

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

A. ALAT DAN BAHAN

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut : sonde lambung, spuit (Terumo), pipet mikro (Propette), pipet pasteur, pipet eppendorf (Socorex), mikrotube, sentrifugator (Biofuge 13), spektrofotometer UV-Vis (Termo Spectronic), kuvet semimikro (Plastibrand), timbangan analitik (Mettler Toledo), timbangan hewan (Mettler Toledo), mikrohematokrit, alat-alat gelas.

2. Bahan

a. Simplisia Uji

Simplisia uji adalah herba kering akar kucing (*Acalypha indica* Linn.). Tanaman ini diperoleh di daerah Tanah Baru, Depok. Tanaman yang diambil memiliki tinggi antara 30 sampai 50 cm dan sudah berbunga pada bagian ketiak daunnya. Tanaman akar kucing yang digunakan dalam penelitian ini telah dideterminasi oleh pusat penelitian dan pengembangan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bogor.

Obat yang digunakan sebagai obat pembanding dalam uji khasiat asam urat adalah alopurinol. Alopurinol yang digunakan merupakan alopurinol murni dari PT. Kimia Farma yang telah diuji spesifikasinya.

b. Hewan Uji

1) Penentuan nilai LD₅₀

Hewan yang digunakan dalam uji toksisitas akut ini adalah mencit jantan galur DDY berumur 3 sampai 4 bulan dengan berat 20 g sampai 30 g.

2) Uji khasiat

Hewan yang digunakan dalam uji khasiat ini adalah tikus putih jantan galur *Sprague-Dawley* dengan berat tikus 200 g sampai 300 g, umur kurang lebih 3 bulan.

c. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Reagen Kit Asam Urat (Enzymatic Colorimetric Method, Randox), kalium oksonat (Sigma Aldrich Chemical), eter (Merck), heparin (Fahrenheit), CMC (Brataco Chemika), alkohol 70% (Nufarindo) dan aquadest (Bumi Indah).

B. CARA KERJA

1. Persiapan Simplisia Uji

Herba segar akar kucing dibersihkan dengan air yang mengalir dan dijemur hingga kering (35). Pengeringan dilakukan pada udara terbuka dan terlindung dari sinar matahari langsung. Apabila telah regas, herba dikeringkan dalam oven pada suhu 40°sampai 60°C selama 1 jam. Herba yang telah kering kemudian diserbukkan dengan menggunakan blender. Lalu serbuk diayak menggunakan ayakan 30 mesh. Kemudian hasil ayakan dibuat ekstrak.

2. Pembuatan Ekstrak

Serbuk simplisia ditimbang sejumlah 100 g dipanaskan dengan menggunakan air (1:10) dalam panci infusa selama 30 menit terhitung setelah mencapai suhu 90°C sambil sesekali diaduk (35). Kemudian disaring panas-panas menggunakan kain flanel dan sisanya dipanaskan kembali dengan cara yang sama dengan menggunakan perbandingan air yang sama sejumlah dua kali rebusan.

Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan diuapkan menggunakan penangas air dalam cawan penguap hingga diperoleh ekstrak kental.

3. Penetapan Parameter Nonspesifik Ekstrak

a. Rendeman

Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan dibandingkan bobotnya dengan serbuk simplisia awal yang digunakan. Perbandingan tersebut dinyatakan dalam % (persen).

b. Susut Pengerinan

Ekstrak ditimbang secara seksama sebanyak 1 gram sampai 2 gram dan dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal bertutup yang telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Ekstrak diratakan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol, hingga merupakan lapisan setebal lebih kurang 5 mm sampai 10 mm. Kemudian dimasukkan ke dalam oven, tutup dibuka dan dikeringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Sebelum setiap pengeringan, botol dibiarkan dalam keadaan tertutup mendingin dalam desikator hingga suhu kamar (36).

c. Kadar Abu

Lebih kurang 2 gram sampai 3 gram ekstrak dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, lalu diratakan. Kemudian dipijar perlahan-lahan hingga arang habis, didinginkan dan ditimbang. Jika arang tidak dapat dihilangkan, ditambah air panas, dan disaring dengan kertas

saring bebas abu. Sisa abu dan kertas saring dipijarkan dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus, diuapkan dan dipijarkan hingga bobot tetap dan ditimbang. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (36).

4. Penentuan Nilai LD₅₀

Mencit dibagi menjadi empat kelompok perlakuan yang masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor mencit putih (menurut metode Weil). Penentuan nilai LD₅₀ ini menggunakan empat macam dosis bahan uji (17) yang menunjukkan variasi jumlah kematian. Dosis dihitung berdasarkan uji pendahuluan. Pembagian kelompok dan dosis uji dapat dilihat pada tabel 2.

Sebelum percobaan, hewan diaklimatisasi selama dua minggu. Selama tahap ini, dilakukan pengamatan keadaan umum dan penimbangan berat badan. Hewan coba yang tampak sakit tidak diikutsertakan dalam penelitian. Tanda-tanda hewan coba yang sakit adalah aktivitas berkurang, lebih banyak diam, serta bulu-bulunya berdiri.

Ekstrak air herba akar kucing diberikan secara oral menggunakan sonde. Pengamatan dihitung setelah 24 jam pemberian dosis. Lalu pengamatan diulangi lagi setelah 48 jam untuk melihat efek yang tertunda.

5. Uji Khasiat

a. Persiapan Hewan Uji

Hewan yang digunakan dalam percobaan adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) galur *Sprague-dawley* jantan, bobot 200 g sampai 300 g dengan umur kurang lebih 3 bulan. Tikus diaklimatisasi selama dua minggu dalam kandang karantina laboratorium farmakologi FMIPA UI agar dapat beradaptasi di lingkungan baru. Pada tahap ini dilakukan pengamatan keadaan umum dan penimbangan berat badan seminggu dua kali. Tikus yang nampak sakit ditandai dengan aktivitasnya berkurang, lebih banyak diam, bulu-bulunya berdiri, dan mata tidak jernih tidak diikutsertakan dalam penelitian.

b. Penetapan Dosis

Dosis sediaan yang diberikan kepada hewan percobaan dihitung berdasarkan penggunaan empiris, yaitu 9 g sampai 15 g per hari. Dosis tersebut dikonversi ke dalam dosis untuk tikus dan dikalikan dengan faktor farmakokinetik. Pengujian khasiat herba akar kucing ini dilakukan dengan tiga variasi dosis sebagai berikut:

dosis I : 1,35 g/200 g bb,

dosis II : 2,7 g/200 g bb, dan

dosis III : 5,4 g/200 g bb.

c. Pembuatan Sediaan Alopurinol

Dosis sediaan alopurinol yang diberikan pada manusia adalah 200 mg per hari (29). Dosis untuk hewan uji dikalikan dengan faktor konversi (0,018) dan faktor farmakokinetik (10). Jadi, dosis untuk hewan uji adalah $200 \text{ mg} \times 0,018 \times 10 = 36 \text{ mg}/200 \text{ g}$ bb per hari. Sediaan dibuat suspensi dengan 0,5% CMC.

d. Pembuatan Sediaan Kalium Oksonat

Dosis kalium oksonat yang dapat membuat hiperurisemia hewan uji adalah 250 mg/kg bb (5, 12, 14). Maka didapatkan dosis untuk satu ekor tikus, yaitu 50 mg/200 g bb. Sebanyak 0,625 gram kalium oksonat ditimbang kemudian disuspensikan dengan larutan CMC 0,5% sampai volume 25,0 mL sehingga didapatkan konsentrasi kalium oksonat 25 mg/mL.

e. Pengujian Efek Menurunkan Kadar Asam Urat

1) Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL).

2) Perlakuan

Pada penelitian ini, hewan uji dipilih sebanyak 36 ekor secara acak untuk dibagi menjadi 6 kelompok. Masing-masing terdiri dari 6 ekor. Penentuan jumlah tikus pada setiap kelompok dihitung berdasarkan rumus

Federer : $(n-1)(t-1) \geq 15$, dimana n menunjukkan ulangan minimal dari tiap perlakuan dan t menunjukkan jumlah perlakuan (37). Kelompok I,II dan III adalah kelompok uji (kelompok yang diberikan sediaan uji pada masing-masing dosis yang telah ditentukan); kelompok IV adalah kelompok pembanding kelompok yang diberikan alopurinol); kelompok V adalah kelompok induksi; dan kelompok VI adalah kelompok normal.

Sediaan uji diberikan secara oral sekali sehari, setiap hari selama 8 hari pada kelompok uji, begitu juga dengan alopurinol dan kelompok pembanding. Kelompok induksi dan kelompok normal hanya diberi larutan CMC 0,5% secara oral setiap hari selama 8 hari (38). Pemberian makan dan minum pada semua tikus tetap dilakukan seperti biasa.

Di hari ke-8, kalium oksonat diberikan secara intraperitoneal pada lima kelompok (kecuali kelompok normal), satu jam sebelum pemberian bahan secara oral pada tikus. Dua jam setelah penginduksian kalium oksonat, darah tikus diambil. Kelompok perlakuan terhadap hewan uji dapat dilihat pada tabel 3.

3) Cara Pengambilan Plasma Darah

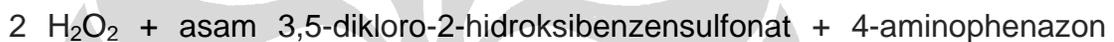
Pada hari ke-8 dilakukan pengambilan darah pada masing-masing kelompok tikus. Pengambilan darah dilakukan melalui sinus orbital tikus (39, 40). Tikus terlebih dahulu dianestesi secara inhalasi dengan menggunakan eter. Pada mata tikus, mikrohematokrit dimasukkan ke pangkal sudut bola mata sambil diputar halus ke arah belakang bola mata hingga darah mengalir melalui mikrohematokrit tersebut.

Darah ditampung secara hati-hati ke dalam mikrotube yang sebelumnya telah ditetesi heparin. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 5 menit. Plasma yang diperoleh dipisahkan dengan menggunakan pipet Pasteur. Lalu disimpan dalam lemari pendingin hingga dilakukan pengukuran kadar asam urat dalam darah .

4) Prosedur Pengukuran Kadar Asam Urat dalam Darah

Metode : Tes kolorimetri enzimatik (metode urikase-PAP)

Prinsip :



Prosedur :

Ke dalam kuvet dipindahkan

Bahan	Blanko	Sampel	Standar
Reagen	1000 μL	1000 μL	1000 μL
Plasma	-	20 μL	-
Standar asam urat	-	-	20 μL

Campuran sampel (plasma) dan reagen kit diinkubasi selama 15 menit pada suhu 20-25°C atau selama 5 menit pada suhu 37°C. Serapan sampel (A_{sampel}) dan serapan standar (A_{standar}) diukur terhadap blanko pada panjang

gelombang 520 nm dalam waktu 30 menit (34). Kadar asam urat dapat dihitung dengan rumus :

$$C_{\text{asam urat}} \text{ (mg/dl)} = \frac{(A_{\text{sampel}})}{(A_{\text{standar}})} \times C_{\text{standar}}$$

5) Analisis Data

Data yang diperoleh diolah dengan uji kenormalan dan uji kesamaan varian untuk mengetahui normalitas dan homogenitas data. Selanjutnya dilakukan analisis satu arah (*one way annova*) untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan. Bila terdapat perbedaan yang bermakna, maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) (41).