet eppendorf, vortex, alat-alat gelas, gunting bedah, dan *microtube*.

2. BAHAN

a. Hewan Uji

Pada penelitian ini hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan dan betina galur ddY berumur lebih kurang dua bulan dengan berat badan 20 – 30 gram masing-masing 50 ekor. Mencit diperoleh

dari Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor. Mencit diaklimatisai selama dua minggu dalam kandang karantina Laboratorium Farmakologi FMIPA UI. Mencit yang digunakan adalah mencit yang sehat dengan tanda-tanda bulu tidak berdiri dan berwarna putih bersih, mata jernih, tingkah laku normal serta mengalami peningkatan dalam berat badan dalam batas tertentu yang diukur secara rutin. Mencit yang tidak sehat atau menunjukkan kelainan tidak diikuti sertakan dalam percobaan.

b. Bahan Uji

Sebagai bahan uji digunakan bahan obat herbal "X" yang mengandung ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*). Ekstrak daun sukun terdiri dari flavonoid sebanyak 30%.

c. Bahan Kimia

Dinatrium hidrogen fosfat, kalium dihidrogen fosfat, natrium piruvat, asam α ketoglutarat, asam aspartat, natrium hidroksida, 2,4-dinitrofenilhidrazin, asam klorida, dl-alanin, natrium hidroksida, asam pikrat, trikloroasetat, ferri klorida, tiosemikarbazid, asam fosfat pekat, asam sulfat, diasetilmonoksim, standar kreatinin, standar urea, heparin, dietil eter dan alkohol.

C. CARA KERJA

1. PENETAPAN DOSIS

Penentuan dosis terbesar dilakukan dengan uji pendahuluan untuk mengetahui dosis terbesar yang dapat diberikan secara peroral kepada mencit, dari penetapan didapatkan dosis terbesar adalah 5 gram flavonoid/kgbb atau 16,67 gram ekstrak/kgbb, kemudian dosis ini dilakukan pengenceran sebanyak dua kali dari dosis terbesar.

Pengujian nilai LD₅₀ menggunakan dosis berturut-turut 2,08; 4,17; 8,34 dan 16,67 gram ekstrak/kgbb (Lampiran 1).

2. PEMBUATAN LARUTAN UJI

Ekstrak ditimbang sebanyak 3,33 gram, kemudian disuspensikan dengan 10 ml CMC 1% untuk dosis selanjutnya dibuat dengan pengenceran dua kali lipat dosis terbesar menggunakan CMC 1% (Lampiran 2).

3. PEMBUATAN LARUTAN DAN PEREAKSI

a. Larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,1 M (9)

Sejumlah 7,098 gram dinatrium hidrogen fosfat gram dilarutkan digelas piala dan volumenya dicukupkan sebanyak 500 mL dengan aquadest.

b. Pembuatan larutan Kalium dihidrogen fosfat 0,1 M (9)

Sejumlah 1,36 gram kalium dihidrogen fosfat dilarutkan digelas piala dan volumenya dicukupkan sebanyak 100 mL dengan aquadest.

c. Pembuatan dapar fosfat 0,1M pH 7,4 (9)

Larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,1 M 420 mL ditambahkan larutan KHP 0,1 M sebanyak 80 mL, kemudian pH disesuaikan sampai 7,4.

d. Pembuatan larutan piruvat 2 μ m/L (16)

Natrium piruvat sebanyak 22,0 mg dilarutkan dalam larutan dapar fosfat sampai 100,0 mL.

e. Larutan substrat untuk pemeriksaan AST (16)

Asam α ketoglutarat sebanyak 29,2 mg dicampurkan dengan 2,66 gram asam aspartat dalam gelas piala kecil, kemudian ditambahkan larutan natrium hidroksida 1N sampai larut, pH disesuaikan sampai 7,4 kemudian ditambahkan dapar fosfat sampai 100,0 mL di dalam labu ukur.

f. Pembuatan reagen warna (16)

Sejumlah 19,6 mg 2,4–dinitrofenilhidrazin dilarutkan ke dalam larutan HCl 1N 100,0 mL.

g. Larutan substrat untuk pemeriksaan ALT (16)

Asam α ketoglutarat sebanyak 29,2 mg dicampurkan dengan 17,8 gram dl-alanin di gelas piala ukuran 50 mL, kemudian larutan natrium hidroksida 1N ditambahkan sampai larut, lalu pH disesuaikan sampai 7,4 lalu ditambahkan dapar fosfat 100,0 mL.

h. Larutan standar kreatinin 0,010 mg/ml (8)

Kreatinin standar ditimbang seksama lebih kurang 12,5 mg lalu dilarutkan dengan aquadest hingga volume 25,0 mL. Larutan dipipet 1,0 mL dan diencerkan dengan aquadest sampai volum 50,0 mL.

i. Perekasi kreatinin (21,22,24)

Larutan pikrat alkalis dibuat dengan cara mencampurkan larutan asam pikrat jenuh dengan NaOH 2% dalam perbandingan 5:1. Larutan asam pikrat jenuh dibuat dengan mencampurkan aquadest sebanyak 50,0 mL dengan lebih kurang 0,45 gram asam pikrat sampai serbuk asam pikrat tidak dapat larut. Larutan NaOH 2% dibuat dengan menimbang 2,0 gram NaOH, kemudian larutkan di dalam aquadest hingga volum 100,0 mL.

j. Larutan standar urea 0,040 mg/ml (21,24)

Ditimbang seksama urea standar lebih kurang 125,0 mg kemudian dilarutkan dalam aquadest hingga volum 25,0 mL, setelah itu masing-masing sebanyak 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 mL dipipet dan diencerkan dengan aquadest hingga volum 50,0 mL. Diperoleh standar urea dengan konsentrasi 0,100; 0,200; 0,300; 0,400; 0,500; 0,600 dan 0,700 mg/mL.

k. Pereaksi urea (21)

1) Larutan asam trikloroasetat (TCA)

Ditimbang asam trikloroasetat lebih kurang 5 gram lalu dilarutkan dengan aquadest sampai volum 100,0 mL.

2) Larutan katalisator yang terdiri dari:

Ferri klorida 1,6 mM tiosemikarbazid 5mM; asam sulfat 1,3 M dan asam fosfat 4M.

Ferri Klorida ditimbang lebih kurang 65,0 mg kemudian di larutkan dalam aquadest. disebut larutan 1.

Tiosemikarbazid ditimbang lebih kurang 113,8 mg kemudian dilarutkan dalam aquadest disebut larutan 2.

Larutan 1 dan 2 dicampurkan dalam beaker glass. Kemudian asam fosfat pekat dimasukkan sebanyak 64 mL ke dalam beaker glass tersebut dan diencerkan dengan aquadest. Setelah itu ditambahkan asam sulfat sebanyak 32,5 mL dan

diencerkan dengan aquadest. Campuran ini diencerkan dengan aquadest hingga volum 250,0 mL.

3) Larutan diasetilmonoksim (DAM)

Ditimbang seksama Diasetilmonoksim lebih kurang 3,54 gram kemudian dilarutkan dengan aquadest hingga volum 250,0 mL di labu ukur.

I. **Larutan CMC 1%**

Ditimbang seksama CMC 1 gram, kemudian dikembangkan dengan 20 mL air panas dan dicukupkan dengan air sampai 100 mL.

4. PELAKSANAAN PERCOBAAN

a. **Penentuan LD₅₀**

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL). Pengujian menggunakan sepuluh ekor mencit dalam tiap kelompok uji yang terdiri dari lima ekor mencit jantan dan lima ekor mencit betina (25). Dalam percobaan yang dilakukan menggunakan 100 ekor mencit putih kemudian dibagi secara acak ke dalam lima kelompok perlakuan. kelompok I adalah kelompok kontrol yang diberikan larutan CMC 1%. Kelompok II adalah kelompok perlakuan yang diberi larutan uji dosis 1 (2,08 gram ekstrak/kgbb), Kelompok III adalah kelompok perlakuan yang diberi larutan uji dosis 2 (4,17 gram

ekstrak/kgbb), Kelompok IV adalah kelompok perlakuan yang diberi larutan uji dosis 3 (8,34 gram ekstrak/kgbb), Kelompok V adalah kelompok perlakuan yang diberi larutan uji dosis 4 (16,67 gram ekstrak/kgbb) untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Tabel 3.

Pemberian obat dilakukan dalam satu kali pemberian melalui jalur oral menggunakan sonde, kemudian dari dosis yang diberikan dilihat hasilnya setelah 24 jam dengan menghitung jumlah mencit yang mati dari tiap kelompok. Kemudian nilai LD_{50} dihitung dengan menggunakan rumus Weil dan dinilai aktivitas enzim transaminase serta kadar kreatinin dan urea plasmanya. Selain itu juga dilakukan pengukuran aktivitas enzim transaminase serta kadar kreatinin dan urea plasma setelah 14 hari dari perlakuan.

b. Pengambilan sampel darah melalui ekor (26)

Pengambilan sampel darah melalui ekor dilakukan setelah 24 jam dan setelah 14 hari setelah perlakuan. Sebelum pemotongan ekor sterilisasi gunting bedah dan ekor dengan alkohol 70%, kemudian gunting ekor mencit, tampung darah yang diperoleh dalam *microtube* yang telah diberi heparin. Ekor mencit dioleskan larutan antiseptik untuk menghindari infeksi. Sample darah disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama lima menit agar diperoleh plasma jernih. Plasma dimasukkan ke dalam *microtube* dan disimpan dilemari pendingin pada suhu 0-10 °C (Gambar 2).

c. Pengukuran aktivitas enzim transaminase

1) Pembuatan kurva kalibrasi (24)

Larutan standar piruvat $2\mu\text{mol/L}$ dicampurkan dengan larutan dapar substrat dalam tabung reaksi dengan berbagai perbandingan (Tabel 2,6).

Kedalam tabung ditambahkan 1,0 mL reagen warna kemudian dikocok hingga homogen. Larutan didiamkan selama 20 menit pada suhu kamar, kemudian ditambahkan 10,0 mL natrium hidroksida 0,4 N dan dikocok hingga homogen, lalu didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Serapannya diukur pada panjang gelombang 505 nm. Dari hasil yang didapatkan buat garis persamaan liniernya.

Sebagai blanko digunakan larutan dapar substrat sebanyak 1,0 mL. Pembuatan kurva kalibrasi dilakukan masing-masing untuk pengukuran aktivitas AST dan ALT.

2) Pengukuran serapan enzim transaminase (16)

Disiapkan dua buah tabung untuk larutan uji dan blanko; 0,5 mL larutan dapar substrat dimasukkan ke dalam setiap tabung lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit untuk ALT dan 60 menit untuk AST; dimasukkan 0,1 mL plasma ke dalam tabung uji lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit; dimasukkan 0,5

mL pereaksi warna ke dalam tabung uji dan blanko, untuk tabung blanko ditambahkan 0,1 mL plasma, kemudian didiamkan pada suhu kamar selama 20 menit; dimasukkan 5,0 mL natrium hidroksida 0,4 N ke dalam setiap tabung lalu didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit (Tabel 3,7).

Warna yang terbentuk diukur serapannya pada panjang gelombang 505 nm. kemudian serapan yang diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier sehingga didapat nilai aktivitasnya.

d. Pengukuran kadar kreatinin plasma (20,21,24)

Pengukuran dilakukan dengan menggunakan metode Jaffe yang dimodifikasi.

Tabel 1

Tahap Pengukuran Kadar Kreatinin Plasma

	Sampel	Standar	Blanko
Larutan pikrat alkalis	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Plasma	100 µL	-	-
Standar Kreatinin	-	100 µL	-
Aquadest	-	-	100 µL

Plasma diinkubasi masing-masing tabung pada suhu konstan. Kemudian dicampurkan pereaksi pikrat alkalis pada masing-masing tabung sebanyak 1,0 mL. Ukur serapan pada detik ke-30 (At = 30) dan detik ke-90 (At = 90) pada panjang gelombang 515 nm.

Rumus kadar kreatinin plasma:

$$\frac{At = 90 \text{ (sampel)} - At = 30 \text{ (sampel)}}{At = 90 \text{ (standar)} - At = 30 \text{ (standar)}} \times C$$

Keterangan : At = 30 : serapan pada pengukuran detik ke-30

At = 90 : serapan pada pengukuran detik ke-90

C : konsentrasi standar kreatinin 1,002 mg/dL

e. Pengukuran kadar urea plasma (21,24)

Pengukuran kadar dilakukan dengan cara metode fearon / nonenzimatis secara kolorimetri dengan menggunakan diasetilmonoksim (DAM).

Semua larutan dicampur sampai homogen. Panaskan di penangas air mendidih selama 6 menit. Angkat dan diamkan selama 10 menit pada suhu kamar kemudian ukur serapan pada panjang gelombang 525 nm.

Serapan yang diperoleh dimasukkan ke persamaan regresi linier yang diperoleh dari kurva kalibrasi kadar dalam satuan mg/dL. Kurva kalibrasi dibuat dengan mengukur serapan dari tiap konsentrasi

standar urea, lalu dibuat persamaan regresi linier antara konsentrasi urea (mg/dL) dan serapan.

Tabel 2
Tahap Pengukuran Kadar Urea Plasma

	Sampel	Standar	Blanko
larutan TCA 5%	1,0 mL	1,0 mL	-
Darah	0,05 mL	-	-
Standar Urea	-	0,05 mL	-
Campurkan dan sentrifugasi 7000 RPM selama 5 menit , pipet ke dalam tabung baru			
supernatan atau campuran standar	0,05 mL	0,05 mL	-
larutan katalisator	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
larutan DAM	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

f. Pengolahan data (27)

Pengolahan data diolah secara statistik menggunakan uji distribusi normal (Uji *kolmogorov-smirnov*), Uji homogenitas (Uji *levene*), lalu dilanjutkan dengan analisis Anava satu arah. jika terdapat perbedaan secara bermakna, maka uji dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil.