

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni 2016 sampai Agustus 2016 yang bertempat di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Faal/Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus, botol minum tikus, penjepit (*block holder*), sonde lambung, *dysposable syringe* 1 mL, *refrigerator*, timbangan digital (Precissa 3000D), spektrofotometri (UV-260 Shimadzu), spektrofotometri (Biosystem type 15), gelas ukur, eppendorf, mikropipet, *yellow tipe*, tabung *venoject* merah, vortex, aluminium foil, alat sentrifuge, scalpel, gunting, pinset, sarung tangan, kertas saring, kain muslin, *ice box* dan pot organ.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1 ml CCl_4 , *olive oil* 1 ml, 20 μL serum darah dan 20 organ hepar tikus jantan (*Rattus norvegicus*) strain Wistar, kapulaga hijau (*Elettaria cardomomum*), reagen AT (*sulfanilic acid* 29 mmol/L, *hydrochloric acid* 0,2 mol/L dan *cetrimide*

50 mmol/L), reagen BT (*sodium nitrite* 11,6 mmol/L), reagen AD (*sulfanilic acid* 35 mmol/L dan *hydrochloric acid* 0,24 mol/L), reagen BD (*sodium nitrite* 3,5 mmol/L), aquades, kuvet, alkohol 70%, *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7, metanol 70%, larutan *Sodium Thiobarbituric Acid* (Na-Thio) 1%, *Tri Chloro Acetic* (TCA) 1%, dan HCl 1 N.

4.3 Tahapan Penelitian

Adapun tahapan penelitian sebagai berikut :

1. Rancangan Penelitian.
2. Pembuatan Ekstrak Kapulaga Hijau (*Elettaria cardomomum*).
3. Persiapan Hewan Model Hepatik Steatosis Hasil Induksi CCl₄.
4. Pemberian Terapi Ekstrak Kapulaga Hijau (*Elettaria cardomomum*).
5. Pengambilan Organ Hepar Tikus.
6. Pengambilan Serum Tikus.
7. Analisa Kadar Malondialdehid (MDA) Hepar.
8. Analisa Kadar Bilirubin Total.
9. Analisa Data.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan *post test design* (pengukuran kadar setelah perlakuan penelitian) dan rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu kelompok 1 (kontrol negatif yaitu tikus normal), kelompok 2 (kontrol positif yaitu tikus model hepatic

steatosis), kelompok 3, 4 dan 5 (tikus model hepatic steatosis diberikan terapi ekstrak kapulaga hijau).

Semua kelompok perlakuan diaklimatisasi selama seminggu. Pada kelompok 1, hewan coba tidak diberikan apapun, pada hari ke-9 setelah aklimatisasi dilakukan euthanasi dengan dislokasi leher dan dilakukan nekropsi. Pada kelompok 2, 3, 4 dan 5 diberikan induksi CCl₄ pada hari ke-8 dengan dosis 1,25 ml/kg BB secara *intrapertoneal* (IP) yang diberikan 1 kali selama percobaan. Pada kelompok 2 setelah induksi CCl₄ dilakukan euthanasi dengan dislokasi leher dan dilakukan nekropsi pada hari ke-9. Pada kelompok 3, 4 dan 5 setelah induksi CCl₄ diberikan terapi ekstrak kapulaga hijau dengan masing-masing dosis per kelompok adalah 200 mg/kg BB, 400 mg/kg BB dan 600 mg/kg BB selama 14 hari kemudian pada hari ke-23 dilakukan euthanasi dengan dislokasi leher dan dilakukan nekropsi.

Kelompok 1, 2, 3, 4 dan 5 sebelum dilakukan euthanasi, dilakukan pengambilan darah melalui *intracardial* kemudian ditampung di tabung *venoject* lalu dilakukan pemisahan bagian darah dibantu dengan alat sentrifuge, yang nantinya akan diambil untuk pengujian bilirubin total adalah serum darah. Setelah dilakukan pengambilan darah, tikus dieuthanasi dengan dislokasi leher dan dinekropsi, diambil organ hepar kemudian dimasukkan ke dalam *Phospat Buffer Saline* (PBS) yang digunakan untuk pengukuran kadar MDA.

Adapun variabel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

Variabel bebas : Dosis terapi ekstrak kapulaga hijau (*Elettaria cardomomum*) dan dosis induksi CCl_4 .

Variabel terikat : Kadar MDA (Malondialdehid) dan bilirubin total.

Variabel kontrol : Jenis kelamin, umur, berat badan, tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar, pakan, air minum dan kondisi pemeliharaan.

Sampel penelitian menggunakan tikus sebagai hewan percobaan. Tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesies *Rattus norvegicus* strain Wistar berjenis kelamin jantan dengan umur antara 10-12 minggu. Berat badan tikus diantara 130-180 gram. Sebelum perlakuan, hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan kondisi laboratorium. Estimasi besaran sampel yang digunakan dapat dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008) :

$$P (n - 1) \geq 15$$

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

P : Jumlah kelompok.

n : Jumlah ulangan.

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba. Tikus dikandangkan

dalam kandang dengan ukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm berbahan plastik dengan tutup dari rangka kawat serta lantai kandang yang mudah dibersihkan dan disanitasi. Tikus diberikan pakan komersial AD II dengan rata-rata konsumsi pakan tikus per hari adalah 5 g/100 g BB/hari. Pakan tikus dapat berbentuk pellet ataupun serbuk dan harus diberikan secara teratur serta diberikan minum secara *ad libitum* (Hamilton, 1998). Ditempatkan di lokasi yang bebas dari suara bising dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

4.4.2 Pembuatan Ekstrak Kapulaga Hijau (*Elettaria cardomomum*)

Pembuatan ekstrak kapulaga hijau (*Elettaria cardomomum*) dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol 70%. Menggunakan pelarut metanol diharapkan zat aktif flavonoid berupa *1,8-cineol oil*, *α-terpineol* dan *protocatechualdehyde* yang terkandung dalam kapulaga hijau (*Elettaria cardomomum*) dapat larut ke dalam ekstrak. Proses pembuatan ekstrak metanol kapulaga hijau (*Elettaria cardomomum*) dapat dilakukan dengan 2 langkah kerja seperti dilakukan dalam penelitian Chacko *et al.* (2012) dan Bhatti *et al.* (2010). Cara pembuatan ekstrak kapulaga hijau dapat dilihat di lampiran 5.

Berikut ini adalah proses pembuatan ekstrak kapulaga hijau (*Elettaria cardomomum*) :

1. Proses Ekstraksi

Buah kapulaga hijau (*Elettaria cardomomum*) yang sudah kering dilakukan penyortiran dan dibersihkan dari material debu serta kotoran yang masih melekat. Kapulaga hijau (*Elettaria cardomomum*) yang sudah bersih dan kering dihaluskan dengan menggunakan blender, kemudian ditimbang dengan timbangan analitik sebanyak 450 gram. Kapulaga hijau (*Elleteria cardomomum*) yang sudah menjadi bubuk sebanyak 450 gram tersebut dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer ukuran 1 liter. Kemudian direndam dengan metanol 70% sampai volume 1000 ml pada suhu ruang (23-25°C) dan dikocok selama 3 hari menggunakan alat pengocok digital dengan kecepatan 50 rpm. Setelah 3 hari, larutan tersebut difiltrasi menggunakan kain muslin dan kertas saring. Prosedur penyaringan dilakukan dua kali berturut-turut.

2. Proses Evaporasi

Lapisan atas campuran metanol 70% yang merupakan zat aktif tersebut diambil kemudian dimasukkan ke dalam labu evaporasi pada evaporator. *Water bath* diisi dengan air sampai penuh dan semua rangkaian alat dipasang termasuk *rotary evaporator* dengan tekanan -760 mmHg, pemanas *water bath* (diatur sampai 90°C) dan disambungkan dengan aliran listrik. Larutan metanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu dan ditunggu sampai aliran metanol berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ sampai 2 jam), kemudian

hasil ekstraksi dimasukkan dalam botol dan disimpan pada *refrigerator* (4°C).

4.4.3 Persiapan Hewan Model Hepatik Steatosis

Hewan model hepatic steatosis yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*). Hewan model diadaptasikan dalam kandang kelompok selama tujuh hari sebelum perlakuan (Panjaitan, dkk, 2007). Tikus yang digunakan adalah jenis tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan dengan berat 130-180 gram dan berumur 10 minggu. Tikus (*Rattus norvegicus*) yang dibuat hepatic steatosis dapat dilakukan dengan cara diinduksi menggunakan CCl₄ dengan dosis 1,25 ml/kgBB ditambahkan pelarut *olive oil* (rasio perbandingan antara zat pelarut dengan zat terlarut adalah 1:1 (Saba *et al.*, 2010)) secara *intraperitoneal* (IP) yang dilakukan sekali pemberian. CCl₄ dimetabolisme di hepar kemudian teraktivasi menjadi *trichloromethyl* yang bersifat reaktif yang menginisiasi terjadinya lipid peroksidasi, dengan adanya lipid peroksidasi yang terakumulasi di hepar menyebabkan kerusakan retikulum endoplasma sehingga sekresi apoprotein menjadi menurun menimbulkan penumpukan trigliserida di hepatosit. Selain itu, lipid peroksidasi dan toksikasi asam lemak dapat menyebabkan disfungsi mitokondria yang mana dapat mengakibatkan gangguan metabolisme dari β -oksidasi. Adanya gangguan β -oksidasi ini menyebabkan bertambahnya akumulasi trigliserida di hepatosit (hepatik steatosis). Pemeriksaan kondisi hepatic steatosis dapat menggunakan uji kimia darah menggunakan ALT, AST, TG (trigliserida) dan TC (total

cholesterol). Induksi CCl_4 dapat menghambat sekresi trigliserida hepatic dan kolesterol (Chang *et al.*, 2013). Hepatic steatosis ditandai dengan kenaikan serum ALT dan AST sekitar 3-4 kali normal (Thapa and Walia 2007).

4.4.4 Perlakuan Terapi Ekstrak Kapulaga Hijau (*Elettaria cardomomum*)

Penentuan dosis ekstrak kapulaga hijau (*Elettaria cardomomum*) berdasarkan modifikasi penelitian Chacko *et al.* (2012) yaitu dosis sebanyak 200 mg/kg BB, 400 mg/kg BB dan 600 mg/kg BB. Perhitungan dosis dan data kebutuhan dosis ekstrak kapulaga hijau (*Elettaria cardomomum*) dapat dilihat di lampiran 5.

4.4.5 Pengambilan Organ Hepar Tikus

Pengambilan organ hepar hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) model hepatic steatosis pada kelompok 1 dan 2 dilakukan pada hari ke-9; kelompok 3, 4, 5 dilakukan pada hari ke-23. Sebelum dilakukan pengambilan organ hepar, langkah awal yang dilakukan yaitu mendislokasi hewan coba tikus pada bagian leher kemudian dilakukan nekropsi. Nekropsi dilakukan pada rongga abdomen, dimana tikus diletakkan dengan posisi rebah dorsal di atas papan pembedahan. Organ hepar diambil kemudian dimasukkan ke dalam *Phospat Buffer Saline* (PBS) untuk pengukuran kadar MDA (Hashemi, 2014).

4.4.6 Pengambilan Serum Tikus

Pengambilan sampel darah tikus dilakukan sebelum proses euthanasi. Pada kelompok 1 dan 2 dilakukan pengambilan sampel darah *intracardial* pada hari ke-9, sedangkan pada kelompok 3, 4, dan 5 dilakukan pada hari ke-23.

Sampel darah yang sudah terkoleksi dimasukkan kedalam tabung *venoject* yang tidak mengandung EDTA. Untuk mendapatkan serum darah, sampel darah yang diperoleh kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10-15 menit, selanjutnya serum dipisahkan ke dalam tabung *ependorf*. Serum yang sudah terkoleksi digunakan untuk uji kadar bilirubin total (Adewale *et al.*, 2014). Bilirubin serum stabil selama 2 hari pada suhu 2-8°C jika dihindarkan dari cahaya (Biosystems, 2014).

4.4.7 Pengukuran Parameter

4.4.7.1 Pengukuran Kadar Malondialdehid (MDA) Organ Hepar

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan standar MDA 4 ppm 100 μ L, kemudian ditambahkan aquades 550 μ L, 100 μ L TCA 10%, 25 μ L HCl 1 N, 100 μ L Na-Thio 1% dan dihomogenkan. Setelah itu, direndam dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 30 menit, lalu didiamkan pada suhu ruang (26-27°C) dan selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada λ 500-600 nm (Aulanni'am dkk., 2011). Adapun penentuan panjang gelombang maksimum dijelaskan pada lampiran 6.

b. Pembuatan Kurva Standar

Standar MDA dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 $\mu\text{g/mL}$ diambil masing-masing 100 μL , dimasukkan ke dalam *microtube* yang berbeda, ditambahkan 550 μL aquades, 100 μL TCA 10%, 250 μL HCl 1 N dan 100 μL Na-Thio 1 %. Kemudian disentrifus 500 rpm selama 10 menit agar homogen. Supernatan diambil, dipanaskan dalam *water bath* suhu 100°C selama 30 menit. Kemudian didiamkan pada suhu ruang 26-27°C dan selanjutnya larutan standar diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum (532,8 nm). Hasil absorbansi kemudian dibuat kurva standar MDA dan dihasilkan persamaan linier (Aulanni'am dkk., 2011). Kurva standar MDA dihasilkan dari persamaan regresi antara absorbansi (y) dan konsentrasi MDA (x). Adapun pembuatan kurva standar dijelaskan pada lampiran 6.

c. Pengukuran Kadar MDA Organ Hepar Metode TBA

Penentuan kadar MDA dilakukan dengan metode TBA. Organ hepar ditimbang 10 gram, kemudian dimasukkan ke dalam mortar steril lalu digerus hingga halus, ditambahkan 1 mL aquades, homogenat dipindahkan ke *microtube* atau tabung *appendorf*. Supernatan ditambahkan 100 μL TCA 100%, 250 μL HCl 1 N dan 100 μL Na-Thio 1%. Setelah itu dihomogenkan menggunakan *vortex* dan diinkubasi pada suhu 100 °C selama 20 menit di dalam *waterbath*. Lalu, disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Supernatan

diambil kemudian ditambahkan aquades sebanyak 3500 μL . Setelah itu dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum 532,8 nm. Absorbansi yang diperoleh kemudian diplotkan pada persamaan linier sehingga diperoleh nilai kadar MDA (Lailatul dkk, 2015). Hasil yang didapatkan berupa kadar MDA dengan satuan ng/mL Adapun pengukuran kadar MDA organ hepar dijelaskan pada lampiran 7.

4.4.7.2 Pengukuran Kadar Bilirubin

a. Prinsip Metode

Bilirubin *direct* pada sampel direaksikan dengan *diazotized sulfanilic acid* sehingga akan membentuk kompleks warna yang dapat diukur menggunakan spektrofotometri. Bilirubin *direct* dan *indirect* bereaksi dengan diazo akan muncul adanya *cetrimide*. Istilah “*direct*” dan “*total*” mengacu pada karakteristik serum bilirubin dengan tidak adanya atau adanya pelarut reagen. “*Direct*” dan “*indirect*” bilirubin kurang lebih setara dengan fraksi terkonjugasi dan tak terkonjugasi (Biosystems, 2014).

b. Reagen Bilirubin

Terdapat reagen pelengkap (S) berupa reagen standar bilirubin (COD 11513), campurkan dengan 5 mL aquades lalu diberi konsentrasi terlabel. Nilai konsentrasi dapat diketahui melalui *Standart Material*

916a (National Institute of Standard and Technology, USA). Reagen pelengkap ini harus dihindarkan dari cahaya, dapat stabil selama 4 jam pada suhu 15-30°C atau selama 2 bulan pada suhu 18°C dalam *freezer* (Biosystems, 2014).

Reagen yang bekerja (*working reagent*) dalam mengukur bilirubin total yaitu dengan mencampurkan 1 vial reagen BT ke dalam 1 botol reagen AT, sedangkan untuk mengukur *direct* bilirubin perlu mencampurkan 1 vial reagen BD ke dalam 1 tabung reagen AD. Pada volume lainnya dapat disiapkan reagen dengan proporsi pencampuran 1 mL reagen BT + 4 mL reagen AT atau 1 mL reagen BD + 4 mL reagen AD. Campuran reagen ini stabil selama 20 hari pada suhu 2-8°C (Byosystems, 2014). Adapun komposisi reagen untuk mengukur kadar bilirubin total dan *direct* bilirubin dijelaskan pada lampiran 8.

c. Prosedur Pengukuran

- Bilirubin Total

Dilakukan pencampuran bahan ke dalam masing-masing tabung berlabel dimana masing-masing tabung berlabel tersebut berisi campuran aquades 100µL + 1 mL *working reagent* pada tabung berlabel Reagen Blank, sampel 100 µL + 1 mL Reagen AT pada tabung berlabel Sampel Blank, sampel 100 µL + 1 mL *working reagent* pada tabung berlabel Sampel dan 100 µL + 1 mL *working reagent* pada tabung berlabel Standar, kemudian dicampurkan dan dihomogenkan, didiamkan pada suhu ruang dalam posisi tegak. Baca absorbansi sampel

blank pada 540 nm dengan aquades, selanjutnya baca absorbansi pada sampel dan standar pada 540 nm dengan *reagen blank*. Hasil yang didapatkan berupa kadar dengan satuan mg/dL (Biosystems, 2014).

- *Direct Bilirubin*

Dilakukan pencampuran bahan ke dalam masing-masing tabung berlabel dimana masing-masing tabung berlabel tersebut berisi campuran aquades 100 μ L + 1 mL *working reagent* pada tabung berlabel Reagen Blank, sampel 100 μ L + 1 mL Reagen AD pada tabung berlabel Sampel Blank, sampel 100 μ L + 1 mL *working reagent* pada tabung berlabel Sampel, kemudian diacampurkan dan dihomogenkan, didiamkan pada suhu ruang tepat selama 5 menit. Baca absorbansi sampel blank pada 540 nm dengan aquades, selanjutnya baca absorbansi sampel pada 540 nm dengan reagen blank. Hasil yang didapatkan berupa kadar dengan satuan mg/dL (Biosystems, 2014).

Setelah prosedur pengukuran absorbansi, konsentrasi bilirubin pada sampel dikalkulasikan menggunakan rumus (Biosystems, 2014) :

$$\frac{A_{\text{Sampel}} - A_{\text{Sampel Blank}}}{A_{\text{Standar}}} \times C_{\text{Standar}} = C_{\text{Sampel}}$$

Pada perhitungan kadar bilirubin *direct*, gunakan absorbansi yang didapat dari standar pada prosedur perhitungan bilirubin total. Konsentrasi masa (mg/dL) x 17,1 = konsentrasi substansi (μ mol/L) (Biosystems, 2014).

4.5 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil pengukuran kadar bilirubin total dan kadar MDA hepar dianalisa dengan program *Statistical Product of Service Solution* (SPSS) 22.0 for windows 8. Adanya pengaruh ekstrak kapulaga hijau (*Elettaria cardomomum*) terhadap kadar MDA dan kadar bilirubin total dapat diketahui dengan dilakukan analisis uji sidik ragam *one way ANOVA* (*analysis of variance*). Apabila terdapat perbedaan yang nyata dilakukan analisis lebih lanjut menggunakan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau Tukey ($\alpha = 5\%$).

