

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada tiga tempat berbeda. Laboratorium Fitokimia Departemen Farmakognosi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga untuk pembuatan ekstrak daun Cikal Tulang (*Cissus quadrangularis*), Rumah Sakit Hewan FKH Universitas Airlangga untuk pemeliharaan hewan coba dan pembedahan serta pengambilan serum tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina, Laboratorium Kimia Klinik Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya untuk mengukur kadar *Alkaline Phosptase* (ALP) tikus.

3.2 Bahan dan Materi Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Daun Cikal Tulang (*Cissus quadrangularis*), kalsium karbonat, ethanol 85%, HCL 1 %, kloroform, ketamin, xylazin, betadine, antibiotik *ampicilin*, aquades, alkohol 96%, kapas, CMC Na 0,5%, serum tikus. Bahan yang digunakan dalam pengujian kadar *Alkaline Phosptase* (ALP) serum darah adalah reagen I (Diethanolamine buffer (DEA) pH 9.8 1,1 mol/L, Magnesium sulfate 0,56 mmol/L, NaN₃ 1 g/L), reagen II (p-nitrophenylphospate 112 mmol/L) dan reagen III (NaN₃ 1 g/L).

3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kandang tikus individu yang dilengkapi tempat makan dan minum, neraca, *feeding tube*, satu unit alat operasi ovariektomi yaitu *scalpel*, *sput*, gunting, klem arteri, pinset anatomis dan sirurgis, *needle holder*, jarum jahit, kain duk dan tampon steril (Firmansyah, 2005). Serta satu unit alat analisa alkalin phosphatase serum darah yaitu: *sput*, tabung serum, sentrifus, mikropipet, tabung reaksi, fotometer dan *Prestige 24i* (Tokyo Boeki Medical System Ltd., Tachikawa-Shi Tokyo).

3.2.3 Hewan Coba dan Pakan

Hewan coba dalam penelitian ini menggunakan tikus betina dewasa galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang didapat di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Tikus betina dalam penelitian ini berjumlah 20 ekor, berumur tiga bulan dengan berat badan 200-250 g yang dibagi secara acak menjadi lima kelompok penelitian (satu kelompok kontrol dan empat kelompok perlakuan). Tikus diberi pakan BUR - II produksi PT. Guyofeed, Surabaya, selama proses adaptasi, penyembuhan dan perlakuan.

3.2.4 Adaptasi Hewan Coba

Hewan percobaan yang akan diberikan perlakuan ditempatkan dalam kandang-kandang individu, diadaptasikan terhadap pakan dan lingkungan selama satu minggu. Selama masa adaptasi hewan coba diberi pakan standar sebanyak 10% berat badan (± 20 g) dan air minum secara *ad libitum*.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Pembuatan Ekstrak Daun Cikal Tulang (*Cissus quadrangularis*)

Tanaman *Cissus quadrangularis* dicuci, dipotong kecil-kecil, diangin-anginkan pada udara kering dan dihancurkan atau digiling hingga menjadi serbuk kering. Serbuk kering diekstraksi dengan etanol 96% menggunakan alat Soxhlet (Potu *et al.*, 2009).

Langkah-langkah ekstraksi, langkah Pertama Sebanyak 785 g serbuk tanaman dimasukkan dalam toples, direndam ethanol 96% dan dibiarkan selama 24 jam kemudian disaring menggunakan corong bugner. Hasil larutan pertama ditampung. Langkah kedua, Hasil rendaman di rendam lagi dengan ethanol selama 24 jam dan disaring menggunakan corong bugner. Hasil larutan ke-dua ditampung. Kemudian Langkah 2 diulang hingga dihasilkan larutan ke-tiga. Ketiga larutan dikumpulkan dan diuapkan menggunakan alat *rotavapour* sehingga didapatkan ekstrak kental.

3.3.2 Pengenceran Ekstrak Daun Cikal Tulang (*Cissus quadrangularis*)

Sebelum digunakan untuk perlakuan, ekstrak daun *cissus quadrangularis* harus diencerkan terlebih dahulu supaya ekstrak ethanol *cissus quadrangularis* dapat diberikan dalam dosis yang diinginkan setelah disesuaikan dengan volume lambung tikus sebesar 1,5 ml. Ekstrak daun *Cissus quadrangularis* terlebih dahulu ditimbang sesuai dengan dosis yang akan diberikan yaitu 500 mg/kg bb dan 750 mg/kg bb. Kemudian CMC Na 0,5% yang akan digunakan untuk melarutkan ekstrak daun *Cissus*

quadrangularis ditimbang seberat 30 mg. CMC Na 0,5% dilarutkan terlebih dahulu ke dalam 60 ml aquades mendidih, kemudian diaduk sampai CMC Na 0,5% terlarut. Selanjutnya dosis pertama 500 mg ekstrak daun *Cissus quadrangularis* diletakkan di dalam mortir dan diaduk sambil dituangkan larutan CMC Na 0,5%, hal tersebut juga dilakukan pada dosis kedua yaitu 750 mg/kg bb (Potu *et al.*, 2009).

3.3.3 Pemeriksaan *Alkaline Phosptase* (ALP)

Pengujian *Alkaline Phosptase* (ALP) dilakukan di Laboratorium Kimia Klinik, Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya menggunakan alat auto analyzer Prestige 24i. Prestige 24i merupakan alat untuk pemeriksaan seluruh parameter kimia klinik. Prinsip kerja untuk pemeriksaan *Alkaline Phosptase* (ALP) adalah *p-nitrophenylphosphatase* bersama dengan air akan diubah oleh enzim *Alkaline Phosptase* (ALP) menjadi fofat dan *p-nitrophenylphosphatase*.

Prosedur pemeriksaan *Alkaline Phosptase* (ALP) yaitu diawali dengan memasukkan sampel kedalam alat Prestige 24i yang telah terisi reagen. Sampel darah akan di sentrifuge secara otomatis selama 5-10 menit dengan kecepatan 3000 rpm untuk mendapatkan serum darah. Serum sebanyak 300 mikro liter akan direaksikan dengan reagen lalu angka *Alkaline Phosptase* (ALP) akan terbaca secara digital.

3.4 Perlakuan

Pada hari ke delapan setelah hewan diadaptasikan selama tujuh hari, hewan coba dibagi secara acak dalam lima perlakuan, masing-masing terdiri dari empat ekor tikus betina sebagai ulangan. Masing-masing hewan coba yang telah diacak ditempatkan dalam kandang individu sesuai perlakuan.

Perlakuan meliputi P0 : hewan coba normal dengan pakan standar tanpa pemberian obat apapun dan tanpa perlakuan ovariektomi, fungsinya adalah untuk melihat *alkaline phosphatase* (ALP) serum normal tikus putih. P1 : hewan coba ovariektomi dengan pakan standard, fungsinya untuk melihat kadar *alkaline phosphatase* (ALP) serum setelah ovariektomi, namun tetap diberikan CMC Na peroral sebanyak 1,5 ml selama 42 hari berturut-turut. P2 : hewan coba ovariektomi dengan pakan standar dengan dosis efektif suplementasi kalsium karbonat 450 mg/ekor/hari dan dicampur dengan CMC Na peroral sebanyak 1,5 ml (Firmansyah, 2005). P3 : hewan coba ovarietomi dengan pakan standar dengan suplementasi ekstrak *Cissus quadrangularis* 500 mg/kg berat badan dan dicampur dengan CMC Na peroral dengan teknik sonde sebanyak 1,5 ml, dosis tersebut aman untuk hewan dan tidak menunjukkan efek yang merugikan didasarkan pada uji toksisitas akut (Potu *et al.*, 2009). P4 : hewan coba ovariektomi dengan pakan standar dengan suplementasi ekstrak *Cissus quadrangularis* 750 mg/kg berat badan dan dicampur dengan CMC Na peroral dengan teknik sonde sebanyak 1,5 ml.

3.4.1 Pembuatan Model Tikus Osteoporosis

Pembuatan model tikus osteoporosis melalui ovariektomi. Analoginya diasumsikan menyerupai kejadian anjing atau kucing yang telah *di ovariohisterektomi*. Pelaksanaan pembuatan model tikus osteoporosis ini dilakukan selama dua hari, yaitu hari ke delapan dan sembilan.

a. Pre Operasi

Sebelum operasi, dilakukan penimbangan berat badan untuk menentukan dosis anestesi. Selanjutnya tikus dianestesi dengan menggunakan kombinasi *ketamin* (25 mg/kg bb) dan *xylazin* (8 mg/kg bb) (Flecknell, 1987).

Setelah tikus teranestesi terlebih dahulu dilakukan pencukuran bulu dari pubis sampai *arcus costae* yang diperluas ke arah kiri kanannya hingga ke kelenjar *mammae*. Daerah yang telah dicukur kemudian didesinfektan dengan betadine. Tikus percobaan kemudian diletakkan dengan posisi rebah dorsal (*dorsal recumbency*). Kain *drape* steril dipasang untuk menutup sekitar area operasi termasuk tubuh tikus (Wicaksono, 2011).

b. Teknik Operasi

Irisan pada dinding abdomen dilakukan melalui *linea mediana* yaitu tepat di posterior umbilicus ke arah caudal. Panjang irisan dibuat secukupnya. Kulit dan jaringan subkutan diinsisi dengan pisau bedah. Setelah itu, dinding abdomen di buka melalui *linea alba* dengan menggunakan gunting dan *groove director* sebagai pemandunya agar tidak

menggunting organ visceral. Setelah dinding abdomen terbuka, organ reproduksi dicari dengan mengidentifikasi corpus uteri yang terletak di bawah vesica urinaria bagian dorsal, ditelusuri ke arah cranial kornua kiri sampai ditemukan ovarium kiri. Dengan arteri klem ligamentum dan pembuluh darah diklem (sebelah cranial ovarium). Ovarium diangkat dan pada bagian caudal ovarium diklem. Kemudian dilakukan ligasi di atas klem bawah menggunakan benang *absorbable (cat gut chromic)*. Selanjutnya dilakukan pemotongan di antara ligasi dan klem bawah, dan dipastikan tidak terjadi pendarahan serta semua jaringan ovarium terangkat. Klem dilepas dan sisa potongan jaringan uterus dibiarkan masuk kembali ke rongga abdomen. Selanjutnya, ovarium kanan ditarik keluar dari insisi, kemudian dilakukan prosedur yang sama seperti mengangkat ovarium kiri (Wicaksono, 2011).

c. Post Operasi

Pasca pengangkatan ovarium, selanjutnya dilakukan irigasi dengan menggunakan NaCl fisiologis secukupnya. Kemudian dilakukan penjahitan untuk menutup luka insisi. Muskulus rectus abdominis maupun lapisan peritonium dijahit dengan jahitan terputus sederhana menggunakan *cat gut* sedangkan kulit dijahit dengan pola jahitan matras silang menggunakan benang *silk*. Setelah operasi selesai, daerah jahitan abdomen diusap dengan betadine, dan ditutup dengan *hypafix*. Selama masa *recovery* dilakukan perawatan luka (pemberian betadine, penggantian *hypafix* dan injeksi intramuskular *ampicillin* dosis 150 mg/kg berat badan)

selama satu minggu dan setelah satu minggu jahitan dibuka (Firmansyah, 2005).

3.4.2 Perlakuan Suplementasi Kalsium & *Cissus quadrangularis*

Perlakuan suplementasi kalsium dan *Cissus quadrangularis* masing-masing diberikan secara peroral menggunakan feeding tube yang dicampur dengan CMC Na sebanyak 1,5 ml pada pagi hari selama 42 hari berturut-turut yaitu mulai hari ke 10 sampai hari ke 52, berdasarkan penelitian Firmansyah (2005) tikus ovariectomi telah dapat menimbulkan osteoporosis dalam waktu 42 hari. Selama masa perlakuan, hewan coba diberi pakan standar sebanyak 10% berat badan ± 20 g /ekor/hari dan air minum secara ad libitum.

Pada tabel 3.1 dapat dilihat pembagian tikus menjadi lima kelompok, yang masing-masing terdiri dari 4 ekor tikus betina.

Tabel 3.1

Kelompok Perlakuan pada Tikus

Perlakuan	Pemberian obat	Tujuan
P0 Kontrol Normal (n=4)	-	melihat <i>Alkaline Phosphatase (ALP)</i> normal tikus
P1 Ovariectomi (n=4)	-	melihat kadar <i>Alkaline Phosphatase (ALP)</i> tikus ovariectomi

P2	Ovariectomi + Kalsium Karbonat (n=4)	Kalsium Karbonat 450 mg/ekor/hari	membandingkan kadar <i>Alkaline Phosphatase</i> (ALP)
P3	Ovariectomi + ekstrak <i>Cissus quadrangularis</i> (n=4)	Ekstrak <i>Cissus quadrangularis</i> 500 mg/kg bb	setelah pemberian Kalsium Karbonat dan ekstrak <i>Cissus quadrangularis</i>
P4	Ovariectomi + ekstrak <i>Cissus quadrangularis</i> (n=4)	Ekstrak <i>Cissus quadrangularis</i> 750 mg/kg bb	dosis bertingkat

3.5 Teknik Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari masing-masing kelompok setelah perlakuan selama 42 hari. Pada hari ke-53 Sampel darah didapatkan dari darah tikus melalui vena orbita, menggunakan *disposable syringe* 3 ml sebanyak 2 ml.

3.5.1 Penanganan Sampel di Laboratorium

Sampel darah tikus yang diambil dari vena orbita sebanyak 2 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditunggu selama 10 menit hingga keluar serumnya. Kemudian serum disentrifugasi dengan kecepatan 3600 rpm, pada suhu 3°C selama tiga puluh menit dengan *Hettich Zentrifugen*. Selanjutnya serum dimasukkan ke dalam tabung eppendorf dan disimpan di dalam lemari es pada suhu 4°C.

3.5.2 Perlakuan Serum

Pemeriksaan kadar *alkaline Phosphatase* (ALP) dilakukan di Laboratorium Kimia Klinik, Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya. dengan menggunakan *Prestige 24i* (Tokyo Boeki Medical System Ltd., Tachikawa-Shi Tokyo), pemeriksaan ALP menggunakan panjang gelombang 405 nm karena pada panjang gelombang tersebutlah didapat serapan maksimum. Aktifitas alkalin phosphatase ditetapkan dengan metode standar yang dioptimalisasikan sesuai rekomendasi. Prinsip kerjanya adalah *p-nitrophenylphosphate* bersama dengan air akan diubah oleh enzim alkalin phosphatase menjadi fosfat dan *p-nitrophenol*.

3.6 Variabel Penelitian

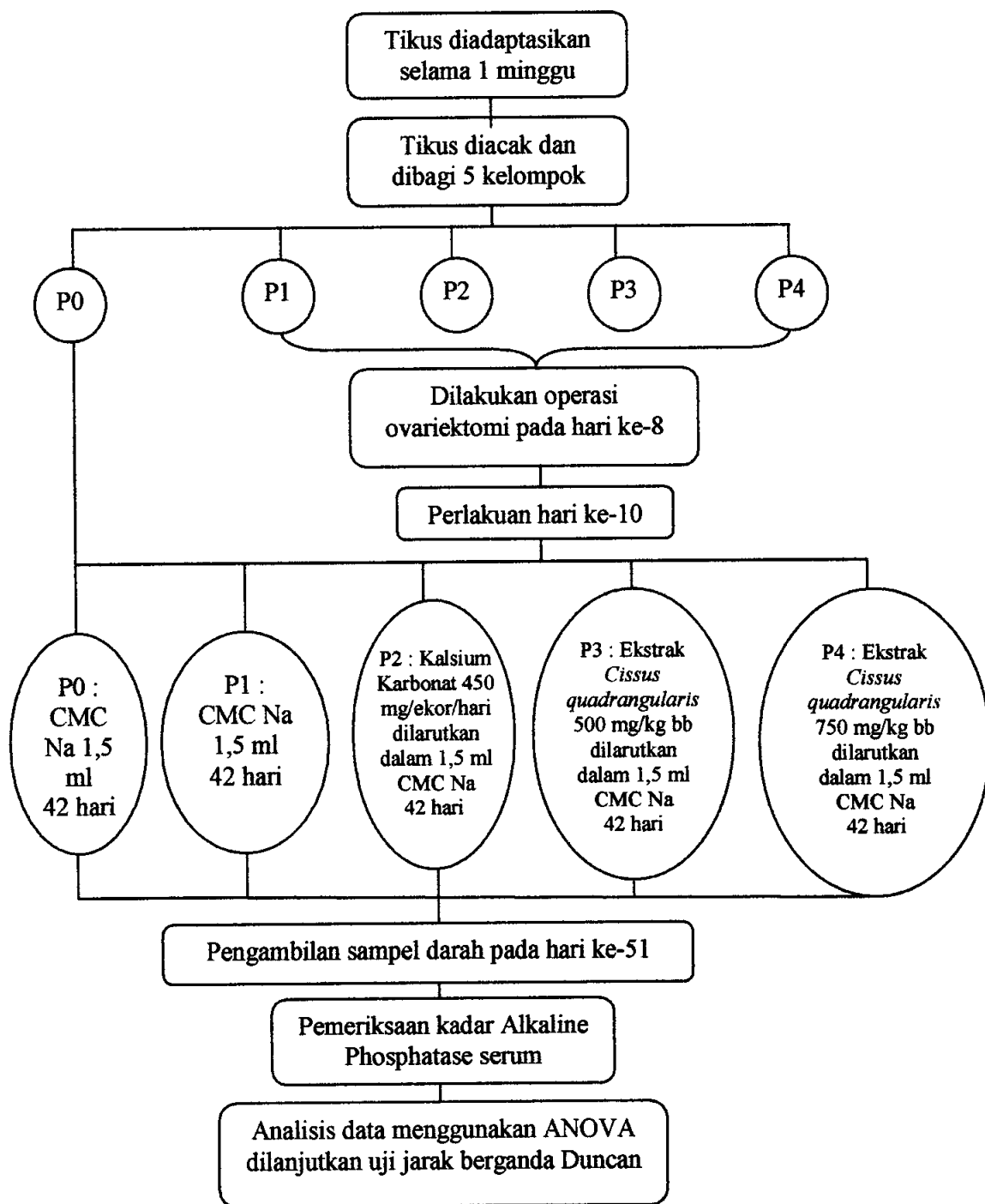
Variabel Bebas pada penelitian ini adalah dosis ekstrak daun Cikal Tulang. Variabel Tergantung pada penelitian ini adalah kadar *Alkaline Phosphatase* (ALP) serum darah tikus. Variabel Terkendali adalah Jenis, usia, berat badan hewan coba, perlakuan terhadap hewan coba, kandang, ruang penelitian, peralatan, pemilihan alat ukur dari hasil penelitian, bahan-bahan yang digunakan di dalam penelitian.

3.7 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dan empat kali ulangan (Kusriningrum, 2008).

Data akan dianalisis statistik menggunakan SPSS 17.0 for windows software (SPSS, Chicago, IL, USA). Perbedaan diantara kelompok perlakuan dievaluasi menggunakan ANOVA, dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan (Steel *and* Torrie, 1993).

3.8 Diagram Alir Prosedur Penelitian



Gambar 3.1
Diagram alir pelaksanaan penelitian