

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1. Bahan Penelitian**

##### **4.1.1. Bahan Uji**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah fraksi diterpen lakton dari herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness.). Ekstrak tersebut diperoleh dari Departemen Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.

##### **4.1.2. Bahan Kimia dan Bahan Lain**

Bahan-bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah:

1. CMC-Na 0,5%
2. Fraksi Diterpen Lakton herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness.)
3. Kit diagnostika SGOT (bioMerieux®)
4. Kit diagnostika SGPT (bioMerieux®)
5. Kit diagnostika kreatinin serum (bioMerieux®)
6. Kit diagnostika BUN (bioMerieux®)
7. Kit diagnostika total protein (bioMerieux®)

8. Kit diagnostika Snap Pak ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) (Roche)
9. Kit diagnostika  $\text{Ca}^{++}$
10. Kit diagnostika  $\text{Mg}^{++}$
11. Antikoagulan EDTA
12. Hematoxylin Eosin
13. Xylol
14. Kanada balsam
15. Formalin Cair

#### **4.1.3. Hewan Coba**

Dalam penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) galur Wistar jantan dan betina. Usia tikus 1,5-2 bulan dengan berat badan 150-200 gram. Hewan coba diperoleh dari Laboratorium Hewan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.

#### **4.2. Alat Penelitian**

Alat yang digunakan pada penelitian ini, antara lain:

1. Timbangan hewan coba (Barkel Type EH No. 106.601)
2. Mortir dan Stamper
3. Cawan Porselen
4. Gelas Ukur (100 mL)

5. Kandang tikus
6. Sonde
7. Alat bedah, meliputi gunting
8. S spuit injeksi
9. Mikroskop Olympus CO11

### **4.3. Prosedur Penelitian**

#### **4.3.1. Uji Toksisitas Subkronik**

##### **4.3.1.1. Rancangan Percobaan**

Hewan coba tikus putih pada penelitian toksisitas subkronik terdiri atas 4 kelompok, yaitu 3 kelompok dosis dan 1 kelompok kontrol negatif. Setiap kelompok terdiri dari 10 ekor tikus, yaitu 5 ekor tikus jantan dan 5 ekor tikus betina.

Kelompok I : Diberi bahan uji pembawa mucilago CMC-Na 0,5%

Kelompok II : Diberi bahan uji suspensi fraksi diterpen lakton herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness.) dalam CMC-Na 0,5% sebanyak 1 x dosis penelitian.

Kelompok III : Diberi bahan uji suspensi fraksi diterpen lakton herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness.) dalam CMC-Na 0,5% sebanyak 2 x dosis penelitian.

Uji toksisitas subkronik bahan uji diberikan selama 30 hari. Pengamatan dilakukan untuk melihat adanya perubahan berat badan selama pemberian perlakuan dan akhir perlakuan. Pada akhir perlakuan dilakukan pemeriksaan parameter kimia darah (SGOT, SGPT, BUN, kreatinin, elektrolit, dan total protein), parameter hematologi (hemoglonin, platelet, dan leukosit), serta histopatologi hati dan ginjal (Chunlaratthanaphorn *et al.*, 2007).

#### **4.3.1.2. Penyiapan Hewan Coba**

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

#### **4.3.1.3. Penyiapan Bahan Uji**

##### **4.3.1.3.1. Pembuatan Sediaan Bahan Uji Dalam Berbagai Konsentrasi**

Sediaan bahan uji berupa suspensi. Sebagai bahan pembawa digunakan CMC-Na 0,5% dalam aquadest. Sediaan bahan uji dibuat dengan cara mensuspensikan fraksi diterpen lakton dari sambilo ke dalam suspensi CMC-Na 0,5%. Dosis

lazim yang digunakan subyek manusia Indonesia (70kg).

Dari hasil penetapan kadar andrografolid dalam fraksi diterpen lakton sambiloto, diperoleh persentase rata-rata kandungan andrografolid 13,5% setiap 100 mg. Pada penelitian ini digunakan 2 kelompok dosis uji, dosis I (500 mg/kgBB) dan dosis II (1000 mg/kgBB). Penggunaan dosis uji ini Maka fraksi kering yang dibutuhkan pada 2 kelompok dosis uji adalah:

- Dosis I (500 mg/kgBB):  
Berat badan hewan coba = 150 g  
Fraksi kering yang dibutuhkan (sekali pemberian)  
 $= 500 \text{ mg} \times 150 / 1000 \text{ g}$   
 $= 75 \text{ mg}$   
Fraksi kering yang dibutuhkan (28 hari)  
 $= 75 \text{ mg} \times 28 \text{ hari} \times 10 \text{ ekor}$   
 $= 21000 \text{ mg}$   
 $= 21 \text{ g}$
- Dosis II (1000 mg/kgBB) :  
Berat badan hewan coba = 150 g  
Fraksi kering yang dibutuhkan (sekali pemberian)

$$= 1000 \text{ mg} \times 150/1000 \text{ g}$$

$$= 150 \text{ mg}$$

Fraksi kering yang dibutuhkan (28 hari)

$$= 150 \text{ mg} \times 28 \text{ hari} \times 10 \text{ ekor}$$

$$= 42000 \text{ mg}$$

$$= 42 \text{ g}$$

Cara pembuatan larutan uji adalah sebagai berikut:

- Ditimbang fraksi diterpen lakton yang mengandung andrographolid sesuai dengan dosis yang telah dihitung.
- Fraksi diterpen lakton etanol disuspensikan dalam CMC-Na 0,5%, diaduk ad homogen.
- Suspensi fraksi diterpen lakton diberikan pada tikus setiap hari satu kali sehari selama 28 hari.

#### **4.3.1.3.2.Pembuatan Mucilago CMC-Na 0,5%**

*Pembuatan mucilago untuk kelompok kontrol:*

Dibutuhkan CMC Na 0,5% sebanyak

$$= 1,5 \text{ ml} \times 10 \text{ ekor} \times 28 \text{ kali pemberian}$$

$$= 420 \text{ ml}$$

CMC Na yang dibutuhkan = 0,5%

= 0,50 g/100 ml

= 0,50/100 x 420 ml

= 2,10 g

Dosis CMC Na per tikus

= 0,50 g/100 ml = 0,005 g/ml

= 0,005 g/ml x 1,5 ml

= 0,0075 g

Berat rata-rata tikus sebesar 150 g, maka dosis CMC Na

= 0,0075 g/200 gBB = 37,5 mg/kgBB

Ditimbang 2,10 gram CMC-Na, ditaburkan diatas air panas 20xnya ( $\pm 42$  ml), dibiarkan mengembang ( $\pm 15$  menit), gerus sampai homogen. Kemudian tambahkan aqua panas sedikit demi sedikit sambil diaduk ad volume 420 ml. Larutan ini diberikan kepada kelompok kontrol sebanyak 1,5 ml secara oral selama 28 hari.

*Pembuatan mucilago untuk kelompok dosis:*

Dibutuhkan CMC Na 0,5% sebanyak

= 1,5 ml x 10 ekor x 28 kali pemberian

= 420 ml

$$= 420 \text{ ml} \times 2 \text{ jenis sediaan uji}$$

$$= 840 \text{ ml}$$

CMC Na yang dibutuhkan

$$= 0,5\% = 0,50 \text{ g}/100 \text{ ml}$$

$$= 0,50 \text{ g}/100 \text{ ml} \times 840 \text{ ml}$$

$$= 4,20 \text{ g}$$

Dosis CMC Na per tikus

$$= 0,50 \text{ g}/100 \text{ ml} = 0,005 \text{ g}/\text{ml}$$

$$= 0,005 \text{ g}/\text{ml} \times 1,5 \text{ ml}$$

$$= 0,0075 \text{ g}$$

Berat rata-rata tikus sebesar 150 g, maka

dosis CMC Na

$$= 0,0075 \text{ g}/150 \text{ gBB}$$

$$= 37,5 \text{ mg}/\text{kgBB}$$

Ditimbang 4,20 gram CMC-Na untuk setiap kelompok dosis, ditaburkan diatas air panas 20xnya ( $\pm 84 \text{ ml}$ ), dibiarkan mengembang ( $\pm 15 \text{ menit}$ ), gerus sampai homogen. Kemudian ditambahkan fraksi diterpen lakton sebanyak 500 mg/kgBB untuk kelompok dosis I, dan 1000 mg/kgBB untuk kelompok dosis II, aduk ad homogen, selanjutnya ditambahkan aqua panas



sedikit demi sedikit sambil diaduk ad volume 840 ml.

#### **4.3.1.4. Perlakuan terhadap Hewan Coba**

Disiapkan 4 kelompok tikus yang masing-masing akan diberikan perlakuan yang berbeda. Tiga kelompok diberikan bahan uji dengan dosis yang berbeda dan 1 kelompok kontrol negatif. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus jantan dan 5 ekor tikus betina dengan metode randomisasi. Tujuan dari randomisasi adalah untuk mengurangi variasi berat badan tikus pada perlakuan.

Pemberian bahan uji pada setiap kelompok uji dilakukan selama 28 hari melalui rute oral. Diamati perubahan berat badan selama pemberian perlakuan dan akhir perlakuan minimal satu kali dalam satu minggu (Casado, 2001).

Perlakuan dibagi menjadi 3 kelompok :

- Kelompok Kontrol Negatif (Kel. 1)  
Terdiri dari 10 ekor hewan coba (5 ekor tikus jantan dan 5 ekor tikus betina), masing-masing diberikan bahan uji suspensi CMC Na sebanyak 1,5 ml per oral setiap hari selama 28 hari.

- Kelompok Dosis I (Kel. 2)  
Terdiri dari 10 ekor hewan coba (5 ekor tikus jantan dan 5 ekor tikus betina), masing-masing diberikan bahan uji suspensi fraksi diterpen lakton sambiloto sebanyak 1,5 ml yang sebanding dengan andrografolid 500 mg/kg BB per oral setiap hari selama 28 hari.
- Kelompok Dosis II (Kel. 3)  
Terdiri dari 10 ekor hewan coba (5 ekor tikus jantan dan 5 ekor tikus betina), masing-masing diberikan bahan uji suspensi fraksi diterpen lakton sambiloto sebanyak 1,5 ml yang sebanding dengan andrografolid 1000 mg/kg BB per oral setiap hari selama 28 hari.

Pada akhir perlakuan dilakukan pemeriksaan parameter kimia klinik (SGOT, SGPT, BUN, dan kreatinin), parameter hematologi (hemoglobin, platelet, dan leukosit), serta hispatologi hati dan ginjal (Lu, 1995).

#### **4.3.1.5. Pengambilan Darah Hewan Coba**

Hewan coba tikus dibius dengan eter namun tidak sampai mati, diambil darahnya melalui jantung dengan spuit injeksi sebanyak  $\pm 5$  ml. Darah yang diambil kemudian dibagi menjadi 2 yaitu  $\pm 2$  ml darah untuk pemeriksaan hematologi, dimasukkan dalam vial yang telah berisi antikoagulan EDTA dan segera dihomogenkan secara perlahan tanpa ada sel-sel darah yang lisis.

Sedangkan  $\pm 3$  ml darah sisanya dimasukkan ke dalam tabung venoject yang bersih dan kering untuk pemeriksaan serum (SGOT, SGPT, BUN, dan kreatinin). Kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum yang sudah terpisah diambil dan dimasukkan ke dalam tabung lain yang bersih, kering, dan bertutup rapat untuk pemeriksaan selanjutnya.

#### **4.3.1.6. Pengambilan Organ Hati dan Ginjal**

Pengambilan organ hati dan ginjal dilakukan pada akhir masa perlakuan dan setelah pengambilan darah. Tikus dibius dengan eter namun tidak sampai mati, diambil darahnya melalui jantung. Selanjutnya tikus dikorbankan dengan pemberian eter, diambil organ hati dan ginjalnya. Organ tersebut disimpan dalam larutan formalin 10% untuk selanjutnya dipreparasi guna pengamatan histopatologi.

#### 4.3.1.7. Pengambilan Serum Hewan Coba

Pemeriksaan SGOT, SGPT, BUN, dan kreatinin pada serum tikus coba, dilakukan dengan menggunakan kit diagnostika, alat sentrifuse serta spektrofotometer. Pemeriksaan dilakukan oleh Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya.

##### 4.3.1.7.1. Pemeriksaan SGOT (AST)

Dipipet ke dalam tabung reaksi:

Serum : 100  $\mu$ l

Larutan reagen : 1 ml

Campur serum dan larutan reagen, setelah satu menit diukur penurunan absorbansinya ( $\Delta A$ ) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm, catat penurunan absorbansinya ( $\Delta A$ ) pada setiap menitnya selama 3 menit. Kemudian  $\Delta A$ /menit dikalikan dengan faktor F yang tertera pada prosedur kerja Kit.

Aktivitas enzim SGOT =  $\Delta A$ /menit x F

#### 4.3.1.7.2. Pemeriksaan SGPT (ALT)

Dipipet ke dalam tabung reaksi:

Serum : 0,1 ml

Larutan reagen : 1 ml

Campur, setelah satu menit diukur penurunan absorbansinya ( $\Delta A$ ) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm, catat penurunan absorbansinya ( $\Delta A$ ) setiap menitnya selama 3 menit. Kemudian  $\Delta A$ /menit dikalikan dengan faktor F yang tertera pada prosedur kerja Kit. Aktivitas enzim SGPT =  $\Delta A$ /menit x F

#### 4.3.1.7.3. Pemeriksaan BUN

Dibuat larutan peraksi. Ke dalam tabung reaksi dipipet 1 ml larutan pereaksi dan 10  $\mu$ l standar. Campur sampai homogen dan diamati serapannya dengan spektrofotometer ( $\lambda = 340$  nm) pada detik ke-20 ( $A_1$ ) dan pada detik ke-80 ( $A_2$ ). Serum juga dipreparasi dan diamati dengan cara yang sama dengan standar. Dihitung perbedaan serapan,  $\Delta A = A_2 - A_1$ .

#### 4.3.1.8. Pembuatan Preparat Histopatologi Hati dan Ginjal

Pembuatan preparat histopatologi hati dan ginjal, dilakukan di laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, menggunakan metode parafin dengan beberapa tahapan yaitu:

a. Fiksasi dan pencucian

Organ hati dan ginjal dimasukkan wadah yang sudah diisi larutan formalin 10% dan dibiarkan 24 jam. Semua organ harus tenggelam dalam larutan formalin 10%. Kemudian organ dicuci dengan air mengalir selama 30 menit.

b. Dehidrasi dan clearing

Organ hati dan ginjal yang telah dicuci dengan air mengalir selama 30 menit, dimasukkan ke dalam reagen dengan urutan alkohol, 70%, 80%, 90%, 96%, alkohol absolut I, II, III, xylol I, II, dan xylol III masing-masing 30 menit.

c. Infiltrasi

Setelah dilakukan dehidrasi dan clearing, organ hati dan ginjal dimasukkan ke dalam parafin I yang mencair selama 1 jam lalu dimasukkan ke dalam parafin II, kemudian parafin III masing-masing selama 1 jam, selanjutnya di oven dengan suhu 50-60 °C selama 1 jam.

d. Pembuatan blok parafin

Disiapkan beberapa cetakan besi yang sebelumnya telah diolesi gliserin dengan maksud untuk mencegah melekatnya parafin pada cetakan besi tersebut, kemudian cetakan besi tersebut diisi dengan parafin cair panas. Organ selanjutnya dimasukkan dengan menggunakan pinset ke dalam cetakan besi dengan posisi diatur, ditunggu sampai parafin tersebut membeku atau mengeras.

e. Pengirisan dengan mikrotom

Blok parafin yang sudah mengeras disiapkan. Mikrotom dibersihkan, digosok dengan kertas tisu pada relnya hingga bersih, kemudian rel tersebut diberi minyak pelicin. Mata pisau dipasang pada mikrotom. Blok sediaan dipasang pada mikrotom, diatur tinggi rendahnya permukaan blok pada skala 10-15, sudut permukaan organ diatur dengan arah potongan pisau harus membentuk  $45^{\circ}$ , dan tebal tipisnya potongan diatur, biasanya  $3 \mu\text{m}$ , untuk organ yang keras dapat dengan ketebalan  $\pm 5 \mu\text{m}$ . Pemotongan diambil secara random, tiap 10 kali pemotongan yang dilakukan seri, diambil satu dengan ketebalan  $5-7 \mu\text{m}$ , setelah itu jaringan diletakkan pada gelas obyek yang sebelumnya telah

diolesi putih telur dan dikeringkan diatas hotplate pada suhu 60<sup>o</sup> C.

f. Pewarnaan

Pewarnaan menggunakan *Hematoxylin Eosin* (HE) sehingga sel-sel pada jaringan terlihat dengan jelas dimana sitoplasma berwarna merah sedangkan inti selnya berwarna biru. Pewarnaan dilakukan dengan memasukkan irisan jaringan yang terletak pada objek glass ke dalam reagen pewarna dengan urutan xylol I (5 menit), xylol II (3 menit), alkohol absolut I (3 menit), alkohol absolut II (2 menit), alkohol absolut III (3 menit), alkohol 96% (2 menit), alkohol 90% (2 menit), alkohol 80% (1 menit), alkohol 70% (1 menit), dan dicuci dengan air mengalir selama 5 menit. Kemudian jaringan direndam dalam *Hematoxylin* selama 4 sampai 10 menit, lalu dicuci lagi dengan air mengalir selama 10 menit. Selanjutnya direndam dengan *Eosin* selama 3-8 menit dilanjutkan dengan perendaman dalam alkohol 70% (1 menit), alkohol 80% (2 menit), alkohol 90% (3 menit), alkohol absolut I, II, III masing-masing 3 menit, xylol I (3 menit), II (4 menit), dan xylol III (5 menit).



g. Mounting

Bila pewarnaan sudah kering, maka gelas objek yang ada jaringan ditutup dengan cover objek glass yang sebelumnya diolesi dengan Canada balsam.

#### 4.3.2. Analisis Data

Data yang diperoleh berupa kadar SGOT, SGPT, BUN, kreatinin serta data hematologi dari masing-masing kelompok perlakuan. Data tersebut dilakukan perhitungan dengan uji *One-way* ANOVA pada tingkat kepercayaan 95% (harga  $\alpha = 0,05$ ). Variabel bebasnya adalah dosis dan sebagai variabel tergantung kadar SGOT, SGPT, BUN, kreatinin, Hb, jumlah leukosit total, hitung leukosit total, hitung jenis leukosit serta jumlah platelet. Hipotesis statistik penelitian ini adalah:

Ho = tidak ada perbedaan bermakna dari variabel tergantung pada setiap kelompok.

Ha = ada perbedaan bermakna dari variabel tergantung pada setiap kelompok.

Uji ini dilakukan untuk membuktikan apakah perbedaan yang ditunjukkan oleh masing-masing kelompok sifatnya bermakna. Dari analisis tersebut didapatkan harga F hitung yang kemudian dibandingkan dengan F tabel, bila

ternyata harga  $F$  hitung  $>$   $F$  tabel (harga signifikansi  $< \alpha$ ), maka  $H_0$  ditolak dan dapat disimpulkan ada perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan. Untuk mengetahui ada atau tidaknya efek perlakuan antar pasangan kelompok, analisis dilanjutkan dengan Post Hoc Tests (Uji LSD). Harga LSD digunakan sebagai pembanding selisih antar rata-rata hasil pemeriksaan. Bila selisih harga rata-rata tersebut lebih kecil dari harga LSD yang didapat berarti tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok tersebut. Bila selisih harga rata-rata sama atau lebih besar dari harga LSD yang didapat berarti ada perbedaan yang bermakna antar kelompok tersebut (Jones, 2008).

Untuk pengamatan terhadap preparat histopatologi organ hati dan ginjal, ditinjau berdasarkan tiga macam kerusakan yaitu degenerasi dan nekrosis. Yang kemudian dilakukan pengamatan dengan perbesaran 400 kali untuk tiap kerusakan organ tersebut. Selanjutnya diberikan skor berdasarkan persen kerusakan yang terjadi pada organ.

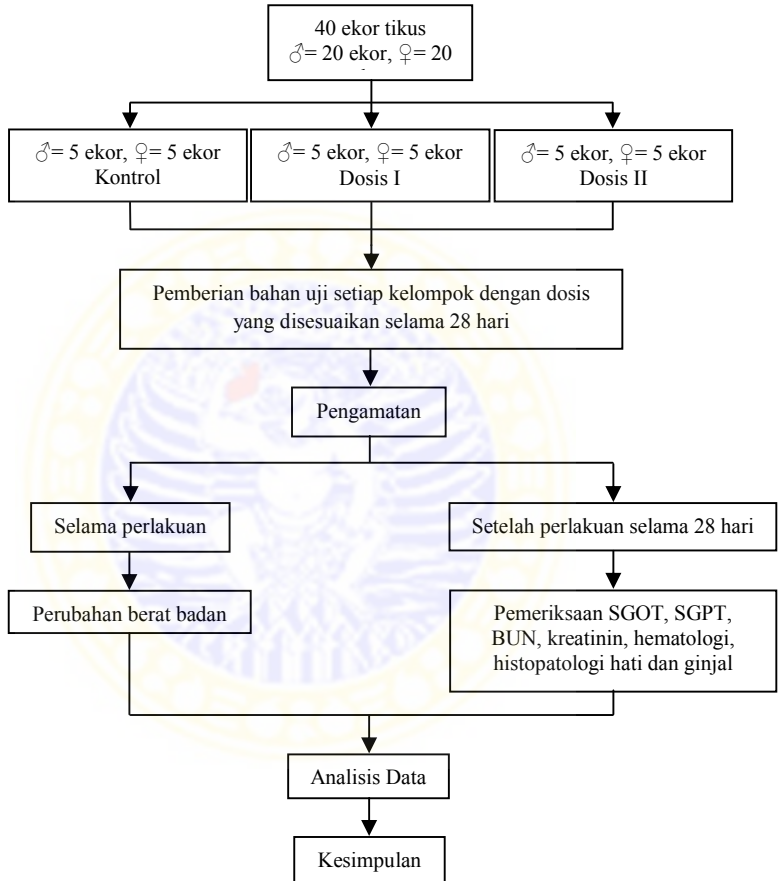
Kategori Kerusakan	Persen Kerusakan *	Skor
Normal	0%	0
Kerusakan ringan	>0% - 50%	1
Kerusakan sedang	>51% - 75%	2
Kerusakan berat	>75%	3

\* berdasarkan pengamatan lima lapang pandang dengan perbesaran 400 kali

Sehingga didapatkan tiga macam data kerusakan sel untuk masing- masing organ hati dan ginjal. Kemudian ketiga data tersebut diolah dan dianalisis dengan menggunakan Uji Kruskal Wallis, dan apabila terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok maka dilanjutkan dengan Uji Perbandingan Berganda (Jones, 2008).

#### 4.4. Skema Penelitian

##### 4.4.1. Uji Toksisitas Subkronik



**Gambar 4.1.** Skema Uji Toksisitas Subkronik