

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian

4.1.1 Bahan Tanaman

Bahan penelitian yang di gunakan adalah ekstrak kering daun *Orthosiphon stamineus* (kumis kucing) dan ekstrak kering kulit buah *Garcinia mangostana* L (manggis).

Kedua ekstrak kering tanaman tersebut didapatkan dari Departemen Farmakognosi dan Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga. Ekstrak kering yang digunakan adalah daun kumis kucing dan perikarpium manggis hasil dari produksi skala pilot, diekstraksi dengan etanol 70%, dan menggunakan pengering *Micro-Cel* dan *corn starch* dengan perbandingan 1:1.

4.1.2 Bahan Kimia

Bahan kimia yang di gunakan pada penelitian ini adalah aquadest, CMC-Na, dan etanol 96% teknis. Untuk pembendahan hewan coba, pengambilan serum, dan analisis SGOT,SGPT digunakan hematoxylin eosin, xylol, kanada balsam, formalin 10 %, parafin cair, kit ALAT Merck Jerman dan kit ASAT Merck Jerman.

4.1.3 Hewan Coba

Dalam penelitian ini di gunakan hewan coba mencit putih (*Mus musculus*) strain BALB/c berumur 2-3 bulan dengan berat

badan 20-40 gram. Hewan coba di peroleh dari Laboraturium Hewan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.

4.1.4 Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang di gunakan pada penelitian ini adalah timbangan hewan coba (Barkel type EH No. 106.601), neraca analitik (Adventurer Ohaus AR2140), mortir dan stamper, alat gelas, penggaris, kandang mencit, alat sonde, tabung bius, alat bedah, pot plastik, spektrofotometer, mikroskop dan software analisis data.

4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Variabel Kendali

Mencit jantan berumur 8-12 minggu dengan berat 20-40 gram dengan galur balb-c.

4.2.2 Variabel Terikat

Kadar enzim GOT dan GPT pada serum mencit dan profil irisan histopatologi hepar mencit yang mengalami degenerasi dan nekrosis.

4.2.3 Variabel Bebas

Dosis campuran ekstrak kering daun kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*, Benth.) dan ekstrak kering perikarpium manggis (*Garcinia Mangostana* Linn.) yang diberikan berulang satu kali sehari pada masing masing kelompok selama 28 hari.

4.3 Metode Penelitian

4.3.1 Rancangan Percobaan

Pada penelitian ini terdapat empat kelompok yaitu tiga kelompok diberi dosis tertentu dan satu kelompok sebagai kontrol negatif. Tiap kelompok terdiri dari 6 ekor mencit jantan.

Tabel 4.1. Rancangan percobaan

Kelompok	Perlakuan
I	Diberikan pembawa musilago CMC-Na 0,5%
II	Diberikan suspensi campuran ekstrak daun kumis kucing dan perikarpium manggis dengan perbandingan 1:1 dalam CMC-Na 0,5% dosis 0,23 g/kgBB
III	Diberikan suspensi campuran ekstrak daun kumis kucing dan perikarpium manggis dengan perbandingan 1:1 dalam CMC-Na 0,5% dosis 0,69 g/kgBB
IV	Diberikan suspensi campuran ekstrak daun kumis kucing dan perikarpium manggis dengan perbandingan 1:1 dalam CMC-Na 0,5% dosis 1,15 g/kgBB

4.3.2 Pemilihan Dosis

Dosis kelompok I sebagai dosis awal yang efektif. Dosis kombinasi yang digunakan adalah penjumlahan dosis dimana total dosis memberikan efek penurunan gula darah dan atau kolesterol pada mencit. Faktor konversi untuk tikus (200 g) ke mencit (20 g) = 0,14 (Laurence *and* Bacharach, 1964) .

Dosis untuk ekstrak etanol kumis kucing

$$= 500 \text{ mg/kg BB tikus (Umbare, 2009)}$$

$$= 100 \text{ mg/200 g BB tikus} \times 0,14$$

$$= 14 \text{ mg/20 g BB mencit}$$

Dosis untuk ekstrak daun kering kumis kucing dengan pengering 40%

$$= 100/60 \times 14 \text{ mg}$$

$$= 23 \text{ mg}$$

Dosis untuk ekstrak etanol perikarpium manggis

$$= 500 \text{ mg/kg BB tikus (Dyahnugra, 2014)}$$

$$= 100 \text{ mg/200 g BB tikus} \times 0,14$$

$$= 14 \text{ mg/20 g BB mencit}$$

Dosis untuk ekstrak perikarpium manggis dengan pengering 40%

$$= 100/60 \times 14 \text{ mg}$$

$$= 23 \text{ mg}$$

Perbandingan kombinasi ekstrak kering kumis kucing:perikarpium manggis

$$= (\frac{1}{2} \times 23 \text{ mg/20 g BB mencit}) : (\frac{1}{2} \times 23 \text{ mg/20 g BB mencit})$$

$$= 11,5 \text{ mg/20g BB mencit} : 11,5 \text{ mg/20g BB mencit}$$

$$= 1:1$$

Campuran ekstrak kering daun kumis kucing : ekstrak kering perikarpium manggis = 1:1 diberikan dalam tiga dosis:

- kelompok I = 1 x 23 mg/20 g BB
= 23 mg/ 20 g BB mencit
- kelompok II = 3 x 23 mg/20 g BB
= 69 mg/ 20 g BB mencit

- kelompok III = 5 x 23 mg/20 g BB
= 115 mg/ 20 g BB mencit

4.4. Cara Kerja

4.4.1. Penyiapan Hewan Coba

Pertama-tama hewan coba diadaptasikan dengan lingkungan selama 1 minggu. Semua mencit putih dipelihara dengan cara yang sama dan mendapat diet yang sama pula. Sebelum dilakukan perlakuan, semua mencit ditimbang untuk menghitung pengaturan dosis.

4.4.2. Penyiapan Larutan Uji

Pada manusia, biasanya diberikan secara oral dengan volume pemberian 1 mL sediaan uji per 100 g berat badan hewan, apabila digunakan pembawa air (BPOM, 2014). Untuk mencit dengan berat badan 20 g. Jadi volume uji per oral yang diberikan maksimal 0,2 ml.

4.4.2.1 Pembuatan Larutan CMC Na 0,5%

Ditimbang 0,5 gram CMC-Na, ditaburkan tipis diatas air panas 20x CMC-Na dan dibiarkan mengembang (\pm 15 menit), digerus sampai terbentuk musilago. Pindahkan kedalam wadah yang telah dikalibrasi dan ditambah aquades sampai 100 ml. Sehingga didapatkan konsentrasi 0,5%. CMC Na 0,5% digunakan untuk pelarut dalam kelompok kontrol dan dosis.

4.4.2.2. Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Pada kelompok kontrol negatif diberi campuran larutan CMC-Na 0,5% + *Corn starch* + *Microsel*. Sebanyak 23 mg campuran *Corn starch* dan *Microsel* (1:1) disuspensikan dalam 0,2 ml larutan CMC Na 0,5% untuk tiap mencit.

4.4.2.3. Pembuatan Larutan Uji Dosis 1 (23 mg/ 20gBB)

Sebanyak 23 mg ekstrak kering kumis kucing dan 23 mg ekstrak kering perikarpium manggis ditambahkan 4 ml larutan CMC-Na 0,5% sedikit demi sedikit sambil digerus hingga homogen dan membentuk suspensi. Untuk tiap mencit 20g diberikan sebanyak 0,2 ml.

4.4.2.4. Pembuatan Larutan Uji Dosis 2 (69 mg/20gBB)

Sebanyak 69 mg ekstrak kering kumis kucing dan 69 mg ekstrak kering perikarpium manggis ditambahkan 4 ml larutan CMC-Na 0,5% sedikit demi sedikit sambil digerus hingga homogen dan membentuk suspensi. Untuk tiap mencit 20g diberikan sebanyak 0,2 ml.

4.4.2.5. Pembuatan Larutan Uji Dosis 3 (115 mg/kgBB)

Sebanyak 115 mg ekstrak kering kumis kucing dan 115 mg ekstrak kering perikarpium manggis ditambahkan 4 ml larutan CMC-Na 0,5% sedikit demi sedikit sambil digerus hingga homogen dan membentuk suspensi. Untuk tiap mencit 20g diberikan sebanyak 0,2 ml.

4.4.3 Pengumpulan Data Uji Toksisitas Subakut

Disiapkan 4 kelompok mencit yang masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit jantan. Untuk semua kelompok kecuali kelompok kontrol, tiap hewan coba diberi kombinasi ekstrak kering daun kumis kucing dan perikarpium manggis dalam CMC-Na 0,5% dengan dosis yang telah ditentukan. Pemberian dosis secara peroral, satu kali sehari selama 28 hari. Masing-masing mencit diambil darahnya secara intrakardial setelah 28 hari, kemudian analisa enzim SGOT dan SGPT-nya. Selain itu, juga

dilakukan pengambilan dan pengamatan mikroskopik organ hati mencit.

4.4.4 Pengambilan Serum

Pengambilan darah dilakukan melalui jantung (intrakardial) dengan alat suntik sebanyak 1 ml. Darah yang telah diambil dimasukkan dalam tabung venoject yang bersih dan kering, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum yang sudah terpisah diambil dan dimasukkan dalam tabung lain yang bersih dan kering kemudian ditutup. Jika serum tidak langsung diperiksa, harus disimpan dalam lemari es dengan suhu 2-8°C selama maksimal empat hari. Jika lebih dari empat hari serum akan mengalami degradasi aktivitas sebesar 10% (Anonim, 1986).

4.4.5 Pemeriksaan Kadar SGOT dan SGPT

Sejumlah 50 µL serum uji direaksikan dengan 500 µL pereaksi uji untuk pemeriksaan GOT atau GPT di dalam tabung reaksi 5 mL dihomogenkan dengan bantuan vortex. Absorbansinya diukur dengan spektrofotometer pada suhu 37°C tepat setelah menit ke 1, 2, dan 3 pada panjang gelombang 340 nm. Hal yang sama dilakukan terhadap blangko (pereaksi + aquades). Kadar GOT atau GPT dapat ditentukan dengan menghitung rata-rata selisih absorbansi sampel permenit dikalikan faktor 1745 (BPOM, 2014).

$$\Delta A \text{ sampel} = \frac{(A_3 - A_2) + (A_2 - A_1)}{2}$$

$$\Delta A \text{ blangko} = \frac{(A3 - A2) + (A2 - A1)}{2}$$

GOT (U/I) = (ΔA Sampel - ΔA blangko) x faktor 1745

GPT (U/I) = (ΔA Sampel - ΔA blangko) x faktor 1745

Untuk pemeriksaan SGOT (BPOM, 2014) :

Pereaksi uji terdiri dari campuran 4 bagian pereaksi A dan 1 bagian pereaksi B.

Pereaksi A : 80 mM TRIS pH 7,8; 240 mM 1L-aspartat; ≥ 600 U/I

MDH; ≥ 600 U/I LDH

Pereaksi B : 12 mM 2-oksalo glutarat; 0,18 mM NADH

Untuk pemeriksaan SGPT (BPOM, 2014) :

Pereaksi uji terdiri dari campuran 4 bagian pereaksi A dan 1 bagian pereaksi B.

Pereaksi A : 100 mM TRIS pH 7,15; 500 mM L-alanin; ≥ 1700 U/I LDH

Pereaksi B : 15 mM 2-oksalo glutarat; 0,18 mM NADH

4.4.6 Analisis Data Enzim SGOT dan SGPT

Data yang diperoleh dari aktivitas SGOT dan SGPT, dianalisis dengan ANOVA (*One Way*) pada derajat kepercayaan 95% untuk mengetahui apakah ada perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan.

Hipotesa yang diajukan adalah sebagai berikut:

Ho : Tidak ada perbedaan bermakna kadar enzim SGOT dan SGPT antar kelompok perlakuan.

Ha : Ada perbedaan bermakna kadar enzim SGOT dan SGPT antar kelompok perlakuan.

Untuk menilai hipotesis statistik, dilihat harga Sig. dan dibandingkan dengan $\alpha(0,05)$. Bila Sig. $< \alpha(0,05)$ maka Ho ditolak dan Ha diterima. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna, dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*). Dari hasil uji kemudian dilihat harga Sig. dan dibandingkan dengan $\alpha(0,05)$. Bila Sig. $< \alpha(0,05)$ maka Ho ditolak dan Ha diterima.

4.4.7 Pembuatan Preparat Histopatologi

1. Fiksasi

Tujuan:

- ❖ Mematikan kuman atau bakteri
- ❖ Menjadikan jaringan lebih keras sehingga mengawetkan bentuk sebenarnya dan agar mudah dipotong
- ❖ Meningkatkan afinitas jaringan terhadap macam-macam zat warna

Cara Kerja :

Organ direndam dengan larutan buffer formalin 10% segera setelah pengambilan organ minimal 24 jam, kemudian dilakukan pencucian dengan dialiri air kran.

2. Dehidrasi dan *Clearing*

Tujuan :

- ❖ Membersihkan dan menjernihkan jaringan

❖ Menarik air dari jaringan

Cara Kerja :

Siapkan reagen yang digunakan (Alkohol 70%, 80%, 90% ; Xylol I dan Xylol II). Hati yang telah dicuci air kran dimasukkan kedalam reagen alkohol selama masing-masing 30 menit. Kemudian direndam dengan Xylol yang diganti sebanyak 2 kali.

3. Infiltrasi

Tujuan :

❖ Agar jaringan lebih tahan terhadap pemotongan

Cara Kerja :

Siapkan reagen yang digunakan (Parafin cair I dan Parafin cair II). Jaringan dimasukkan kedalam paraffin cair I dan oven selama 30 menit, kemudian dimasukkan dalam paraffin cair II dan oven kembali selama 30 menit pada suhu 60°C.

4. Pembuatan Sediaan Blok

Tujuan :

❖ Agar jaringan lebih mudah dipotong

Cara Kerja :

Siapkan reagen yang digunakan (Parafin Cair) dan beberapa cetakan besi yang telah diolesi gliserin untuk mencegah lekatnya paraffin dengan cetakan. Hati yang dipotong-potong dimasukkan dalam cetakan menggunakan pinset dan ditunggu sampai paraffin membeku.

5. Pemotongan Blok Parafin dengan Mikrotom

Tujuan :

- ❖ Mendapatkan jaringan setipis mungkin agar mudah dilihat dengan mikroskop

Cara Kerja :

Siapkan mikrotom. Secara random tiap 15 kali pemotongan dilakukan secara seri, diambil dengan ketebalan 4-7 μ m. Kemudian dicelupkan air hangat dengan suhu 20⁰C sampai jaringan mengembang dengan baik. Setelah itu, diletakkan pada gelas objek sebelum diolesi dengan *egg albumin*, lalu dikeringkan dengan *hot plate* agar organ merenggang dan menempel pada gelas objek.

6. Pewarnaan Jaringan dengan Hematoxylin Eosin

Tujuan :

- ❖ Memudahkan melihat perubahan pada jaringan

Cara Kerja :

Siapkan reagen yang Hematoxylin Eosin. Tempatkan *cover glass* yang telah diberi sediaan pada rak pewarnaan. Tetesi sediaan dengan Hematoxylin selama 1 menit, lalu aliri dengan airdan cuci untuk melepaskan warna dari jaringan. Tetesi sediaan dengan Eosin selama 1-2 menit, lalu aliri dengan airdan cuci untuk melepaskan warna dari jaringan.

7. Dehidrasi dan *Clearing*

Dilakukan dehidrasi dengan larutan alkohol 70%, 80%, 90% (2 kali). Kemudian dilakukan *clearing* menggunakan Xilen (3-4 kali).

8. Lapisan Kanada balsam dan Penutupan

Pemberian lapisan kanada balsam pada gelas objek yang telah terwarnai dan kemudian ditutup dengan *cover glass*.

(BPOM, 2014)

4.4.8 Pemeriksaan Preparat Histopatologi

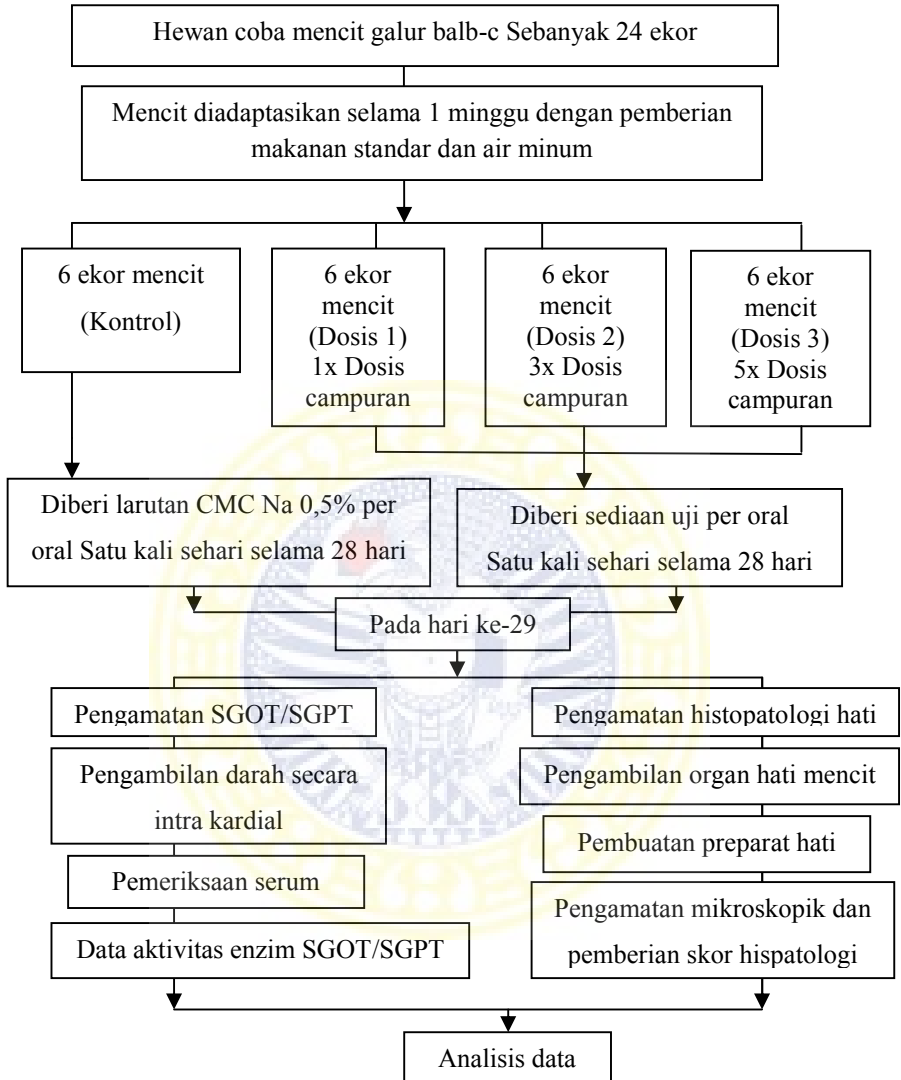
Digunakan mikroskop cahaya untuk mengamati secara mikroskopi preparat hati mencit. Setiap organ atau jaringan yang telah dipisahkan dimasukkan dalam larutan dapar formaldehida 10% dan dibuat preparat histopatologi (BPOM, 2014). Mula-mula digunakan perbesaran 100 kali kemudian digunakan perbesaran 400 kali. Setiap preparat hati mencit diamati perubahannya melalui lima lapang pandang, diamati perubahan abnormal yang terjadi (degenerasi dan nekrosis). Setiap preparat digeser lima kali lapang pandang kemudian diskor, dijumlah dan dibagi lima. Selanjutnya, hasil dari 5 pergeseran itu adalah data dari satu preparat.

Tabel 4.2 Skor Penilaian Morfologi Mikroskopi Hepar (Sukardja, 1998)

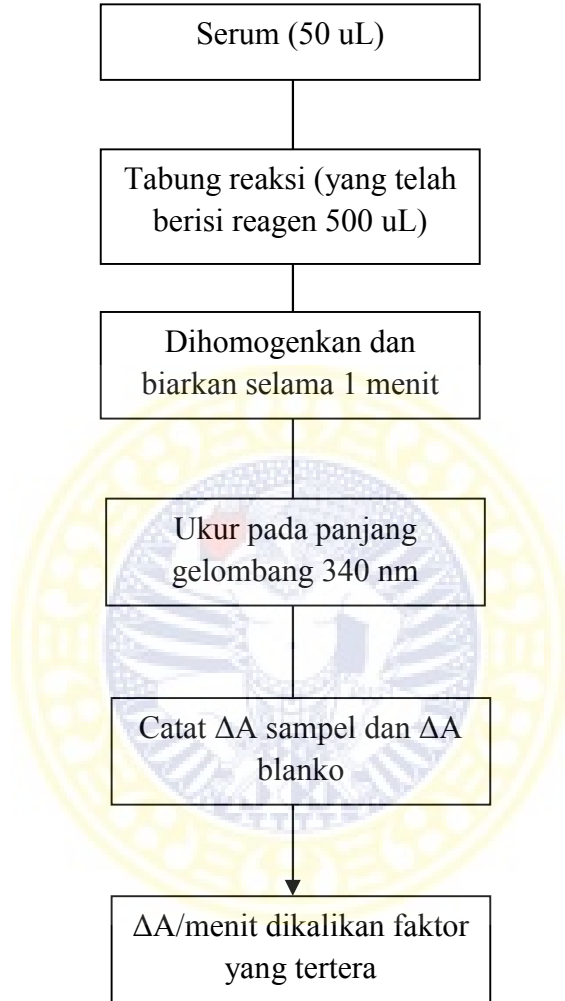
Luas daerah lapang pandang	Skor
Normal	0
Abnormal < 25%	1
Abnormal 26% - 50%	2
Abnormal 51% - 75%	3
Abnormal 76% - 100%	4

4.4.9 Analisis Data Preparat Histopatologi

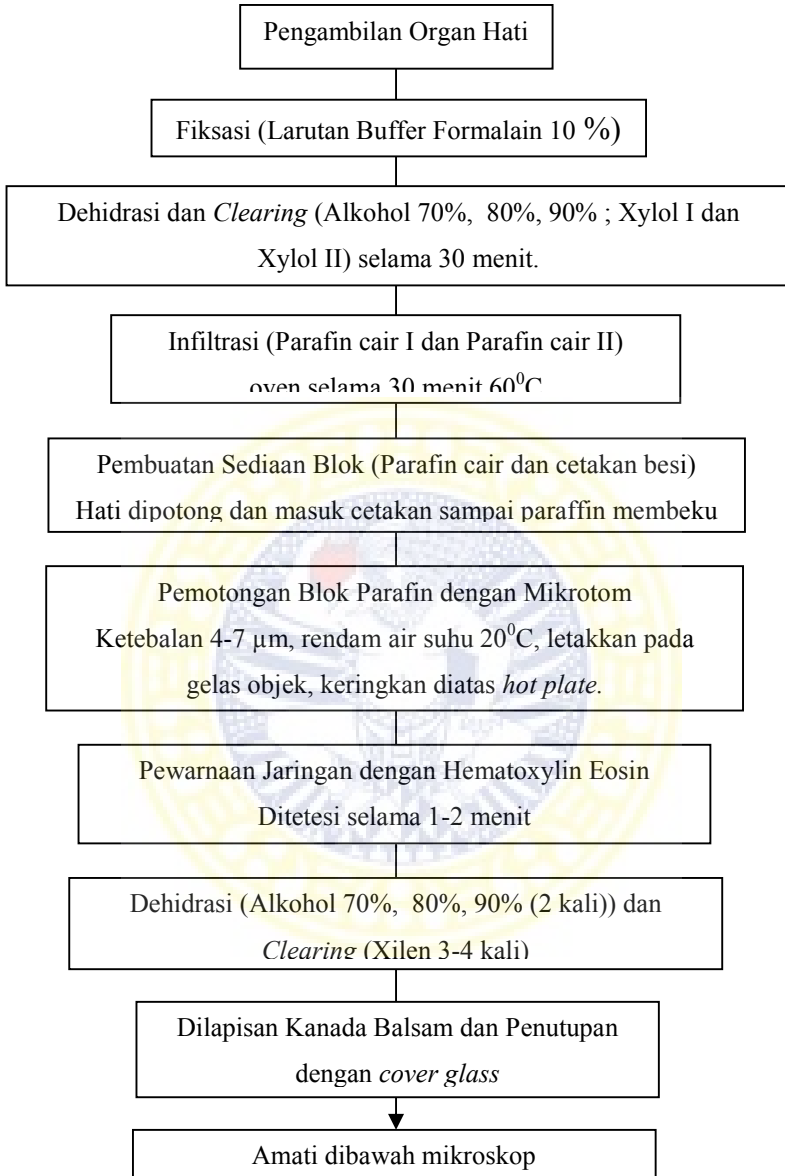
Data yang diperoleh adalah data perubahan gambaran histopatologi hati mencit yang telah diberi skor, diolah dengan penilaian peringkat (rank), kemudian dianalisis menggunakan uji statistik non parametik dengan menggunakan Uji Kruskal Walls karena data diperoleh berdasarkan nilai skoring atau penilaian derajat perubahan. Bila terdapat perbedaan yang nyata diantara kelompok perlakuan, maka dilanjutkan dengan Uji Perbandingan Berganda (Uji Z) 5% (Daniel, 1987).



Gambar 4.1 Skema Kerja Uji Hepatotoksik



Gambar 4.2 Skema Pemeriksaan Aktivitas SGOT dan SGPT



Gambar 4.3 Skema Kerja Pembuatan Preparat Histopatologi