

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) terhadap kadar asam urat dalam urin dan gambaran histologi hepar pada mencit (*Mus musculus*) jantan merupakan penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dan lima ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah mencit kontrol negatif (K-) yaitu kelompok mencit normal, kelompok mencit kontrol positif (K+) yaitu mencit yang diinduksi *potassium oxonate* tanpa pemberian ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) dan mencit yang diinduksi *potassium oxonate* yang diberi ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) dengan 3 dosis yang berbeda (K1,K2,K3).

3.2 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini meliputi:

1. Variabel bebas: ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) dengan dosis yang berbeda (1,3 mg/ekor/hari; 2,6 mg/ekor/hari; 3,9 mg/ekor/hari).
2. Variabel terikat: kadar asam urat dalam urin dan gambaran histologi hepar mencit dengan parameter persentase kerusakan sel hepar.
3. Variabel kendali : mencit jantan galur *Swiss Albino Mice* umur 3-4 bulan dengan berat badan 20-30 gr.

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, pada bulan April sampai Juni 2010.

3.4 Subyek Penelitian

Subyek penelitian adalah mencit (*Mus musculus*) galur *Swiss Albino Mice* jenis kelamin jantan, umur 3-4 bulan dengan berat badan 20-30 gr sebanyak 25 ekor yang dibagi ke dalam lima kelompok sebagai berikut :

- K- : Mencit kontrol negatif (mencit normal), yaitu mencit yang tidak diinduksi *potassium oxonate* dan tanpa pemberian ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.)
- K+ : Mencit kontrol positif, yaitu mencit yang diinduksi *potassium oxonate* tanpa pemberian ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.)
- K1 : Mencit yang diinduksi *potassium oxonate* dan pemberian ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) dosis 1,3 mg/ekor/hari
- K2 : Mencit yang diinduksi *potassium oxonate* dan pemberian ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) dosis 2,6 mg/ekor/hari
- K3 : Mencit yang diinduksi *potassium oxonate* dan pemberian ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) dosis 3,9 mg/ekor/hari

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang hewan coba (bak plastik), sekam, kawat, tempat makan, tempat minum, erlenmeyer 50 ml, gelas ukur, gelas beker, kaca pengaduk, kertas saring, timbangan digital, ayakan tepung, corong Buchner, perangkat evaporator, UA test dan strip test, silet, alat pengekok oral (*gavage*), tabung ependorf, gelas objek, deck glass, mikrotom dan mikroskop.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.), mencit jantan galur *Swiss Albino Mice*, pakan mencit (pellet), serbuk kayu, *potassium oxonate*, air PAM, alkohol 70%, pelarut ether, akuades, CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*), etanol (50%, 70%, 75%, 80%, 90%, 96%), xylene, dan xilol.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Persiapan Hewan Coba

Sebelum penelitian dimulai, dipersiapkan tempat pemeliharaan hewan coba terlebih dahulu, yaitu kandang (bak plastik), sekam, tempat makan, tempat minum dan pakan mencit. Kemudian mencit diaklimasi di laboratorium selama 2 minggu.

3.6.2 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) dilakukan melalui tahapan sebagai berikut:

- a. Menyiapkan biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.)
- b. Melakukan penyortiran dengan mengambil biji yang terbaik
- c. Mencuci biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) yang telah disortir dengan air mengalir
- d. Mengeringkan biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) yang sudah dicuci dengan cara diangin-anginkan
- e. Menghaluskan biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) yang telah kering dengan blender
- f. Menimbang menggunakan timbangan analitik
- g. Menambahkan ethanol 96% sebagai pelarut dan dibiarkan selama satu malam (± 24 jam)
- h. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu 70°C (sesuai dengan titik didih ethanol) sampai diperoleh ekstrak kental

3.6.3 Perlakuan Pada Hewan Coba

Mencit yang sebelumnya diaklimasi di laboratorium selama 2 minggu, dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol mencit normal (tidak diinduksi *potassium oxonate*) dan kelompok mencit yang diinduksi *potassium oxonate* dengan dosis tunggal. Kadar asam urat tinggi (hiperurisemia) dibuat

dengan cara menginjeksikan secara intraperitoneal *potassium oxonate* 300 mg/kg BB atau 6 mg/20gr BB pada mencit (Ariyanti, 2007). Kemudian dilanjutkan dengan pemberian ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) dengan tiga dosis yang berbeda selama 30 hari dan selanjutnya dilakukan pengukuran kadar asam urat dalam urin dan pembedahan.

3.6.4 Penentuan Dosis

Biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Balai Materia Medica, Batu. Untuk mengetahui dosis biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) dengan cara mengkonversi dosis manusia ke mencit, pada penelitian Wahyudi (2002), menyatakan bahwa pengkonsumsian serbuk biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) oleh manusia setiap hari untuk pengobatan tradisional mulai dari 1/2 sendok teh per hari, sedangkan 1 sendok teh sebanding dengan 2 gram biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.).

Berdasarkan angka konversi tersebut diperoleh dosis biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) dalam bentuk serbuk dari manusia 70 kg ke mencit $20 \text{ g} = 0,0026$ (Kusumawati, 2004), maka dosis untuk mencit $20 \text{ g} = 0,0026 \times 1 \text{ g} = 2,6 \text{ mg/ekor/hari}$. Pada penelitian ini menggunakan 3 dosis uji dengan menurunkan dan menaikkan dari dosis optimal menurut deret hitung:

Dosis 1 (K1) = 1,3 mg/ekor/hari

Dosis 2 (K2) = 2,6 mg/ekor/hari

Dosis 3 (K3) = 3,9 mg/ekor/hari

Pemberian ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) untuk perlakuan, jumlah dosis yang diberikan dalam bentuk ekstrak ditambahkan dengan larutan pengemulsi Na-CMC 0,5% dengan langkah sebagai berikut:

1. Menimbang 500 mg Na-CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*)
2. Menaburkan pada 10 ml akuades panas
3. Mengaduk sampai Na-CMC mengembang
4. Menambahkan akuades sampai volumenya 100 ml
5. Mengaduk hingga homogen dalam labu ukur

Untuk sediaan kelompok kontrol positif hanya diberi suspensi Na-CMC 0,5% tanpa ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.). Ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) diberikan pada mencit perlakuan setiap hari sesuai dengan dosis selama 30 hari.

3.6.5 Pengukuran Kadar Asam Urat Dalam Urin

Pengukuran kadar asam urat dalam urin dilakukan dengan metode fotometrik menggunakan TBHBA (2,4,6-Tribromohidroxybenzoic acid) (Holzheim, 2008). Langkah-langkah yang dilakukan adalah seperti pada tabel 3.1:

Tabel 3.1 Pengukuran Kadar Asam Urat Dalam Urin

	Blanko	Sampel/standar
Sampel/standar	-	20 μ l
Aquades	20 μ l	-
Monoreagen	1000 μ l	1000 μ l

1. Dicampur dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 20-25 °C.
2. Dibaca absorbansinya terhadap reagen blanko.

3.6.6 Pembuatan Preparat Hepar

1. Tahap pertama adalah *coating*, dimulai dengan menandai gelas obyek yang akan digunakan dengan kikir kaca pada bagian tepi, lalu direndam dalam alkohol 70% minimal satu malam. Kemudian gelas obyek dikeringkan dengan tissue dan dilakukan perendaman dalam larutan gelatin 0,5% selama 30-40 detik per slide, lalu dikeringkan dengan posisi disandarkan hingga gelatin yang melapisi kaca dapat merata.
2. Tahap kedua, organ hepar yang telah disimpan dalam larutan formalin 10% dicuci dengan alkohol selama 2 jam dan dilanjutkan dengan pencucian secara bertingkat dengan alkohol yaitu dengan alkohol 90%, 95%, etanol absolut (3 kali), masing-masing selama 20 menit.
3. Tahap ketiga adalah proses *infiltrasi* yaitu dengan menambahkan parafin selama 30 menit.
4. Tahap keempat *embedding*, bahan beserta parafin dituangkan ke dalam wadah yang telah disiapkan dan diatur sehingga tidak ada udara yang terperangkap di dekat bahan. Blok parafin dibiarkan satu malam dalam suhu ruang, kemudian diinkubasi dalam freezer sehingga blok benar-benar keras.
5. Tahap pemotongan dengan mikrotom, cutter dipanaskan dan ditempelkan pada dasar blok sehingga parafin sedikit meleleh. Holder dijepitkan pada mikrotom putar dan ditata sejajar dengan mata pisau mikrotom. Pengirisan atau penyayatan diawali dengan mengatur ketebalan irisan. Untuk hepar dipotong 5 μ m. Kemudian pita hasil irisan diambil dengan menggunakan

kuas dan dimasukkan air dingin untuk membuka lipatan lalu dimasukkan air hangat dan dilakukan pemilihan irisan yang terbaik. Irisan yang terbaik diambil dengan gelas obyek yang sudah dicoating lalu dikeringkan di atas hot plate.

6. Tahap *diparafisasi*, yaitu preparat dimasukkan ke dalam xylol sebanyak 2 kali 5 menit.
7. Tahap *rehidrasi*, preparat dimasukkan ke dalam larutan etanol bertingkat mulai dari etanol absolut (2 kali), etanol 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing 5 menit. Kemudian preparat direndam dalam akuades selama 10 menit.
8. Tahap pewarnaan, preparat ditetesi dengan hematoxilin selama 3 menit atau sampai didapatkan hasil warna yang terbaik. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan dibilas dengan akuades selama 5 menit. Setelah itu preparat dimasukkan ke dalam pewarna eosin alkohol selama 30 menit dan dibilas dengan akuades selama 5 menit.
9. Tahap dehidrasi, preparat direndam dalam etanol bertingkat 80%, 90%, 95% dan etanol absolut (2 kali).
10. Tahap *clearing*, dilakukan dengan memasukkan preparat dalam larutan xylol 2 kali selama 5 menit, kemudian dikeringkan.
11. Tahap pengeleman dengan etellen. Hasil diamati di bawah mikroskop dan dipotret.

3.7 Teknik Pengambilan Data

3.7.1 Teknik Pengambilan Data Kadar Asam Urat dalam Urin

Pengukuran kadar asam urat dalam urin mencit (*Mus musculus*) diambil setelah perlakuan ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.). Data yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabel 3.2 sebagai berikut:

Tabel 3.2 Data Kadar Asam Urat Dalam Urin Mencit

Perlakuan	Kadar Asam Urat Dalam Urin (mg/dl)			
	1	2	3	4
K+				
K1				
K2				
K3				
K-				

3.7.2 Teknik Pengambilan Data Kerusakan Hepar Mencit

Histologis hepar mencit (*Mus musculus*) diamati di bawah mikroskop dengan menggunakan perbesaran 40x10. Struktur mikroskopik hepar yang diamati adalah sel hepar (hepatosit) normal dan abnormal. Sel hepar abnormal meliputi nekrosis, karioreksis dan kariolisis.

Sel hepar normal ditentukan dengan ciri-ciri inti sel jelas, sitoplasma terang, ukuran sel normal atau sel tidak mengkerut dan vena sentralis terlihat utuh (Rahayu, 2007). Sedangkan penentuan sel hepar abnormal adalah sebagai berikut:

1. Nekrosis dengan ciri-ciri inti sel tampak lebih gelap, bulat, homogen, dan lebih kecil dari nukleus normal karena terjadi kondensasi kromatin (piknotik).
2. Karioreksis dengan ciri-ciri inti sel pecah menjadi beberapa bagian kecil.

3. Kariolisis dengan ciri-ciri inti tampak samar-samar, besar, bulat dan berongga yang disebabkan oleh adanya disolusi kromatin (Tabbu, 1991 dalam Akhirunnisa, 2010).

Data kerusakan sel hepar yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam tabel 3.3 sebagai berikut:

Tabel 3.3 Data Persentase Kerusakan Hepar Mencit

Perlakuan	Kerusakan Hepar Mencit (%)			
	1	2	3	4
K+				
K1				
K2				
K3				
K-				

3.8 Teknik Analisis Data

Analisis data yang dilakukan meliputi uji normalitas, uji homogenitas, uji ANAVA satu jalur, uji BNJ (Beda Nyata Jujur) dan BNT (Beda Nyata Terkecil). Uji normalitas data dilakukan dengan uji kolmogorov-smirnov menggunakan program SPSS, sedangkan uji homogenitas dilakukan untuk menguji kesamaan k buah ($k \geq 2$) varian populasi yang berdistribusi normal. Jika berdasarkan uji normalitas dan uji homogenitas diketahui data normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji ANAVA satu jalur.