

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak daun jambu mete dilakukan di Laboratorium UPT Materia Medika, Kota Batu. Pemeliharaan hewan coba, induksi CCl₄ dan perlakuan pada hewan percobaan dilakukan di Laboratorium Fisiologi Hewan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Pengujian *serum glutamic pyruvic transaminase* (SGPT) dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian ini berlangsung selama dua bulan, dari bulan Maret hingga Mei 2016.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah hewan mencit (*Mus musculus*) jantan strain BALB/c umur delapan sampai sembilan minggu dengan berat badan antara 20–25 g, *Carbon tetrachlorida* (CCl₄), daun jambu mete (*Anacardium occidentale*), etanol 70 %, alkohol 70%, akuades, paraffin, PBS, NaCl 0,9%.

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain sonde, spuit 1 ml, *needle* 30 G, kandang mencit berupa bak plastik dengan tutup kandang dari kawat, seperangkat alat bedah berupa *scaple* dan *blade*, gunting, pinset, *glove*, masker, pot organ, dan spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer* UV-1601.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah mencit sebagai hewan percobaan. Mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesies *Mus musculus* jantan *strain* BALB/c umur delapan sampai sembilan minggu dengan berat badan antara 20–25 g. Mencit diadaptasi untuk menyesuaikan kondisi laboratorium selama tujuh hari (Lamanepa, 2005). Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Montgomery and Kowalsky, 2011) :

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

P = jumlah kelompok (terdiri dari lima macam perlakuan)

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk lima kelompok diperlukan jumlah ulangan paling sedikit empat kali dalam setiap kelompok, sehingga diperlukan 20 ekor hewan coba. Mencit dikandangkan dalam kandang dari bak plastik yang dilengkapi penutup kawat, dengan ukuran kandang 17,5 x 23,75 x 17,5 cm, berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan dan sanitasi. Ukuran kandang tersebut merupakan ukuran standar yang digunakan dalam pemeliharaan hewan laboratorium dengan jumlah maksimal mencit dalam satu kandang adalah lima ekor (Lamanepa, 2005).

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dan *post-test control design only*. Rancangan penelitian ditunjukkan **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok	Keterangan
Kontrol negatif (A)	Mencit tidak diberikan ekstrak etanol daun jambu mete dan induksi CCl ₄
Kontrol positif (B)	Mencit yang diinduksi CCl ₄ 2ml/kgBB selama 12 hari dimulai dari hari ke-22 sampai hari ke-33
Perlakuan 1 (C)	Mencit diberi ekstrak etanol daun jambu mete dosis 500 mg/kgBB dimulai hari ke-8 sampai hari ke-21, kemudian diinduksi CCl ₄ 2ml/kgBB pada hari ke-22 sampai hari ke-33
Perlakuan 2 (D)	Mencit diberi ekstrak etanol daun jambu mete dosis 1000 mg/kgBB dimulai hari ke-8 sampai hari ke-21, kemudian diinduksi CCl ₄ 2ml/kgBB pada hari ke-22 sampai hari ke-33
Perlakuan 3 (E)	Mencit diberi ekstrak etanol daun jambu mete dosis 1500 mg/kgBB dimulai hari ke-8 sampai hari ke-21, kemudian diinduksi CCl ₄ 2ml/kgBB pada hari ke-22 sampai hari ke-33

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dari penelitian ini yaitu:

Variabel bebas : Ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) dan Karbon tetraklorida

Variabel tergantung : Kadar SGPT dan Bilirubin.

Variabel terkontrol : Homogenitas mencit: galur, jenis kelamin, berat badan, umur dan pakan.

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba Mencit

Pada persiapan hewan coba, mencit yang digunakan untuk penelitian diadaptasi terhadap lingkungan laboratorium selama tujuh hari. Mencit dibagi dalam lima kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari empat ekor mencit (Lampiran 1). Mencit dikandangkan dalam kandang dari bak plastik yang dilengkapi dengan penutup bak yang terbuat dari kawat, dengan jumlah mencit empat ekor tiap kandang disesuaikan dengan jumlah pengulangan setiap perlakuan. Kandang mencit berlokasi pada tempat yang bebas polutan. Mencit dipelihara dalam Laboratorium Klinik Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya Malang.

4.6.2 Prosedur Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale*)

Pembuatan ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L) menggunakan metode maserasi. Proses ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut etanol 70%. Pelarut etanol dipilih karena tidak menyebabkan pembengkakan sel dan memperbaiki stabilitas bahan obat terlarut. Etanol (70%) sangat efektif dalam menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal (Voight, 1994). Daun jambu mete dikeringkan kemudian diblender hingga halus, ditimbang sebanyak 500 gram, kemudian dimasukkan ke dalam 2L etanol 70%. Campuran tersebut ditutup dan dikocok dengan shaker dalam ruangan yang gelap dan disimpan selama 2 x 24 jam. Setelah disimpan, suspensi tersebut disaring menggunakan kertas saring. Setelah semua filtrat hasil maserasi terkumpul, filtrat tersebut dipekatkan

menggunakan evaporator pada suhu 40°C. Selanjutnya dilakukan penimbangan ekstrak pekat agar didapatkan nilai rendemnya (Hardiyanti, 2011).

4.6.3 Induksi Terapi Ekstrak Etanol Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale*)

Penelitian yang dilakukan Vanderlinde *et al* (2009), menggunakan rentang dosis ekstrak daun jambu mete 100 mg/kgBB hingga 1000 mg/kgBB. Dengan dasar ini maka dosis yang akan digunakan yaitu masing-masing 500 mg/kgBB digunakan untuk kelompok C, dosis 1000 mg/kgBB untuk mencit kelompok D, dan dosis 1500 mg/kgBB untuk mencit kelompok E. Masing-masing kelompok terdiri dari empat ekor mencit. Mencit diberi ekstrak etanol daun jambu mete pada hari ke-8 sampai hari ke-21 secara peroral (PO). Perhitungan dosis dapat dilihat pada Lampiran 4.

4.6.4 Pembuatan Hewan Model Fibrosis Hati

Metode pembuatan hewan model fibrosis hati menggunakan *carbon tetrachloride* (CCl₄) yang dilarutkan ke dalam minyak jagung dengan perbandingan 1:1 dengan artian 50% minyak jagung ditambah dengan 50% CCl₄ dan diinduksikan secara *intraperitoneal* (i.p). Induksi CCl₄ dilakukan pada hari ke-22 sampai hari ke-33 pada kelompok kontrol positif (B), kelompok preventif 1 (C), kelompok preventif 2 (D), dan kelompok preventif 3 (E). Dosis induksi CCl₄ sebanyak 2ml/kgBB, volume pemberian CCl₄ disesuaikan dengan perhitungan menurut dosis dan berat badan dari mencit. Induksi dilakukan sebanyak satu kali sehari selama 12 hari secara intraperitoneal (i.p) (Achmad, 2012).

4.6.5 Pengukuran Kadar SGPT

Sebelum pengambilan darah pada jantung mencit, dilakukan eutanasi dengan menggunakan metode dislokasi pada leher dan segera dilakukan pembedahan pada bagian abdomen dan thoraks mencit sampai terlihat organ jantung pada rongga thoraks. Mencit yang telah dibedah, kemudian diambil darahnya sebanyak 5 ml melalui jantung. Darah diletakkan ke dalam tabung *venoject* dan didiamkan kurang dari 30 menit, kemudian disentrifus untuk mendapatkan serum. Selanjutnya, serum yang terletak pada bagian atas dipisahkan dan diambil untuk dianalisis kadar SGPT. Menurut Deny (2013), pengukuran kadar SGPT dilakukan dengan metode spektrofotometrik dengan mencampurkan sampel serum dengan reagen. Reagen SGPT terdiri dari Reagen 1 dan Reagen 2. Serum darah dan reagen SGPT dicampur pada temperatur ruangan (15-30°C). Serum darah diambil sebanyak 100 µl dan diinkubasi pada suhu 37°C. Setelah 60 detik, absorbansi yang terukur di baca dan dicatat. Kemudian campuran tersebut di bawa kembali ke suhu ruangan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 detik. Absorbansi kemudian diukur pada menit ke 1, 2 dan ke 3. Absorbansi yang terukur kemudian dihitung dengan rumus untuk mendapatkan total kadar SGPT dalam darah, perhitungan kadar SGPT dengan menggunakan rumus: SGPT (U/L) = $\Delta \text{Abs} / \text{min} \times 1768$ (Kee, 2007).

4.6.6 Pengukuran Kadar Bilirubin

Mencit yang telah dibedah, kemudian diambil darahnya sebanyak 5 ml melalui jantung. Metode yang digunakan menggunakan metode Jendrasik- Grof. Prinsip kerja dari metode Jendrasik-Grof adalah bilirubin bereaksi dengan DSA

(diazotized sulphanilic acid) dan membentuk senyawa azo yang berwarna merah. Daya serap warna dari senyawa ini dapat langsung dilakukan terhadap sampel bilirubin pada panjang gelombang 546 nm. Bilirubin glukuronida yang larut dalam air dapat langsung bereaksi dengan DSA. Pada metode ini, serum atau plasma ditambahkan ke dalam larutan natrium asetat dan kafein-natrium benzoat. Natrium asetat berfungsi sebagai buffer pH pada reaksi diazo, sedangkan kafein-natrium benzoate berfungsi mempercepat kopling bilirubin dengan diazotized asam sulfanilic. Warna azobilirubin muncul dalam 10 menit (Riswanto, 2009).

4.7 Analisis Data

Data penelitian berupa pengukuran kadar SGPT dan Bilirubin secara kuantitatif menggunakan spektrofotometrik dan Jendrasik-Grof dengan uji sidik ragam *one way analysis of varians* (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji *Tukey* (Beda Nyata Jujur) dengan tingkat signifikansi $\alpha = 5\%$.