

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

A. LOKASI DAN WAKTU

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Departemen Farmasi FMIPA UI Depok selama lebih kurang 6 (enam) bulan yaitu dari bulan Januari sampai Juni 2008.

B. ALAT – ALAT

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sonde lambung, timbangan analitik (*Mettler Toledo*), timbangan hewan, mikrohematokrit, mikrotube, spektrofotometer UV-VIS (*Genesys*), sentrifugator (*Gemmy Industrial Corp*), pipet mikro (*Socorex*), lemari pendingin, *hot plate*, pH meter, pipet *Pasteur*, dan alat – alat gelas.

C. BAHAN – BAHAN

1. Hewan Uji

Hewan yang digunakan dalam penelitian adalah tikus putih jantan dan betina berumur 2 (dua) bulan dengan berat badan lebih kurang 200 gram berjumlah 80 ekor yang terdiri dari 40 ekor tikus jantan dan betina. Hewan uji diperoleh dari Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.

2. Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan adalah bahan obat herbal “X” yang didapat dari hasil fraksinasi fase etil asetat daun tumbuhan sukun (*Artocarpus altilis*) berasal dari LIPI Jakarta.

3. Bahan – Bahan Kimia

Bahan – bahan kimia yang digunakan dalam penelitian meliputi heparin (*Fahrenheit*), dietil eter (*Merck*), asam klorida (*Merck*), kalium dihidrogen fosfat (*Merck*), dinatrium hidrogen fosfat (*Merck*), natrium piruvat (*Merck*), asam α -ketoglutarat (*Sigma*), natrium hidroksida (*Merck*), dl-Alanin (*Merck*), 2,4-dinitrofenilhidrazin (*Merck*), reagen kit alkalifosfatase (*Randox*), CMC (*Merck*) dan aquades.

D. CARA KERJA

1. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba yang digunakan pada uji toksisitas ini dibagi kedalam empat kelompok yaitu 3 (tiga) kelompok uji dan 1 (satu) kelompok kontrol. Masing – masing kelompok terdiri dari 10 ekor tikus putih jantan dan 10 ekor tikus putih betina.

2. Persiapan Hewan Uji

Penelitian menggunakan tikus putih jantan dan betina galur *Sprague-Dawley* yang berusia sekitar dua bulan dengan berat badan lebih kurang 200 gram. Hewan uji diaklimatisasi selama beberapa

minggu dalam kandang laboratorium Farmakologi Departemen Farmasi FMIPA UI Depok. Pada tahap ini hewan coba diamati keadaan umumnya serta ditimbang setiap hari. Hewan coba yang sakit tidak diikutsertakan dalam percobaan. Hewan coba yang telah memenuhi kriteria sehat ditimbang bobotnya sebelum mengalami perlakuan dan diberi tanda sesuai kelompok dosis (26,27).

3. Penetapan Dosis

Bahan obat herbal "X" yang didapat dari hasil fraksinasi daun sukun mengandung lebih kurang 30% flavonoid dan diberikan kepada hewan coba dengan dosis sebagai berikut :

Dosis I : 83,3 mg bahan obat herbal "X"/kg bb tikus

Dosis II : 166,7 mg bahan obat herbal "X"/kg bb tikus

Dosis III : 333,3 mg bahan obat herbal "X"/kg bb tikus

4. Pembuatan Suspensi Zat Uji

Bahan obat herbal "X" yang akan digunakan pada penelitian ini terlebih dahulu disuspensikan dengan *carboxy methyl cellulose* (CMC). Konsentrasi CMC yang dibuat adalah 1% b/v. CMC yang telah ditimbang dikembangkan terlebih dahulu di lumpang selama 30 menit, dengan cara ditaburkan merata pada permukaan air panas yang berjumlah 20 kali bobot CMC. Bahan obat herbal "X" yang telah ditimbang digerus homogen sedikit demi sedikit dengan CMC yang telah dikembangkan. Setelah itu ditambahkan aquades sedikit demi sedikit sampai batas sambil digerus homogen. Cara pembuatan

suspensi bahan obat herbal “X” dapat dilihat dengan lengkap pada Lampiran 1.

5. Pembuatan Larutan dan Preaksi

a. Larutan Dinatrium Hidrogen Fosfat 0,1 M

Dinatrium hidrogen fosfat sebanyak 5,962 g dilarutkan menggunakan aquadest pada *beaker glass* yang telah ditara kemudian ditambahkan aquadest sampai batas volume 420 ml.

b. Larutan Kalium Dihidrogen Fosfat 0,1 M

Kalium dihidrogen fosfat sebanyak 1,088 g dilarutkan menggunakan aquadest pada *beaker glass* yang telah ditara kemudian ditambahkan aquadest sampai batas volume 80 ml.

c. Dapar Fosfat

Larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,1M sebanyak 420 ml ditambah dengan larutan kalium dihidrogen fosfat 0,1M sebanyak 80 ml kemudian pH-nya disesuaikan sampai 7,4 (28).

d. Larutan Uji Aktivitas ALT

1) Larutan Piruvat 2 $\mu\text{mol/L}$

Natrium piruvat sebanyak 22,0 mg dimasukkan ke dalam labu ukur kemudian ditambahkan dapar fosfat sampai 100 ml (28).

2) Larutan substrat untuk pemeriksaan ALT plasma dan kurva kalibrasi

Sebanyak 29,2 mg asam α -ketoglutarat dicampur dengan 1,78 gram dl-Alanin di gelas piala ukuran 50 ml, ditambahkan larutan natrium hidroksida 1 N sampai larut. Lalu pH disesuaikan sampai 7,4 lalu tambahkan dapar fosfat sampai 100,0 ml (28).

3) Pereaksi Warna

Sebanyak 19,8 mg 2,4-dinitro fenilhidrazin dilarutkan dalam asam klorida 1 N sampai 100,0 ml di labu ukur (28).

e. Reagen Kit Alkali Fosfatase (29)

Reagen kit alkali fosfatase terdiri dari dua bagian yang terpisah, yaitu :

Reagen 1 : larutan dapar yang berisi dapar dietanolamin pH 9,8 dan $MgCl_2$

Reagen 2 : substrat yang berisi p-nitrofenilfosfat

Reagen 2 dilarutkan dalam reagen 1 sesuai dengan volume wadah. Larutan tersebut dapat digunakan untuk satu hari bila disimpan pada suhu 15 – 25⁰C, bila disimpan pada suhu 2 – 8 ⁰C dapat digunakan untuk lima hari.

6. Pelaksanaan Percobaan

Hewan coba yang telah dibagi secara acak ke dalam 4 kelompok perlakuan (Tabel 1) diberikan larutan uji secara oral

menggunakan sonde lambung satu kali sehari setiap hari dengan dosis yang telah disesuaikan dengan berat badan tikus selama 90 hari. Selama perlakuan, tikus tetap diberi makan dan minum. Setelah 90 hari perlakuan dilakukan pengambilan sampel darah melalui sinus orbitalis mata. Plasma diperoleh dari sampel darah yang disentrifugasi kemudian diukur kadar alanin amino transferase dan alkali fosfatase secara spektrokolorimetri.

7. Pengambilan Sampel Darah Untuk Memperoleh Plasma Melalui Mata

Pengambilan sampel darah melalui mata dilakukan setelah 90 hari pemberian larutan uji. Sebelum pengambilan darah, tikus dianastesi terlebih dahulu menggunakan eter, lalu dengan mikrohematokrit tikus diambil darahnya melalui bagian sinus orbital mata. Mikrohematokrit digerak – gerakkan hingga masuk ke dalam sambil diputar – putar, sehingga darah keluar. Darah ditampung dalam mikrotube yang telah diberi heparin. Sampel darah yang diperoleh lalu disentrifugasi pada putaran 7000 rpm selama lima menit agar diperoleh filtrat yang jernih. Plasma dimasukkan dalam mikrotube lain dan disimpan di dalam lemari pendingin (*freezer*) pada suhu lebih kurang $0 - 10^{\circ}\text{C}$ (27).

8. Pemeriksaan Fungsi Hati

a. Pengukuran Aktivitas ALT Plasma

1) Pembuatan Kurva Kalibrasi (28,30)

Larutan standar piruvat dan larutan dapar substrat (larutan blanko) dicampur dalam tabung reaksi dengan berbagai perbandingan (Tabel 2). Kemudian ke dalam setiap tabung ditambahkan 1,0 ml reagen warna, lalu dikocok sampai homogen. Campuran tersebut didiamkan pada suhu kamar selama 20 menit lalu ditambahkan 10,0 ml natrium hidroksida 0,4 N. setelah itu dikocok sampai homogen dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Serapan diukur pada panjang gelombang 505 nm.

2) Pengukuran Sampel ALT Plasma (28,30)

Dua buah tabung reaksi disiapkan untuk larutan uji dan larutan blanko. Kemudian 1,0 ml larutan dapar substrat dimasukkan ke dalam setiap tabung, lalu diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 10 menit. Setelah itu dimasukkan 0,2 ml plasma ke dalam tabung uji lalu diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 30 menit. Kemudian dimasukkan 1,0 ml reagen ke dalam tabung uji dan blanko, dan untuk tabung blanko ditambahkan 0,2 ml plasma, lalu didiamkan pada suhu kamar selama 20 menit. Setelah itu, dimasukkan 10,0 ml natrium hidroksida 0,4 N ke dalam setiap tabung dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Warna yang terbentuk diukur

serapannya pada panjang gelombang 505 nm. Pengukuran ALT plasma dapat dilihat pada Tabel 3.

b. Pengukuran Aktivitas Alkali Fosfatase Plasma (29)

Plasma dan larutan pereaksi dicampur (Tabel 4). Serapan diukur setiap menit selama tiga menit pertama pada panjang gelombang 405 nm pada suhu kamar (25⁰C). Penetapan aktivitas alkali fosfatase plasma dihasilkan berdasarkan rumus :

$$\text{Aktivitas Alkali Fosfatase (IU/L)} = \frac{\Delta A}{\text{menit}} \times \text{faktor konversi}$$

9. Pengolahan Data

Data yang diperoleh dari percobaan diolah secara statistik menggunakan uji distribusi normal (uji *saphirowilk*) dan uji homogenitas (uji *lavene*). Setelah uji normalitas dan uji homogenitas dilaksanakan, kemudian dilanjutkan dengan uji analisis multivarian satu arah (Anava). Bila data yang dihasilkan berbeda secara bermakna, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (31).