

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan, Alat, Hewan Coba dan Rancangan Penelitian

4.1.1 Bahan Penelitian

Pada penelitian ini digunakan ekstrak kering Daun Afrika yang diperoleh dari simplisia kering daun tanaman. Tanaman berasal dari kota Surabaya. Metode ekstraksi yang dilakukan adalah maserasi dengan larutan pengeksrak etanol 70%. Tanaman ini telah diidentifikasi di Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan.

4.1.2 Bahan Kimia dan Bahan Lain

Bahan lain yang juga digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%, *microcel*, *corn starch*, CMC-Na, aloksan, telur puyuh, PTU, kolesterol dan atorvastatin.

4.1.3 Alat

Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak adalah *blender*, corong Buchner, rotavapor dan oven. Selain itu juga digunakan alat untuk mengukur kolesterol *Glucometer Easy Touch 3in1*, *chip* kolesterol dan strip kolesterol.

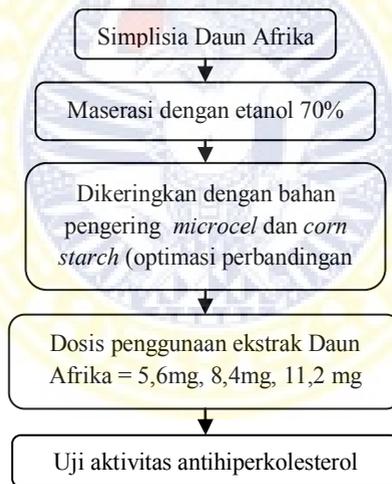
4.1.4 Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus*) yang diperoleh dari Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, dengan kriteria sebagai berikut :

1. Berasal dari galur Balb – C.
2. Berumur 8 minggu.
3. Berat badan 20 – 30 gram.
4. Berada dalam keadaan sehat dan normal.

Banyaknya sampel ditentukan dengan rumus *Federer's* sebagai berikut, $(n - 1)(T - 1) \geq 15$, “ n ” adalah jumlah sampel tiap kelompok perlakuan, dan “ T ” adalah jumlah kelompok perlakuan. Pada penelitian ini digunakan 6 kelompok perlakuan, sehingga jumlah mencit dalam tiap kelompok minimal 4 ekor, dalam penelitian ini digunakan 5 ekor mencit untuk tiap kelompok perlakuan.

4.1.5 Rancangan Penelitian



Gambar 4.1. Rancangan penelitian

4.2 Uji Aktivitas Penurunan Kadar Kolesterol

4.2.1 Penginduksian Hiperkolesterol

Keadaan hiperkolesterol diperoleh dengan induksi aloksan pada mencit secara intraperitoneal, dengan dosis aloksan monohidrat 150 mg/kg

(3 mg/20 g) BB). Aloksan pada kadar 70 mg/kg sudah menimbulkan efek diabetonik pada tikus (Akah *et al*, 2009), namun pada beberapa penelitian sebelumnya digunakan 150 mg/kg BB pada tikus (Modu *et al*, 2013) dan 125mg/kg BB pada mencit (Zulfiker *et al*, 2011). Mencit yang digunakan adalah mencit dengan keadaan hiperkolesterol, yaitu kadar kolesterol ≥ 200 mg/dl, atau sudah mengalami kenaikan $\geq 50\%$ kadar kolesterol awal. Sebelum diinduksi aloksan, mencit dipuaskan terlebih dahulu selama 18 jam dan hanya boleh diberi air, sekam dalam kandang juga dikeluarkan dari kandang (Modu *et al*, 2013; Zulfiker *et al*, 2011). Setelah diinduksi aloksan, mencit diberi diet tinggi kolesterol yang terdiri atas 2% kolesterol, 0,02% PTU dan telur puyuh selama 4 hari berturut-turut. Kadar kolesterol mencit diamati pada hari keempat setelah induksi aloksan, mencit dengan kadar kolesterol > 200 mg/dl digunakan dalam penelitian.

4.2.2 Penentuan Dosis

4.2.2.1 Dosis Atorvastatin

Dosis awal atorvastatin oral bagi pasien dewasa adalah 10-20 mg sekali dalam sehari. Untuk pasien yang membutuhkan penurunan kadar kolesterol dalam jumlah besar dapat digunakan dosis 1x40 mg, sehari (Harvey, 2012). Untuk konversi dari manusia (70 kg) ke mencit (20g) adalah sebesar 0,0026 (Laurence and Bacharach, 1964 disitasi oleh Lubis, 2013). Sehingga dosis atorvastatin untuk mencit adalah $0,0026 \times 10 \text{ mg} = 0,026 \text{ mg}/20 \text{ g}$ BB mencit.

4.2.2.2 Dosis Ekstrak Daun Afrika

Dosis efektif ekstrak Daun Afrika untuk hipolipidemik adalah 200 mg/kg BB tikus (Nwanjo, 2005), setelah dikonversikan dalam dosis mencit ($40 \text{ mg}/200 \text{ g} \times 0,14 = 5,6 \text{ mg}/20 \text{ g}$). Dalam penelitian ini digunakan tiga

macam dosis ekstrak Daun Afrika yaitu, 5,6mg/ 20g, 8,4mg/ 20g, dan 11,2mg/ 20g BB mencit.

4.2.3 Pembuatan Suspensi Atorvastatin

Dosis atorvastatin untuk tiap hewan coba mencit adalah 0,026 mg/20 g BB mencit. Untuk 25 ml suspensi atorvastatin dengan kadar 0,026 mg/ml dibutuhkan atorvastatin sebanyak $25 \times 0,026 = 0,65$ mg. Suspensi dibuat dalam CMC-Na 0,5%.

Cara pembuatan suspensi atorvastatin dalam CMC-Na 0,5% adalah sebagai berikut,

1. 1 tablet atorvastatin 40mg diambil, digerus ad halus lalu ditimbang (misal= A mg).
2. Serbuk atorvastatin ditimbang sebanyak $(0,65\text{mg}/ 40\text{mg}) \times A \text{ mg} = B \text{ mg}$ serbuk atorvastatin.
3. CMC-Na ditimbang sebanyak $25 \times 0,5\% = 0,125$ gram \rightarrow 125 mg.
4. CMC-Na didispersikan dalam air sebanyak 20 kali $\rightarrow 0,125 \text{ g} \times 20 = 2,5$ ml.
5. CMC-Na didiamkan selama ± 15 menit, lalu aduk ad terbentuk musilago dan homogen.
6. B mg serbuk atorvastatin ditambahkan ke dalam musilago CMC-Na lalu aduk ad homogen.
7. Aquades ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam campuran atorvastatin dan musilago, sambil diaduk.
8. Campuran dipindahkan ke dalam labu ukur 25,0 ml lalu ditambahkan aquades ad tanda dan kocok ad homogen.

4.2.4 Pembuatan Suspensi Ekstrak Kering Daun Afrika

Dalam percobaan ini, mencit diberikan suspensi ekstrak daun afrika dalam CMC-Na 0,5% sebanyak ≤ 1 ml untuk sekali konsumsi. Untuk

membuat suspensi 25 ml dibutuhkan CMC-Na sebanyak $(25 \times 0,5\%) = 0,125$ g (125mg). Akan dibuat suspensi ekstrak Daun Afrika dengan kadar 20 mg/ml, sehingga untuk membuat 25 ml suspensi perlu ditimbang ekstrak Daun Afrika sebanyak $(20 \text{mg} \times 25) = 500 \text{mg}$. Berikut ini cara pembuatan suspensi dan jumlah yang diperlukan untuk tiap kadar penelitian:

Cara pembuatan :

- Ekstrak kering Daun Afrika ditimbang sebanyak 834mg, sehingga didapatkan $(834 \text{mg} \times \frac{60}{100}) = 500$ mg ekstrak Daun Afrika.
- CMC-Na ditimbang sebanyak 125 mg \rightarrow dispersikan dalam $20 \times 0,125 \text{g} = 2,5 \text{ml}$ air.
- CMC-Na didiamkan selama ± 15 menit, lalu aduk ad terbentuk musilago dan homogen.
- Ekstrak kering Daun Afrika ditambahkan ke dalam musilago CMC-Na lalu diaduk ad homogen.
- Aquades ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam campuran ekstrak Daun Afrika dan musilago, sambil diaduk.
- Campuran ditambahkan ke dalam labu ukur 25,0 ml lalu tambahkan aquades ad tanda dan kocok ad homogen.

Suspensi yang dibutuhkan untuk tiap kadar penelitian:

- Dosis 200 mg/kg BB.
Konversi dosis tikus (200 g) ke mencit (20 g) = $40 \text{ mg} / 200 \text{ g} \times 0,14 = 5,6 \text{ mg} / 20 \text{ g}$ BB mencit. Jumlah suspensi yang dibutuhkan $(5,6 \text{ mg} / 20 \text{ mg}) = 0,3 \text{ ml}$.
- Dosis 300 mg/kg BB tikus = $8,4 \text{ mg} / 20 \text{ g}$ BB mencit.
Jumlah suspensi yang dibutuhkan = 0,4 ml.
- Dosis 400 mg/kg BB tikus = $11,2 \text{ mg} / 20 \text{ g}$ BB mencit.
Jumlah suspensi yang dibutuhkan = 0,5 ml.

4.2.5 Perawatan terhadap Hewan Coba

Hewan coba mencit yang digunakan diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium selama seminggu dan ditempatkan di dalam kandang dengan suhu ruangan yang konstan ($25,0 \pm 3,0^{\circ}\text{C}$), kelembapan 35-60%. Berikan pencahayaan selama 12 jam dan 12 jam berikutnya dalam keadaan gelap. Melakukan pembuangan kotoran mencit dilakukan setiap hari. Sebelum diinduksi aloksan, mencit dipuasakan selama 10-16 jam, pada penelitian ini mencit dipuasakan 18 jam. (Zulfiker *et al*, 2011).

4.2.6 Protokol Penelitian Uji Aktivitas

Hewan coba ditempatkan dalam kandang secara berkelompok, tiap kelompok terdiri atas 5 ekor mencit. Selama penelitian, jumlah makanan dan minuman dijaga dalam jumlah yang cukup. 30 mencit dibagi menjadi 1 kelompok kontrol normal terdiri atas 5 mencit yang tidak diinduksi hiperkolesterol, dan 25 mencit yang memiliki kadar kolesterol tinggi dipilih sebagai hewan coba dan dibagi dalam 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor, yaitu:

1. Kelompok kontrol negatif, diberi suspensi *corn starch* dan *microcell* dalam CMC-Na 0,5% sehari sekali.
2. Kelompok kontrol positif, diberi suspensi atorvastatin dengan dosis 0,026mg/20g BB mencit sehari sekali.
3. Kelompok I, diberi suspensi ekstrak kering Daun Afrika dengan dosis 5,6 mg/20 g BB mencit, sehari sekali.
4. Kelompok II, diberi suspensi ekstrak kering Daun Afrika dengan dosis 8,4 mg/20 g BB mencit, sehari sekali.
5. Kelompok III, diberi suspensi ekstrak kering Daun Afrika dengan dosis 11,2mg/20 g BB mencit, sehari sekali.

4.2.7 Cara Kerja

1. Mencit dipuaskan selama \pm 18 jam dengan tetap diberi minum yang cukup.
2. Mencit diinduksi aloksan 3mg/20g BB mencit secara injeksi intraperitoneal.
3. Kadar kolesterol mencit dievaluasi pada hari keempat setelah induksi aloksan untuk melihat kadar kolesterol yang termasuk dalam hiperkolesterol (≥ 200 mg/dl) dan dimasukkan sebagai hari ke-0 perlakuan.
4. Mencit ditimbang dan dikelompokkan dalam 6 kelompok, masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor.
5. Mencit diberi perlakuan sesuai kelompok perlakuannya selama 7 hari.
6. Kadar kolesterol darah pada mencit diperiksa pada hari ke-0, ke-3, ke-5 dan ke-7. Sampel darah diambil dengan cara sedikit melukai ujung ekor mencit kemudian diukur dengan alat pengukur kolesterol darah.
7. Hasil data dilakukan analisis statistik ANOVA *one way* untuk pengambilan hipotesa.

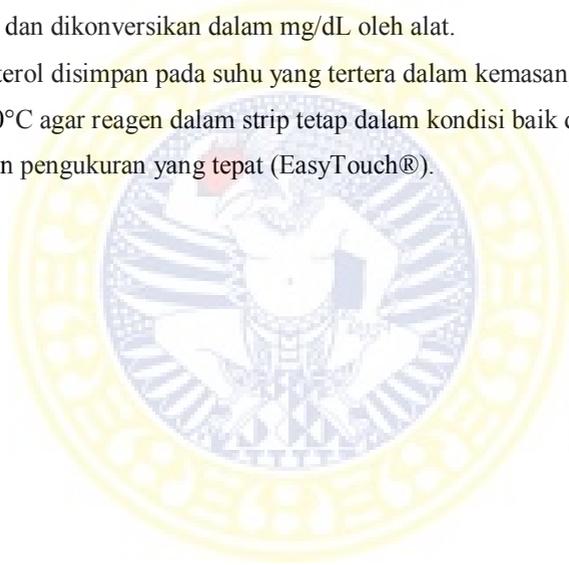
4.2.8 Tinjauan Cara Kerja Alat

Alat yang digunakan untuk mengukur kadar gula darah hewan coba adalah *Glucometer (GCU) 3in1 Easy Touch*. Pada alat tersebut terdapat 3 chip masing – masing untuk mengukur kadar glukosa, asam urat dan kolesterol. Cara mengukur kadar kolesterol dengan glukometer GCU adalah sebagai berikut,

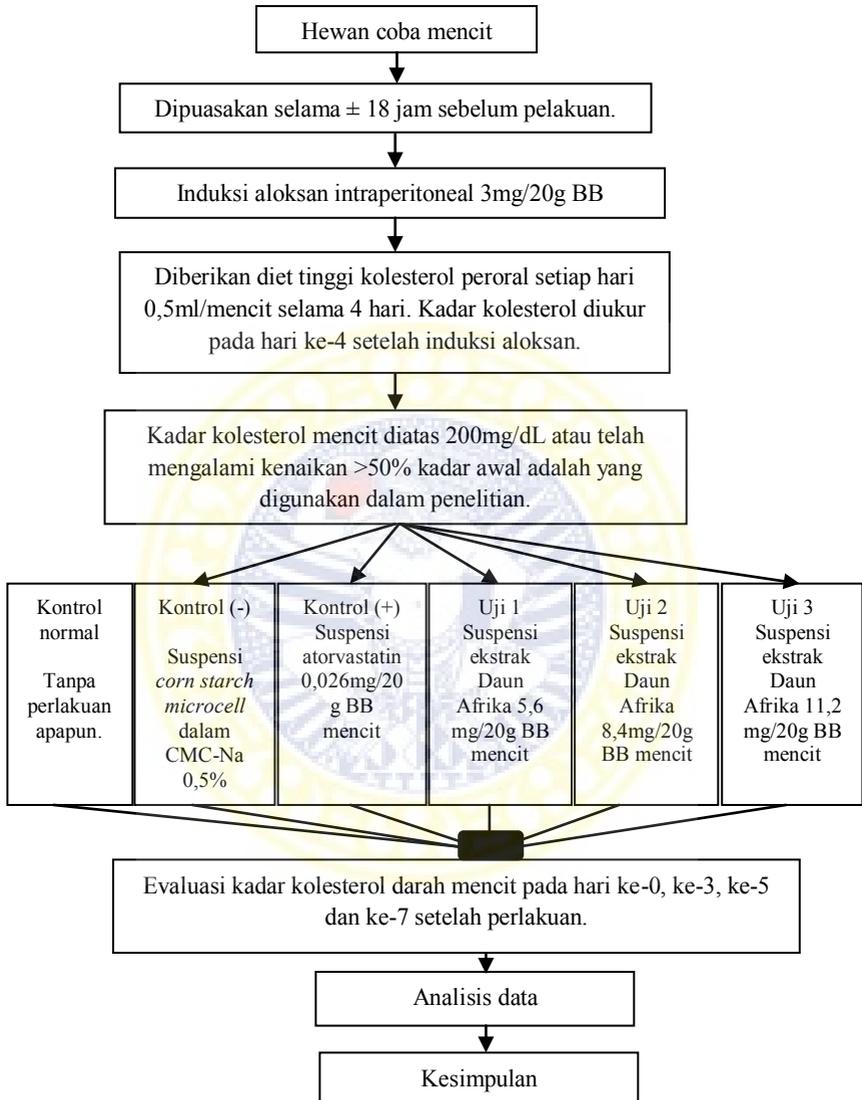
1. Strip kolesterol dengan merk yang sama dengan alat disiapkan.
2. Chip kolesterol yang terdapat dalam kemasan strip kolesterol (memiliki kode yang sama dengan strip kolesterol) dimasukkan dalam alat glukometer.

3. Strip kolessterol dimasukkan ke dalam alat jika darah dari ekor mencit sudah siap.
4. Darah dari ekor mencit disentuhkan pada kapiler strip hingga penuh kemudian tunggu beberapa saat sampai alat menunjukkan kadark kolessterol.
5. Dalam strip terdapat reagen kering yaitu *cholesterol oxidase* yang akan bereaksi dengan darah.
6. Reaksi reagen dengan darah menghasilkan perubahan warna yang akan diukur dan dikonversikan dalam mg/dL oleh alat.

Strip kolessterol disimpan pada suhu yang tertera dalam kemasan, yaitu dibawah 30°C agar reagen dalam strip tetap dalam kondisi baik dan dapat memberikan pengukuran yang tepat (EasyTouch®).



4.2.9 Skema Cara Kerja



Gambar 4.2 Skema Cara Kerja

4.3 Analisis Statistik

Aktivitas penurunan kolesterol plasma oleh ekstrak kering Daun Afrika dianalisis menggunakan metode *ANOVA One Way*. Efektivitas penurunan kadar kolesterol oleh Daun Afrika dibandingkan dengan kontrol negatif dan diproses sebagai *mean ± SEM*, lalu perbedaan rata-rata masing-masing kelompok dianalisis dengan metode *ANOVA One Way*. Hipotesis yang diajukan adalah :

H_0 = tidak ada sepasang kelompok yang berbeda secara signifikan.

H_a = minimal ada satu pasang kelompok yang berbeda secara signifikan.

Untuk menilai hipotesis statistik, ditentukan harga p hitung yang akan dibandingkan dengan harga tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0.05$). Untuk penelitian uji aktivitas penurun kolesterol ini, bila p hitung < harga $\alpha = 0.05$, maka H_0 ditolak dan H_a diterima.

4.4 Profil Metabolit

Studi profil metabolit dilakukan sebagai data awal profil Daun Afrika daerah Surabaya. Studi profil metabolit dilakukan dengan metode KLT sebagai berikut,

Fase diam : Silika gel GF 254 (Merck®).

Fase gerak : kloroform: metanol (9:1)

Solven : etanol 70%

Densitometer : CAMAG® TLC Scanner.

Analisa lampu UV : 254nm dan 366 nm.