

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan eksperimental murni *post test control group design* dengan rancangan acak lengkap (RAL). Pada penelitian ini yang akan diamati adalah pengaruh ekstrak daun sukun terhadap efek toksisitas dan hipertrofi hepar pada tikus putih jantan galur wistar yang diinduksi etilen glikol.

B. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan (FKH) Universitas Gajah Mada Yogyakarta dan Laboratorium Biologi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran hal ini dikarenakan alat dan bahan yang memadai untuk dilakukan penelitian ditempat tersebut.

C. Subjek Penelitian

Subjek uji yang digunakan berupa ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis folium*) dengan objek uji menggunakan 30 ekor tikus putih jantan kemudian dibagi kedalam 6 kelompok perlakuan, yaitu kelompok normal, kelompok induksi, kelompok kontrol positif, dan kelompok perlakuan ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis folium*) dosis 100 mg/kg BB, kelompok perlakuan ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis folium*) dosis 200 mg/kg

BB, dan kelompok perlakuan ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis folium*)

dosis 400 mg/kg BB dalam emulgator sebagai berikut :

Kelompok	Harike 1-14	Harike 15-28
Normal	Aqua	Aqua
Induksi	EG 0,75% v/v	EG 0,75% v/v
Positif	EDS 400 mg/kgBB	EDS 400 mg/kgBB
EDS 100 mg/kg BB	EG 0,75% v/v	EG 0,75% v/v + EDS 100 mg/kg BB
EDS 200 mg/kg BB	EG 0,75% v/v	EG 0,75% v/v + EDS 200 mg/kg BB
EDS 400 mg/kg BB	EG 0,75% v/v	EG 0,75% v/v + EDS 400 mg/kg BB

Keterangan :

EDS : Ekstrak Daun Sukun

EG : Etilen Glikol

Perhitungan sampel pada tikus dilakukan dengan menggunakan rumus

Ferreder:

(n-1) (t-1) ≥ 15 Keterangan: n = jumlah kelompok t = kelompok sampel
--

Penelitian ini menggunakan 6 kelompok perlakuan sehingga perhitungan

sampel menjadi :

$$(n-1) (5-1) \geq 15$$

$$(n-1) 4 \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 15+4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Jadi jumlah hewan yang dipakai untuk tiap kelompok sebanyak 5 ekor tikus. Sedangkan hewan uji untuk cadangan sebanyak 20% dari jumlah hewan uji yang digunakan sebagai perlakuan yaitu 5 ekor

D. Definisi Operasional dan Variabel

1. Ekstrak Daun Sukun

Ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis folium*) adalah sediaan yang diperoleh dengan cara maserasi menggunakan pelarut Etanol 96%, dengan kadar 100 mg/Kg BB, 200 mg/kg BB dan 400 mg/Kg BB tikus yang diberikan secara per oral.

2. Etilen Glikol

Etilen glikol adalah senyawa kimia yang bersifat toksik yang dapat menyebabkan keadaan hipertoksitas pada tikus jantan galur wistar dengan dosis 0,75%.

3. Variabel Bebas

Ekstrak Daun Sukun Terpurifikasi

Ekstrak yang diperoleh kemudin dipurifikasi dengan larutan n-heksan sehingga didapatkan 2 larutan yang terpisah. Lapisan n-heksan (lapisan atas) diambil dengan cara dialirkan dan fraksi dari n-heksan diambil untuk perlakuan pada hewan uji sesuai dosis perlakuan.

4. Variabel Tergantung

a. *Alanine Aminotransferase* (ALT)/ Serum Glutamic Pyruvat Transaminase (SGPT)

Merupakan salah satu enzim di dalam tubuh manusia. Enzim ini paling banyak ditemukan di dalam organ hati. Pemeriksaan menggunakan alat *Chemistry Autoanalyzer Diagnostic COBAS Integra 400 plus*. Serum di analisis secara *Spektrofotometri* dengan absorbansi 340 nm dengan metode kinetik IFCC. Hasil ukur : IU/L. Skala ukur : rasio

b. *Aspartat aminotransferase (AST)/ Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase (SGOT)*

Merupakan suatu enzim yang terdapat di dalam tubuh. Enzim ini umumnya ditemukan di jantung, ginjal, otak, otot, dan hati (liver). Pemeriksaan menggunakan alat *Chemistry Autoanalyzer Diagnostic COBAS Integra 400 plus*. Serum di analisis secara *Spektrofotometri* dengan absorbansi 340 nm dengan metode kinetik IFCC. Hasil ukur : IU/L. Skala ukur : rasio

E. Pengumpulan Data

1. Pembuatan Serbuk Daun Sukun (*Artocarpus altilis folium*)
 - a. Dicuci daun sukun dengan air mengalir sampai bersih
 - b. Dirajang dan dikeringkan ditempat terbuka tapi tidak terkena sinar matahari secara langsung (tutup dengan kain hitam)
 - c. Dihaluskan daun sukun yang telah kering menggunakan blender
 - d. Diayak dengan menggunakan ayakan mesh No. 30 sampai diperoleh serbuk halus
 - e. Disimpan dalam wadah tertutup dan terlindung dari cahaya matahari
2. Ekstraksi Simplisia

- a. Dimasukkan serbuk halus daun sukun sebanyak 500 g kedalam wadah kaca
 - b. Ditambahkan 5 liter alkohol 96% ditutup rapat dan dibiarkan selama 3 hari terlindung dari cahaya, sambil berulang-ulang diaduk. Sesudah 2 hari kemudian disaring
 - c. Maserat ditempatkan pada cawan porselin sedangkan ampas ditambah cairan penyari lagi secukupnya
 - d. Dibiarkan 1 hari sambil diaduk sesekali. Maserasi dilakukan di ruangan yang terlindung cahaya matahari dan dilakukan pengadukan 1 x 24 jam.
 - e. Ekstrak yang diperoleh disaring menggunakan kain flannel kemudian semua hasil sarinya digabung
 - f. Diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental daun sukun (*Artocarpus altilis*)
3. Purifikasi Ekstrak
- a. Diambil 10 gram ekstrak dilarutkan dalam 50 mL etanol 96% sampai larut
 - b. Ditambahkan n-heksan 50 mL, digojog dan didiamkan sampai terdapat 2 lapisan yang terpisah.
 - c. Lapisan n-heksan (lapisan atas) diambil dengan cara dialirkan kemudian dibuang, dan lapisan etanol (lapisan bawah) dilakukan purifikasi lagi sampai lapisan etanol berwarna jernih.

- d. Diambil fraksi etanol yang sudah jernih dan digunakan untuk perlakuan dengan dosis sesuai kelompok perlakuan hewan uji.

4. Kontrol Kualitas

Dilakukan perhitungan rendemen ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) dan dilakukan uji kimiawi metabolis standar flavonoid.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak pekat (g)}}{\text{bobot bahan sampel (g)}} \times 100$$

5. Perhitungan Dosis Ekstrak Daun Sukun

a. Dosis Ekstrak : 100 mg/Kg BB/hari

Berat tikus diasumsikan : 200 gram

Dosis pemberian tikus 200 gram : 1000 mg x 0,2 kg/hari

: 20 mg/ 200 gram/hari

Volume pemberian tikus 200 gram : 5 ml

$$\text{stok} = \frac{\text{dosis}}{\text{volume pemberian}}$$

$$\text{stok} = \frac{20 \text{ mg}}{5 \text{ ml}}$$

$$\text{stok} = 4 \text{ mg/ml}$$

Volume stok : 50 ml

Maka : 4 mg x 50 ml

: 200 mg

Sebanyak 200 mg ekstrak daun sukun dilarutkan dalam aquadest ad 50 ml

b. Dosis Ekstrak : 200 mg/Kg BB/hari

Berat tikus diasumsikan : 200 gram

Dosis pemberian tikus 200 gram : 200 mg x 0,2 kg/hari

: 40 mg/ 200 gram/hari

Volume pemberian tikus 200 gram : 5 ml

$$stok = \frac{\text{dosis}}{\text{volume pemberian}}$$

$$stok = \frac{40 \text{ mg}}{5 \text{ ml}}$$

$$stok = 8 \text{ mg/ml}$$

Volume stok : 50 ml

Maka : 8 mg x 50 ml

: 400 mg

Sebanyak 400 mg ekstrak daun sukun dilarutkan dalam aquadest ad 50 ml

c. Dosis Ekstrak : 400 mg/Kg BB/hari

Berat tikus diasumsikan : 200 gram

Dosis pemberian tikus 200 gram : 400 mg x 0,2 kg/hari

: 80 mg/ 200 gram/hari

Volume pemberian tikus 200 gram : 5 ml

$$stok = \frac{\text{dosis}}{\text{volume pemberian}}$$

$$stok = \frac{80 \text{ mg}}{5 \text{ ml}}$$

$$stok = 16 \text{ mg/ml}$$

Volume stok : 50 ml

Maka : 16 mg x 50 ml

: 800 mg

Sebanyak 800 mg ekstrak daun sukun dilarutkan dalam aquadest ad 50 ml

6. Perlakuan Hewan Uji

- a. Hewan uji di aklimasise lama kurang lebih 1 minggu, dipantau berat badan hewan uji
- b. Bagi secara acak sesuai kelompok perlakuan
- c. Dilakukan induksi dan diberi perlakuan pada masing-masing kelompok hewan uji.
- d. Pada hari ke 29 diukur kadar ALT, kadar AST dalam plasma dan pengukuran hipertrofi dari sel hepar.

F. Pengukuran Hipertrofi Hepar

- a. Dilakukan pembedahan pada hewan uji pada hari ke-29
- b. Diambil organ hepar untuk ditimbang agar diketahui berat hepar
- c. Perhitungan hipertrofi hepar = $\frac{\text{Berat hepar Basah} \times 100}{\text{BB(gram)}}$

Pengukuran berat ini dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya inflamasi pada hepar setelah pemeberian ekstran daun sukun. Dengan simpangan normal adalah 5% dari berat badan tikus (Martins & Neuhaus, 2007). Jika berat massa hati >5% maka dapat dikatakan bahwa organ hati mengalami inflamasi.

G. Analisis Kadar ALT dan AST

- a. Pembuatan Larutan Pereaksi

- 1) Dibuat Monoreagen (dibuat dengan mencampurkan 4 bagian reagen R1 dengan 1 bagian reagen R2).
- 2) Dibuat larutan Reagen I dengan mencampurkan Tris pH 7,65 110 mmol/liter, L-Aspartat 320 mmol/liter, MDH (Malat Dehidrogenase) 800 U/liter, LDH (Laktat Dehidrogenase) 1200 U/liter.
- 3) Dibuat larutan Reagen II dengan mencampurkan 2-oxoglutarat 65 mmol/liter dan NADH 1 mmol/liter.
- 4) Kemudian dicampur dan dihomogenkan.

b. Preparasi Darah

- 1) Diambil darah melalui jantung (intra cardial) dengan cara tikus dianastesi terlebih dahulu
- 2) Dibedah hewan uji lalu darah diambil sebanyak 5 ml dengan memasukkan syringe langsung ke jantung dan disedot perlahan.
- 3) Dimasukkan darah kedalam tabung sentrifuge yang telah terisi larutan EDTA agar darah tidak menggumpal
- 4) Diamkan selama 10 menit
- 5) Disentifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit
- 6) Diambil cairan plasma (cairan berwarna bening) untuk pengukuran kadar ALT dan AST.

c. Pengukurankadar ALT dan AST

- 1) Ditambahkan 500 μ L larutan pereaksi dimasukkan ke dalam 50 μ L sampel (plasma darah) atau standar didalam tabung sentrifuge
- 2) Dihomogenkan dan didiamkan selama 1 menit

- 3) Diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm
- 4) Dicatat penurunan absorbansi setiap menitnya selama 3 menit

H. Pengolahan Data

Kadar pengukuran absorbansi dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier yang didapat dari kurva untuk mendapatkan kadar ALT dan AST pada masing-masing sampel. Perhitungan kadar efek hepatotoksin ekstrak daun sukun dari data absorbansi diperoleh dengan rumus sebagai berikut:

$$U/L = (\Delta A / \text{menit} / \text{Absorbansi}) \times (\text{Total Volume} / \text{Sampel Volume})$$

$$U/L = (\Delta A / \text{menit} / 0.00622) \times (1.10 / 0.10)$$

$$U/L = \Delta A / \text{menit} \times 1768$$

kemudian data hasil penelitian dimasukkan kedalam program aplikasi SPSS (*Statistical Product Service Solutions*) untuk pengujian statistic.

I. Analisis Data

1. Data disajikan sebagai *mean ± Standart Deviasi*. Analisis statistic menggunakan SPSS *for windows*. Untuk uji normalitas digunakan uji *Shapiro-Wilk*, dinyatakan terdistribusi normal apabila $p > 0,05$ (CI 95%), homogenitas uji *Levene* dan dinyatakan homogeny bila $p > 0,05$. Data terdistribusi normal dan varietasnya homegen di uji Anova satu jalan, CI 95%, jika tidak normal dan/ tidak homogen dilakukan uji *Kruskal Wallis* dan apabila ada beda bermakna dilanjutkan uji *Least Significant Different* (LSD).

2. Laporan Penelitian

Laporan penelitian akan dibuat setelah dilakukan penelitian oleh peneliti dan laporan tersebut akan dilampirkan.