

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan, Lokasi, dan Waktu Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan yang diinduksi CCl₄. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biosains UB selama 5 bulan dengan diawali RAK (Rancangan Acak Kelompok). Sebelum dilakukan perlakuan, semua tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama 10 hari kemudian dibagi menjadi 5 kelompok.

4.2 Subjek dan Sampel Penelitian

4.2.1 Kriteria dan Teknik Pengambilan Sampel

Hewan coba tikus yang digunakan pada penelitian ini harus memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Teknik pengambilan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah *simple random sampling* menggunakan rancangan acak kelompok (RAK). Berikut adalah kriteria tikus yang digunakan pada penelitian ini:

Kriteria Inklusi:

- a) Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar .
- b) Jantan
- c) Usia 6-8 minggu.
- d) Berat badan \pm 150-200 gram.

- e) Sehat, yang ditandai dengan bergerak aktif.

Kriteria Eksklusi:

- a) Memiliki kelainan anatomi (cacat fisik).

4.2.2 Besaran Sampel

Dalam penelitian ini, digunakan enam kelompok penelitian yang terdiri dari dua kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan. Estimasi jumlah sampel untuk masing-masing kelompok dihitung menggunakan rumus Federer (Federer, 1955):

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

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

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 5$$

Keterangan:

t : jumlah perlakuan

r : jumlah replikasi atau ulangan

Dari hasil perhitungan, diperlukan jumlah replikasi atau ulangan paling sedikit adalah 4 kali untuk masing-masing kelompok, namun karena pada beberapa penelitian CCl_4 terdapat kematian pada 1-2 ekor tikus (angka mortalitas lebih tinggi daripada kelompok kontrol normal) maka pada tiap kelompok dilebihkan 1 tikus sehingga jumlah total tikus yang dibutuhkan dalam penelitian ini secara keseluruhan adalah 30 ekor.

4.2.3 Kelompok Penelitian

Kelompok penelitian terdiri dari 25 ekor tikus yang dibagi secara acak (KN, KP, P1, P2, dan P3) dengan ketentuan sebagai berikut:

Tabel 4.1 Desain eksperimen dan hewan coba

Kelompok	Jumlah	Perlakuan
1. Kelompok tanpa perlakuan CCl ₄ (KN)	5	Minyak zaitun (i.p)
2. Kelompok perlakuan CCl ₄ (KP)	5	CCl ₄ dalam minyak zaitun (i.p) ^a
3. Kelompok Silimarin (P1)	5	CCl ₄ dalam minyak zaitun (i.p) + Silimarin (p.o) ^b
4. Kelompok LOLA (P2)	5	CCl ₄ dalam minyak zaitun (i.p) + LOLA (p.o) ^c
5. Kelompok Jamu Kombinasi <i>Curcuma xanthorrhiza</i> dan <i>Nigella sativa</i> (P3)	5	CCl ₄ dalam minyak zaitun (i.p) + Kombinasi <i>Curcuma xanthorrhiza</i> dan <i>Nigella sativa</i> (p.o) ^d

Keterangan tabel :

^a: 0,4ml/kgBB CCl₄ dalam minyak zaitun 1 mL/kgBB injeksi intraperitoneal (i.p)

^b: 37,8 mg/kgBB silimarin, pemberian per oral (p.o)

^c: 810 mg/kgBB LOLA, pemberian per oral (p.o)

^d: 315 mg/kgBB Jamu Kombinasi *Curcuma xanthorrhiza* dan *Nigella sativa*, pemberian per oral (p.o)

4.2.4 Dosis CCl₄ dan terapi

4.2.3.1 Dosis CCl₄

Induksi CCl₄ mengacu pada penelitian Shaker *et al.*, (2011) dengan dosis 0,4 mg/kgBB CCl₄ (40% CCl₄ dalam minyak zaitun, 1 ml/kgBB) secara intraperitoneal (i.p) sebanyak 2 kali seminggu selama 8 minggu mampu membuat tikus model fibrosis hati.

Minyak zaitun adalah pelarut dari CCl₄.

Perhitungan dosis CCl₄ berdasarkan BB tikus :

- Perbandingan CCl₄ dan Minyak zaitun adalah 40 : 60, sehingga

$$\text{Dosis CCl}_4 : \frac{\text{BB (gr)}}{1000} \times 0,4$$

$$\text{Dosis Minyak zaitun} : \frac{\text{BB (gr)}}{1000} \times 0,6$$

Menurut Shaker *et al.*, (2011), pemberian CCl₄ selama 8 minggu menimbulkan efek inflamasi, nekrosis dan steatosis secara makrovesikular atau mikrovesikular yang mengakibatkan kondisi fibrosis. Selain itu, dapat menimbulkan kerusakan hepar yang parah yang ditandai dengan peningkatan signifikan pada kadar ALT, AST dan ALP. Sehingga pemberian CCl₄ selama 8 minggu pada penelitian ini diharapkan juga dapat membuat tikus model fibrosis.

4.2.4.2 Dosis Jamu Kombinasi *Curcuma xanthorriza* dan *Nigella sativa*

Pemberian terapi secara sonde per oral dilakukan setiap hari mulai dari minggu ke-5 hingga 8 dengan dosis Jamu Kombinasi *Curcuma xanthorriza* dan *Nigella sativa* sebesar 0,315 mg/kgBB (CV Royal Medica Makasar).

Perhitungan dosis jamu menggunakan konversi dari manusia ke tikus menggunakan tabel konversi 4.2

Tabel 4.2. Tabel Konversi Dosis (Harmita & Radji, 2008)

Hewan Percobaan	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmut 400 g	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmut 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 2 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,2
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

Perhitungan dosis Kombinasi *Curcuma xanthorriza* dan *Nigella sativa* pada manusia yang dikonversi pada tikus (CV Royal Medica Makasar) :

- Dosis Kombinasi *Curcuma xanthorriza* dan *Nigella sativa* = 3 gram/60 kgBB pada manusia
- Konversi dosis manusia 70 kg ke tikus 200 gram = 0,018
- Dosis manusia 70 kg = $\frac{70 \text{ kg}}{60 \text{ kg}} \times 3 \text{ gram} = 3,5 \text{ gram}$
- Dosis tikus 200 g = 3,5 gram x 0,018 = 0,063 gram = 63 mg
- Dosis per kgBB = 0,315 mg

Maka dosis Jamu Kombinasi *Curcuma xanthorriza* dan *Nigella sativa* yang digunakan adalah 0,315 mg/grBB. Selama pemberian terapi, induksi CCl₄ tidak dihentikan. Hal ini untuk mengetahui gambaran seberapa besar kemampuan jamu dalam menghambat progresifitas kerusakan hepar yang berkelanjutan.

4.2.4.3 Dosis Silimarin

Dosis Silimarin yang digunakan mengacu pada penelitian Salmi (2001) dalam Medscape dengan dosis manusia yang dikonversi ke tikus. Berikut perhitungan dosis Silimarin pada tikus :

- Dosis pada manusia : 420 mg/hari
- Dikonversi ke 200 gr tikus : $420 \text{ mg} \times 0,018 = 7,56 \text{ mg}/200 \text{ gr tikus}$
- Dosis per gr BB tikus :

$$= \frac{1 \text{ gr}}{200 \text{ gr BB tikus}} \times 7,56 \text{ mg}$$

$$= 0,0378 \text{ mg/ grBB tikus}$$

Pada akhir penelitian Salmi (2001), dosis 420 mg/hari mampu menurunkan kadar AST dan ALT rata-rata hingga 30,1 % dan 40,8 % pada pasien gangguan hepar. Sedangkan pada kadar bilirubin tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan.

4.2.3.4 Dosis L-ornithin L-aspartate (LOLA)

Dosis LOLA yang digunakan mengacu pada penelitian Poo *et al.*, (2006) dengan dosis manusia yang dikonversi ke tikus. Dosis yang digunakan ditujukan kepada pasien *hepatic encephalopathy* karena belum ada penelitian mengenai dosis LOLA untuk fibrosis. LOLA memiliki aktifitas antioksidan sehingga mampu menghambat perkembangan ROS dan dapat menstabilisasi membran sel hepar. Berikut perhitungan dosis LOLA pada tikus :

- Dosis pada manusia : 3 gr tiga kali sehari maka 9 gr per hari.
- Dikonversi ke 200 gr tikus : $9 \text{ gr} \times 0,018 = 162 \text{ mg} / 200 \text{ gr BB tikus}$.
- Dosis per gr BB tikus :

$$= \frac{1 \text{ gr}}{200 \text{ gr BB tikus}} \times 162 \text{ mg}$$
$$= 0,81 \text{ mg/ grBB tikus.}$$

Menurut penelitian Poo *et al.*, (2006), dengan pemberian dosis 9 gr/hari selama dua minggu dapat meningkatkan mental status pasien dari nilai nol menjadi enam dibandingkan kelompok plasebo. Pemberian dosis tersebut juga menurunkan kadar ammonia dari nilai 120,4 menjadi 96,9 dibandingkan kelompok plasebo pada pemberian minggu kedua.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas atau independent variabel dalam penelitian ini adalah CCl₄, Jamu Kombinasi *Curcuma xanthorrhiza* dan *Nigella sativa*, silimarin dan LOLA.

Variabel tergantung atau dependent variabel dalam penelitian ini adalah kadar Bilirubin dan Albumin pada serum tikus.

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah jenis tikus putih jantan strain wistar, dosis CCl₄, kandang tikus, makanan, dan minuman tikus.

Tabel 4.3 Manfaat dan Keterbatasan Variabel tergantung (Woreta & Alqahtani, 2014)

No	Parameter	Spesimen	Manfaat	Keterbatasan
1.	Kadar bilirubin total	Serum	<ul style="list-style-type: none"> • Marka hepatobilier dan fungsi hati • Spesifik jika terjadi cedera hati sehingga kadarnya meningkat pada sirkulasi 	Kurang sensitif karena kadarnya hanya meningkat jika kapasitas ekskretori hati telah hilang sebesar 50%
2.	Kadar albumin	Serum	<ul style="list-style-type: none"> • Digunakan untuk mengukur fungsi hati dalam menyintesis protein • Penurunan kadar albumin terjadi akibat peningkatan volume distribusi atau penurunan sintesis hepatic, ataupun keduanya 	Hipoalbuminemia juga dapat disebabkan akibat peningkatan jumlah albumin yang lepas dari ginjal (sindrom nefrotik), kulit (luka bakar), maupun usus (akibat gastroenteropati)

4.4 Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan adalah :

1. Fibrosis hati merupakan pembentukan jaringan parut pada cedera hati kronik yang dihasilkan dari perubahan kompleks matriks ekstraseluler, populasi sel dan sitokin pada hati.
2. CCl₄ merupakan hepatotoksin yang digunakan untuk menginduksi kerusakan hati akut maupun kronik dan menyebabkan nekrosis hepatoseluler.
3. Hewan coba pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar berusia 6-8 minggu dengan berat badan antara 150-200 gram, karena hewan coba ini dapat menyimulasikan kondisi fibrosis hati setelah dilakukan induksi CCl₄.

4. Kombinasi temulawak (*Curcuma xanthorriza*) dan jintan hitam (*Nigella sativa*) yang digunakan dalam penelitian ini merupakan jamu yang diproduksi oleh CV Royal Medica Makasar.
5. Silimarin dan LOLA merupakan obat pembanding anti-fibrosis yang digunakan dalam penelitian ini.
6. Bilirubin merupakan pigmen kuning yang berasal dari perombakan heme dari hemoglobin dalam proses pemecahan eritrosit oleh sel retikuloendotel. Bilirubin total merupakan total jumlah bilirubin direk dan indirek. Bilirubin direk merupakan bilirubin terkonjugasi yang larut dalam air. Bilirubin indirek adalah bilirubin yang tidak terkonjugasi yang tidak larut air dan berikatan dengan albumin untuk dapat masuk dalam hepar. Kadar bilirubin terkonjugasi (hepatobilirubin) dan bilirubin total serum diukur dengan menggunakan metode diazo kolorimetrik. Bilirubin indirect (tidak terkonjugasi) diukur dengan menghitung selisih dari bilirubin total dengan bilirubin direct (terkonjugasi).
7. Albumin merupakan protein yang disintesis paling banyak di hati dengan konsentrasi tertinggi pada plasma dan berperan untuk membawa berbagai substansi dalam sirkulasi. Kadar albumin serum diukur menggunakan metode kolorimetrik.

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Preparasi Jamu Kombinasi *Curcuma xanthorriza* dan *Nigella sativa*, silimarin dan LOLA

Jamu Kombinasi *Curcuma xanthorriza* dan *Nigella sativa* diformulasikan oleh CV Royal Medica Makasar. Secara singkat, temulawak diekstraksi menggunakan metode maserasi, sedangkan jintan hitam diekstraksi menggunakan metode soxhletasi dengan pelarut air, kemudian ekstrak dikeringbekukan (*freeze-dried*). Silimarin dan LOLA dibeli dari Sigma. Dosis yang digunakan adalah sebagai berikut : Kombinasi *Curcuma xanthorriza* dan *Nigella sativa* 0,315 mg/kgBB/hari; silimarin 37,8 mg/kgBB/hari dan LOLA 810 mg/kgBB/hari. Silimarin dilarutkan dalam 0,5 % CMC sedangkan LOLA dan Jamu dilarutkan dalam aquades.

4.5.2 Uji Fitokimia Kualitatif

4.5.2.1 Pemeriksaan Alkaloid

Jamu dilarutkan dengan 6 mL HCl 2 N. Larutan yang didapat kemudian dibagi ke dalam 4 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan dengan HCl 2N yang berfungsi sebagai blanko. Tabung kedua ditambahkan pereaksi Dragendoff sebanyak 3 tetes, tabung ketiga ditambahkan pereaksi Mayer sebanyak 3 tetes, dan tabung keempat ditambahkan pereaksi Wagner sebanyak 3 tetes. Terbentuknya endapan jingga pada tabung kedua dan endapan putih hingga kekuningan pada tabung ketiga, serta adanya endapan coklat pada tabung keempat menunjukkan adanya alkaloid (Dewi dkk., 2013).

4.5.2.2 Pemeriksaan Triterpenoid

Jamu dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform, lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya, campuran ini ditetesi dengan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung tersebut. Bila terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut, menunjukkan adanya triterpenoid (Dewi dkk., 2013).

4.5.2.3 Pemeriksaan Saponin

Jamu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL air panas, dinginkan dan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Terbentuk buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Buih tidak hilang dengan adanya penambahan HCl 2N (Dewi dkk., 2013).

4.5.2.4 Pemeriksaan Flavonoid

Pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan cara mengambil larutan uji sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan dengan beberapa tetes HCl pekat dan beberapa butir serbuk Mg. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna orange sampai merah (Sitorus, 2010).

4.5.2.5 Pemeriksaan Tanin dan Polifenol

Jamu sebanyak 1 mL direaksikan dengan larutan besi (III) klorida 10%. Jika terjadi warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa polifenol dan tannin (Dewi dkk., 2013).

4.5.2.6 Pemeriksaan Minyak Atsiri

Skринing fitokimia minyak atsiri dilakukan dengan cara, larutan uji diambil beberapa tetes ditambah satu tetes pereaksi sudan III. Warna merah menandakan adanya kandungan minyak atsiri (Stahl, 1985).

4.5.3 Perlakuan pada Hewan Coba

1. Hewan percobaan tikus jantan sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebanyak 30 ekor dibagi menjadi 5 kelompok menggunakan metode RAK dengan jumlah 6 ekor untuk masing-masing kelompok.
2. Tikus ditempatkan dalam kandang terpisah (setiap kandang berisi satu ekor tikus).
3. Tikus diaklimatisasi selama 10 hari di dalam laboratorium dengan tujuan agar tikus dapat beradaptasi dalam kondisi percobaan.
4. Selama masa aklimatisasi, tikus sudah dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok Kelompok Normal (Tanpa Induksi CCl₄), Kelompok Induksi CCl₄, Kelompok Sllimarin, Kelompok LOLA, dan Kelompok Jamu Kombinasi *Curcuma xanthorriza* dan *Nigella sativa*. Selama masa aklimatisasi, tikus diberi pakan sebanyak 30 gram/hari dan diberi minuman secara *ad libitum*. Sekam diganti setiap 2 hari sekali.
5. Induksi CCl₄ dilakukan secara bersamaan selama 8 minggu.
6. Tikus ditimbang berat badannya setiap satu minggu sekali untuk mengetahui perubahan berat badan tikus.

7. Makanan tikus ditimbang setiap hari untuk mengetahui banyaknya pakan yang dikonsumsi tikus (asupan makanan tikus).
8. Pada akhir penelitian, semua tikus di-eutanasia menggunakan gas CO₂, dan dilakukan pengambilan spesimen darah.

4.5.4 Induksi Fibrosis Hati dengan CCl₄ dan Pemberian Terapi

Dosis CCl₄ dilarutkan dalam minyak zaitun dengan perbandingan 2:5 (40% CCl₄ dalam minyak zaitun), kemudian diinjeksikan pada tikus secara intraperitoneal (i.p) setiap 2 kali seminggu selama 8 minggu. Terapi diberikan secara per oral (p.o) setiap hari selama 4 minggu mulai dari minggu ke-5 hingga 8 (Shaker *et al.*, 2011).

4.5.5 Pembedahan Hewan Coba

Pembedahan tikus dilakukan setelah 8 minggu perlakuan. Setelah pemberian terapi terakhir, tikus dipindahkan ke dalam kandang metabolik untuk pengambilan urin selama 24 jam, terhitung dari waktu pemberian dosis terakhir (Khan *et al.*, 2009). Kemudian tikus dieutanasia menggunakan gas CO₂ dengan cara memasukkan tikus dalam wadah tertutup yang berisi gas CO₂. Setelah tikus tidak sadar, tikus difiksasi dengan jarum di atas papan, kemudian dilakukan pembedahan berdasarkan protokol dalam prosedur tetap pembedahan hewan coba di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya.

- 1) Tikus diposisikan pada papan bedah dengan menggunakan pin.
- 2) Tubuh tikus dipastikan terfiksasi dengan baik pada papan sehingga memudahkan tahap pembedahan.

- 3) Pembedahan dimulai dari bagian perut dengan menggunakan gunting bengkok, sedangkan pengambilan dan pemisahan organ dilakukan menggunakan gunting lurus.
- 4) Insisi dilakukan pada daerah perut sampai diafragma dan dilakukan pembukaan dinding abdomen dan thorax untuk pengambilan darah pada jantung, organ jantung, hati dan ginjal.
 - Spesimen darah diambil dengan spuit 5 ml melalui jantung dan di simpan dalam tabung vakum tutup merah (*vacutainer non additive*). Sampel darah disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan (serum) diambil dan disimpan pada suhu -80°C (Shaker *et al.*, 2011).

Penanganan hewan coba setelah penelitian mengikuti prosedur yang ada di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya. Tubuh tikus yang tersisa setelah pembedahan dibersihkan dan dilakukan aseptik dengan alkohol 70%, kemudian dimasukkan ke dalam lubang pembuangan hewan coba untuk selanjutnya akan diuraikan oleh bakteri pada tempat pembuangan tersebut. Alat-alat yang telah digunakan kemudian dicuci dengan sabun, dikeringkan dan disterilkan dengan autoklaf.

4.5.6 Pengukuran Variabel Tergantung

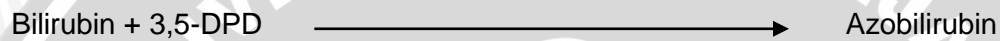
4.5.6.1 Pengukuran Bilirubin Direct

Sampel : Serum darah.

Metode :

- **Prinsip Reaksi**

Pengukuran bilirubin direct menggunakan metode diazo. Bilirubin terkonjugasi dan bilirubin direct bereaksi secara langsung dengan penambahan garam 3,5-Diklorofenil diazonium pada buffer asam dengan membentuk azobilirubin yang berwarna merah.



Intensitas warna merah dari azobilirubin secara langsung sebanding dengan kadar bilirubin direct (terkonjugasi) dan dapat ditentukan kadarnya secara fotometrik (Malloy *et al.*, 1937).

- **Alat dan bahan**

- **Reagen :**

- **R1** : Asam fosforik 85 mmol/L ; HEDTA 4,0 mmol/L ; NaCl 50 mmol/L ; detergen pH 1,9
- **R2** : 3,5-Diklorofenil diazonium 1,5 mmol/L pH 1,3

*R1 pada posisi B dan R2 pada posisi C

- **Aplikasi serum dengan mesin Cobas c 501/502**

Panjang gelombang (sub/main) = 800 / 546 nm

Pipetting reagen dan sampel	Volume	Pelarut NaCl
R1	120 μ l	-
R2	24 μ l	-
Sampel	6,7 μ l	-

- Perhitungan kadar

Perhitungan kadar menggunakan faktor konversi sebagai berikut :

Faktor konversi	$\mu\text{mol/L} \times 0,0585 = \text{mg/dL}$
	$\text{mg/dL} \times 10 = \text{mg/L}$
	$\text{Mg/dL} \times 17,1 = \mu\text{mol/L}$

4.5.6.2 Pengukuran Bilirubin Total

Sampel : Serum darah

Metode :

- Prinsip Reaksi

Pengukuran bilirubin total menggunakan metode diazo kolorimetrik. Bilirubin total akan bereaksi dengan 3,5-Diklorofenil Diazonium pada buffer asam yang kuat dengan membentuk warna merah.

suasana asam

Bilirubin + 3,5-DPD \longrightarrow Azobilirubin

Intensitas warna merah pada azobilirubin sebanding dengan kadar bilirubin total dan dapat ditentukan kadarnya secara fotometrik (Wahlefeld *et al.*, 1972).

- Alat dan Bahan

- Reagen

- R1 : Fosfat 25 mmol/L ; detergen ; stabiliser pH 1,0

- R2 : Garam 3,5-Diklorofenil Diazonium $\geq 1,35$ mmol/L

*R1 pada posisi B dan R2 pada posisi C

- **Aplikasi serum dengan menggunakan mesin Cobas c501/502**

Panjang gelombang (sub/main) = 600 / 546 nm

Pipetting reagen dan sampel	Volume	Pelarut NaCl
R1	120 μ l	-
R2	24 μ l	-
Sampel	2 μ l	-

• **Perhitungan kadar**

Faktor konversi	$\mu\text{mol/L} \times 0,0585 = \text{mg/dL}$ $\text{mg/dL} \times 10 = \text{mg/L}$ $\text{Mg/dL} \times 17,1 = \mu\text{mol/L}$
-----------------	--

4.5.6.3 Pengukuran Billirubin Indirect

Metode :

Pengukuran serum bilirubin indirect (tidak terkonjugasi) dengan menggunakan selisih dari bilirubin total dan bilirubin indirect. Rumus yang digunakan adalah sebagai berikut :

$$\text{Bilirubin indirect} = \text{Bilirubin total} - \text{Bilirubin direct}$$

4.5.6.4 Pengukuran Albumin

Sampel : Serum darah

Metode :

- **Prinsip reaksi**

Pengukuran albumin dengan menggunakan metode assay kolorimetrik. Pada pH 4,1, albumin secara kationik dapat berikatan dengan bromkesol hijau (BCG), ion anionik, untuk membentuk senyawa kompleks berwarna biru-hijau.

pH = 4,1

Albumin + BCG



Kompleks

Albumin-BCG

Intensitas warna biru-hijau sebanding dengan konsentrasi albumin pada sampel dan akan ditentukan kadarnya secara fotometrik (Dumas *et al.*, 1971).

- **Alat dan bahan**

- **Reagen**

- **R1** : Buffer Sitrat 95 mmol/L pH=4,1 ; pengawet
- **R2** : Buffer Sitrat 95 mmol/L pH=4,1 ; Bromkesol hijau 0,66 mmol/L ; pengawet

*R1 pada posisi B dan R2 pada posisi C

- **Aplikasi serum dengan menggunakan mesin Cobas c501/502**

Panjang gelombang (sub/main) = 505 / 570 nm

Pipetting reagen dan sampel	Volume	Pelarut H ₂ O
R1	120 µl	-
R2	20 µl	30 µl
Sampel	2 µl	-

- Perhitungan kadar

Faktor konversi	$g/L \times 15,2 = \mu mol/L$ $\mu mol/L \times 0,0658 = g/L$ $g/L \times 0,1 = g/dL$
-----------------	---

4.6 Kadar Normal Bilirubin Total dan Albumin Tikus

Tabel 4.4 Kadar normal Bilirubin Total dan Albumin Tikus Wistar Jantan berumur 8-16 minggu (Mary *et al.*, 2008).



Table 5: Serum Chemistry Data: Rats 8-16 Weeks Old - Males

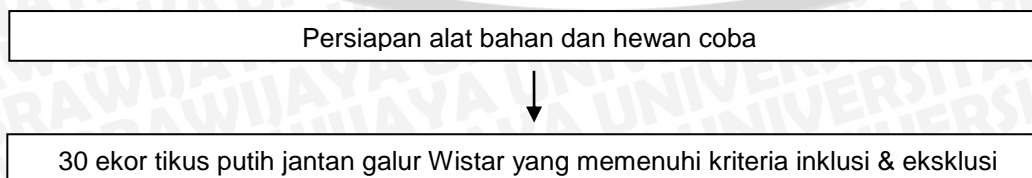
TEST	UNIT	N	MEAN	S.D.	RANGE
Phosphorus	mg/dL	164	8.04	1.22	5.58-10.41
Calcium	mg/dL	165	10.4	0.5	9.5-11.5
Total Protein	g/dL	164	6	0.5	5.2-7.1
Triglycerides	mg/dL	163	44	21	20-114
Cholesterol	mg/dL	165	58	13	37-85
Glucose	mg/dL	165	123	38	70-208
Creatinine	mg/dL	163	0.3	0.1	0.2-0.5
Indirect Bilirubin	mg/dL	139	0.06	0.03	0.01-0.12
Direct Bilirubin	mg/dL	109	0.04	0.01	0.03-0.05
Total Bilirubin	mg/dL	165	0.09	0.03	0.05-0.15
Alkaline Phosphatase	U/L	163	113	44	62-230
Aspartate Aminotransferase	U/L	164	105	20	74-143
Alanine Aminotransferase	U/L	164	28	7	18-45
Creatine Kinase	U/L	45	658	343	162-1184
Albumin	g/dL	164	4	0.4	3.4-4.8
Globulin	g/dL	144	2	0.2	1.5-2.5
A/G Ratio	ratio	144	1.99	0.29	1.58-2.67
Urea	mg/dL	164	17.1	2.9	12.3-24.6
Sodium	mmol/L	165	146	2	142-151
Potassium	mmol/L	165	4.48	0.44	3.82-5.55
Chloride	mmol/L	165	103	1	100-106

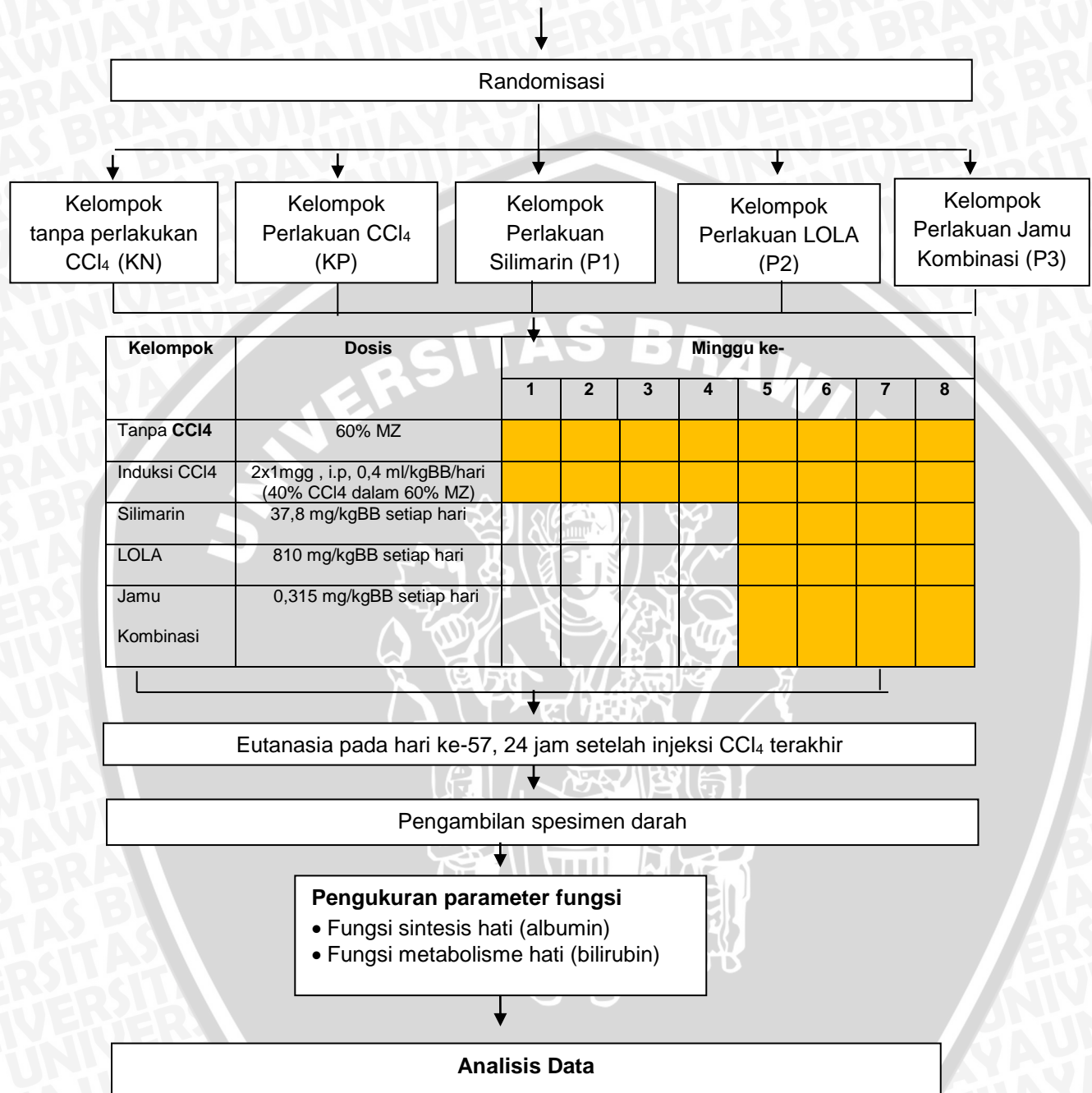
Menurut tabel di atas, kadar normal bilirubin total pada tikus umur 8-16 minggu adalah 0,05-0,15 mg/dl dengan rata-rata kadar normal sebesar 0,09 mg/dl. Kadar normal bilirubin direct pada tikus umur 8-16 minggu adalah 0,03-0,05 mg/dl dengan rata-rata kadar normal sebesar 0,04 mg/dl. Kadar normal bilirubin indirect pada tikus umur 8-16 minggu adalah 0,01-0,12 mg/dl dengan rata-rata kadar normal sebesar 0,06 mg/dl. Sedangkan kadar normal albumin pada tikus umur 8-16 minggu adalah 3,4-4,80 g/dl dengan rata-rata kadar normal sebesar 3,59 g/dl (Mary, *et al.*, 2008).

4.7 Analisis Data

Seluruh teknis pengolahan data hasil penelitian dianalisis secara komputerisasi dengan menggunakan software *Statistical Product and Service Solution*, IBM SPSS Statistics 20 dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Untuk mengetahui apakah terdapat keragaman antar perlakuan maka dilakukan uji hipotesis komparatif. Metode yang digunakan yaitu uji parametrik *One-way Analysis of Variance* (ANOVA) dengan alternatifnya yaitu uji non parametrik *Kruskal-Wallis*. Uji *One-way* ANOVA dan *Kruskal-Wallis* digunakan untuk menganalisis apakah terdapat perbedaan hasil yang bermakna antar masing-masing kelompok penelitian dengan melihat nilai p . Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna, maka dilakukan uji *Post-hoc* dengan *Tukey HSD* untuk data yang menggunakan uji *One-way* ANOVA dan uji *Mann-Whitney* untuk data yang menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Untuk mengetahui seberapa kuat hubungan antara 2 variabel, dilakukan uji kolerasi Pearson dengan alternatifnya adalah uji kolerasi Spearman jika syarat uji parametrik tidak terpenuhi. Dari uji kolerasi ini dapat diketahui besarnya perbedaan secara kualitatif kelompok yang berbeda secara bermakna, yang telah diketahui sebelumnya dari hasil uji *Post-hoc Mann-Whitney*. Interpretasi hasil uji kolerasi didasarkan pada nilai p , kekuatan kolerasi (r) dan arah kolerasi (Dahlan, 2011).

4.8 Alur Penelitian





Gambar 4.1 Alur Penelitian