

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. HASIL

##### 1. Penetapan Aktivitas Enzim Alanin Amino Transferase Plasma

###### a. Kurva kalibrasi

Persamaan garis hasil pengukuran yaitu :

$$y = -1,312 \times 10^{-3} + 1,0498 \times 10^{-3}x$$

Dengan nilai koefisien relasi ( $r$ ) = 0,998. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 5.

###### b. Pengukuran aktivitas ALT plasma

Aktivitas ALT plasma rata – rata setelah perlakuan selama 90 hari pada tikus jantan berturut – turut untuk kelompok I, II, III dan IV yaitu : 85,93, 94,79, 73,31, dan 74,79 U/l. Aktivitas ALT plasma rata – rata pada tikus betina adalah sebagai berikut : 65,45, 57,26, 75,55 dan 66,50 U/l. Data hasil pengukuran aktivitas ALT plasma setelah perlakuan 90 hari dapat dilihat selengkapnya pada Tabel 5 dan 6 serta Gambar 6 dan 7. Uji normalitas dan uji homogenitas dilakukan terhadap data hasil pengukuran. Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa data pengukuran aktivitas ALT plasma tikus jantan dan betina terdistribusi normal kecuali data dari kelompok II jantan, sedangkan pada uji homogenitas memperlihatkan bahwa data – data tersebut homogen secara

statistik. Berdasarkan uji analisis variansi satu arah dengan  $\alpha = 0,05$  pada data tikus putih jantan maupun betina didapat nilai F hitung (0.799 dan 0.973) lebih kecil daripada F tabel (2.866). Nilai F hitung yang lebih kecil dari F tabel menunjukkan bahwa data pengukuran aktivitas ALT setelah perlakuan selama 90 hari pada kelompok uji (kelompok I, II, dan III) tidak berbeda secara bermakna dibandingkan dengan data kelompok kontrol (kelompok IV). Perhitungan statistik dapat dilihat pada Lampiran 5, 6, 7, 8, 9, dan 10.

## **2. Penetapan Aktivitas Alkali Fosfatase Plasma**

Aktivitas alkali fosfatase plasma rata – rata setelah perlakuan selama 90 hari pada tikus jantan berturut – turut kelompok 1, 2, 3 dan 4 yaitu : 461,47, 505,08, 415,93 dan 450,98 U/l. Aktivitas enzim alkali fosfatase plasma rata – rata pada tikus betina yaitu sebagai berikut : 340,17, 363,77, 294,82, dan 281,11 U/l. Data hasil pengukuran aktivitas ALP plasma setelah perlakuan 90 hari dapat dilihat selengkapnya pada Tabel 7 dan 8 serta Gambar 8 dan 9. Uji normalitas dan uji homogenitas dilakukan terhadap data hasil pengukuran. Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa data pengukuran aktivitas ALP plasma tikus jantan dan betina terdistribusi normal, sedangkan pada uji homogenitas memperlihatkan bahwa data pengukuran tersebut homogen secara statistik. Berdasarkan uji analisa variansi satu arah dengan  $\alpha = 0,05$  pada data tikus putih jantan

maupun betina didapat nilai F hitung (0.300 dan 0.786) lebih kecil daripada F tabel (2.866). Nilai F hitung yang lebih kecil dari F tabel mengindikasikan bahwa data kelompok uji (kelompok I, II, dan III) tidak berbeda secara bermakna dengan data kelompok kontrol (kelompok IV). Perhitungan secara statistik dapat dilihat pada Lampiran 11, 12, 13, 14, 15, dan 16.

## **B. PEMBAHASAN**

Bahan obat herbal "X" merupakan hasil fraksinasi dari daun sukun (*Artocarpus altilis*) yang digunakan sebagai obat, maka harus disertai dasar ilmiah yang jelas yaitu salah satunya melalui uji keamanan (uji toksisitas subkronik) yang bertujuan untuk mengamati pengaruh pemberian bahan obat herbal "X" secara oral terhadap fungsi hati tikus putih ditinjau dari aktivitas enzim alanin amino transferase (ALT) dan alkali fosfatase (ALP) plasma.

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap (RAL) dimana tikus jantan dan betina dibagi secara acak kedalam empat kelompok yaitu 3 kelompok uji dan 1 kelompok kontrol. Metode rancang acak lengkap digunakan dengan tujuan untuk menghomogenkan kondisi tikus. Pembagian ke dalam 4 kelompok dimaksudkan untuk mengetahui pengaruh variasi dosis (dosis I, II dan III) bahan obat herbal "X" pada kelompok I, II, dan III terhadap fungsi hati dibandingkan dengan

standar (kelompok kontrol), sesuai dengan acuan yaitu dipakai tiga tingkatan dosis dibandingkan dengan satu kelompok kontrol (26).

Penelitian ini menggunakan tikus putih jantan dan betina galur *Sprague-Dawley* yang berusia sekitar dua bulan dengan berat badan lebih kurang 200 gram. Tikus dipilih sebagai hewan coba karena pertimbangan beberapa faktor yaitu : mudah didapat, murah, dan mempunyai metabolisme dan parameter biokimia yang hampir sama dengan manusia. Hewan uji yang digunakan terdiri dari dua jenis kelamin, yaitu : jantan dan betina. Hal ini bertujuan untuk melihat perbedaan pengaruh efek toksik yang ditimbulkan pada kedua jenis kelamin tersebut. Perbedaan pengaruh efek toksik tersebut disebabkan oleh pengaruh hormonal yang berbeda pada masing – masing jenis kelamin baik jantan maupun betina. Hewan uji yang digunakan berumur lebih kurang dua bulan yang merupakan usia yang memenuhi syarat untuk digunakan dalam uji toksisitas. Umur yang terlalu tua membuat fungsi organ dan metabolisme tubuhnya sudah mulai menurun, sedangkan pada usia yang terlalu muda sistem organ dan metabolismenya belum sempurna (26,27).

Petunjuk umum tentang metodologi riset obat tradisional yang dikeluarkan oleh WHO menjelaskan bahwa uji toksisitas subkronik maupun kronik yang memakai tikus, minimal harus terdiri dari 10 ekor dari setiap jenis kelamin pada masing – masing kelompok uji. Berdasarkan acuan tersebut maka digunakan 80 ekor hewan uji pada penelitian ini dimana jantan dan betina masing – masing berjumlah 40 ekor (32).

Sebelum penelitian dimulai, tikus diaklimatisasi terlebih dahulu dengan tujuan agar tikus dapat beradaptasi dengan lingkungan yang baru. Selain itu, hewan coba diamati keadaan umumnya serta ditimbang setiap hari bertujuan untuk melihat kesehatan tikus dan berguna untuk perhitungan dosis suspensi obat herbal "X" yang akan diberikan. Hewan coba yang digunakan harus sehat dengan ciri sebagai berikut : gerakannya lincah, bulu bersih putih dan tidak berdiri, dan berat badan cenderung bertambah atau konstan selama proses aklimatisasi.

Pada pembuatan suspensi zat uji (suspensi bahan obat herbal "X") digunakan *carboxy methyl cellulose* (CMC) sebagai *suspending agent* dikarenakan selain mudah didapat dan digunakan, juga CMC umum digunakan pada penelitian – penelitian toksisitas. Kadar CMC yang digunakan sebesar 1 % dikarenakan bahan yang diujikan sangat tidak larut air, oleh karena itu memerlukan jumlah *suspending agent* yang lebih banyak. Semua suspensi zat uji dibuat dengan cara pengenceran dari larutan induk (dosis III). Pembuatan sediaan uji dengan cara ini lebih baik dibanding dengan cara masing – masing sediaan dibuat terpisah karena faktor kesalahan dalam penurunan dosis pada pengenceran lebih sedikit.

Pemberian secara peroral bahan obat herbal "X" menggunakan sonde lambung, hal ini dikarenakan bahan obat herbal yang diuji cobakan juga akan dikonsumsi secara peroral pada manusia. Sebelum diperlakukan, hewan uji dipuaskan terlebih dahulu selama tiga sampai empat jam, tetapi tetap diberi minum. Hal ini bertujuan untuk

mengosongkan lambungnya agar tidak terjadi interaksi antara makanan yang dikonsumsi dengan bahan yang akan diujikan.

Pengambilan darah dapat dilakukan melalui *sinus* orbitalis mata, *vena* ekor, dekapitasi (pemenggalan kepala), melalui jantung, selain itu juga darah dapat diperoleh dari *vena jugularis* di daerah leher. Cara yang terbaik untuk memperoleh sampel darah adalah melalui *sinus orbitalis* mata, karena selain mudah dan tingkat stress yang ditimbulkan pada hewan coba ringan juga sampel darah yang didapat cukup banyak. Darah yang akan diambil di tampung pada *mikrotube* yang telah diolesi heparin, dimaksudkan agar darah tidak mengalami pembekuan. Darah di sentrifugasi pada 7000 rpm selama 5 menit ditujukan untuk mendapatkan plasma yang jernih terpisah dari bagian padatnya, dimana bagian padat akan mengendap pada dasar *mikrotube* (27).

Pengukuran aktivitas enzim alanin amino transferase dilakukan dengan metode spektrokolorimetri. Prinsip pengukuran aktivitas ALT plasma adalah alanin amino transferase (ALT) mengkatalisis proses pemindahan gugus amino dari di-Alanin ke asam  $\alpha$ -ketoglutarat, sehingga terbentuk senyawa piruvat dan glutamat (18,30).



Piruvat yang terbentuk direaksikan dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin membentuk 1-piruvat-2,4-dinitrofenilhidrazon yang berwarna coklat kuning dalam larutan alkali. Warna yang terbentuk, serapannya dapat diukur

secara spektrofotometri pada panjang gelombang 505 nm (28,30). Persamaan reaksi yang terjadi pada saat pengukuran ALT plasma dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3.

Kurva kalibrasi harus terlebih dahulu dibuat, sebelum pengukuran aktivitas ALT dilakukan. Kurva kalibrasi dibuat dengan tujuan untuk mengetahui persamaan garis pada perbandingan aktivitas dan serapan sehingga serapan yang terukur bisa dikonversi menjadi nilai aktivitas enzim. Pengukuran sampel menggunakan dapar substrat karena dapar substrat berisi substrat enzim yang akan diukur aktivitasnya ( $\alpha$ -ketoglutarat dan dl-Alanin). Dapar substrat harus ber-pH 7,4 karena pada pH tersebut enzim bekerja optimal (pH optimum). Sebelum plasma dan dapar substrat direaksikan, dapar substrat perlu diinkubasi terlebih dahulu pada suhu tubuh yaitu sekitar 37<sup>0</sup>C ditujukan untuk mengoptimalkan kerja enzim karena enzim bekerja di dalam tubuh pada suhu sekitar 37<sup>0</sup>C (suhu optimum).

Pengukuran aktivitas enzim alkali fosfatase dilakukan dengan menggunakan reagen kit alkali fosfatase. Prinsip pengukuran aktivitas alkali fosfatase adalah alkali fosfatase mengkatalisis perubahan p-nitrofenilfosfat menjadi p-nitrofenolfosfat. P-nitrofenol yang terbentuk berwarna kuning dalam larutan alkali dan diukur perubahan absorbansinya per satuan waktu. Perubahan absorbansi sebanding dengan kecepatan disosiasi substrat yang juga sebanding dengan aktivitas enzim (29). Pengukuran aktivitas enzim alkali fosfatase memakai

kit tidak memerlukan kurva kalibrasi karena sudah ada faktor konversi yang tertera pada prosedur kerja reagen kit alkalifosfatase yang digunakan. Persamaan reaksi yang terjadi pada saat pengukuran ALP plasma dapat dilihat pada Gambar 4.

Pengukuran aktivitas alanin amino transferase dan alkali fosfatase menghasilkan data yang bervariasi, dimana rata – rata setiap data kelompok pada pengukuran aktivitas enzim alanin amino transferase dan aktivitas enzim alkali fosfatase menjadi bervariasi dengan standar deviasi yang bervariasi pula. Urutan aktivitas rata - rata enzim ALT tikus putih jantan dari yang paling tinggi yaitu kelompok II, kemudian kelompok I, lalu kelompok IV (kelompok kontrol) kemudian yang paling rendah yaitu kelompok III. sedangkan pada tikus putih betina urutan aktivitas rata – ratanya dimulai dari yang paling tinggi yaitu kelompok III, lalu kelompok IV (kelompok kontrol), kemudian diikuti kelompok I dan kelompok II. Pengukuran aktivitas enzim ALP plasma juga menghasilkan variasi data. Urutan aktivitas rata – rata enzim ALP plasma tikus jantan dimulai dari yang paling tinggi yaitu kelompok II, lalu kelompok I, kemudian diikuti oleh kelompok IV dan kelompok III. Data aktivitas rata – rata enzim ALP plasma tikus putih betina dari yang paling tinggi dimulai dari kelompok II lalu kelompok I, kelompok III dan kelompok IV. Semakin tinggi aktivitas rata – rata enzim ALT maupun ALP dari suatu kelompok maka diikuti oleh semakin tinggi standar deviasi dari rata – rata kelompok tersebut. Variasi data hasil pengukuran disebabkan oleh beberapa faktor sebagai berikut



yaitu : Ketidaktepatan waktu pengerjaan sehingga enzim masih bekerja sampai beberapa saat yang mengakibatkan hasil pengukuran menjadi tidak tepat juga proses pemipetan dan pencampuran pereaksi yang kurang kuantitatif dan homogen sehingga dapat mengurangi senyawa yang akan bereaksi dan menghasilkan warna yang dapat diukur dengan spektrofotometri UV-Vis.

Uji analisis variansi satu arah (*ANOVA*) digunakan untuk melihat dan menentukan data dari dua sampel atau lebih berbeda secara bermakna atau tidak. Oleh karena itu, data hasil pengukuran dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji analisis variansi satu arah (*ANOVA*). Uji variansi satu arah mempunyai syarat yaitu data yang dianalisa harus homogen sehingga perlu dilakukan uji homogenitas (*Levene test*) kemudian dilanjutkan uji normalitas (*Saphiro-Wilk*). Berdasarkan uji variansi satu arah (*ANOVA*), dapat disimpulkan bahwa setelah pemberian suspensi bahan obat herbal "X" secara oral selama 90 hari, tidak ada perbedaan yang bermakna antara aktivitas enzim ALT dan ALP plasma kelompok uji (kelompok I, II dan III) dibandingkan dengan aktivitas enzim ALT dan ALP plasma kelompok kontrol (kelompok IV) yang mengindikasikan bahwa pemberian bahan obat herbal "X" secara oral tidak mempengaruhi fungsi hati hewan coba ditinjau dari aktivitas enzim alanin amino transferase dan alkali fosfatase plasma.