BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) terhadap kadar transaminase hepar pada tikus (*Rattus norvegicus*) diabetes yang diinduksi Streptozotocin ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 5 kali ulangan (Sastrosupadi, 2000). Perlakuan yang digunakan adalah tikus diabetes yang diberi ekstrak biji jintan hitam dengan dua dosis yang berbeda, tikus dengan kontrol positif dan tikus kontrol negatif (tanpa perlakuan).

3.2 Variabel Penelitian

Variabel-variabel pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Variabel bebas : ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) dengan dosis yang berbeda.
- b. Variabel terikat : kadar transaminase (GPT dan SGPT) hepar tikus (*Rattus norvegicus*).
- c. Variabel kendali : jenis tikus yang digunakan adalah tikus jantan strain wistar yang berumur 2 bulan dengan berat badan rata-rata 40 gr dan dikondisikan menjadi diabetes dengan cara diinduksi Streptozotocin (STZ).

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.) terhadap kadar transaminase hepar pada tikus jantan (*Rattus norvegicus*) diabetes ini dilakukan pada bulan Agustus sampai November 2010 di Laboratorium Biosistemika Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Sedangkan proses pembedahan tikus dilakukan di Laboratorium Faal Universitas Brawijaya (UB) Malang dan pengujian kadar enzim transaminase dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang (UMM).

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kandang hewan coba, tutup kandang, tempat makan, botol minum, timbangan analitik, timbangan statis, beaker glass 500 ml, gelas ukur 100 ml, gelas ukur 10 ml, erlenmeyer 50 ml, labu ukur 100 ml, freezer, hotplate, glukotest, strip glukotest, spuit 1 ml, botol aqua besar, spektrofotometer, sentrifuge, seperangkat alat bedah dan tabung ependorf.

3.4.2 Bahan

Sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tikus Jantan (*Rattus norvegicus*), sekam, pakan, CMC (sebagai emulator), darah tikus, ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn.), serbuk kolesterol, asam kolat, minyak sapi,

larutan STZ dengan dosis 30 mg/kg Berat Badan (BB), Etanol 96%, Aseton, n-heksan, Aquades, tepung ikan, GPT Reagen kit, NaCl fisiologis, dan ketalar (sebagai pembius).

3.5 Prosedur Kerja

3.5.1 Persiapan Hewan Coba

Sebelum penelitian dimulai dipersiapkan tikus (*Rattus norvegicus*) dan tempat pemeliharaan hewan coba terlebih dahulu, yaitu kandang (bak plastik), sekam, tempat makan, tempat minum dan pakan jenis 521. Kandang ditempatkan dalam ruangan yang memiliki ventilasi dan masuknya cahaya secara tidak langsung. Kandang, tempat makan dan tempat minum dibersihkan dan alas sekam diganti sekali dalam seminggu (Smith, 2000).

Setelah itu dilakukan aklimasi di Laboratorium selama 1 minggu yaitu kelompok tikus diabetes dan kelompok kontrol tikus normal (tidak diabetes). Kemudian diberikan perlakuan hiperkolesterol selama 1 bulan yaitu dengan pemberian pakan yang dicampur serbuk kolesterol, asam kolat, minyak sapi dan tepung ikan. Agar menjadi diabetes, tikus diinduksi dengan Streptozotocin (STZ) secara intraperitoneal dengan MLD (*Multiple Low Dosis* / dosis rendah berulang) sebanyak tiga kali induksi dengan selang waktu 7 hari selama 17 hari. Setelah 7 hari tikus dipuasakan selama 18 jam dari jam 15.00 WIB sampai jam 08.00 WIB, kemudian diperiksa kadar glukosa darahnya dan tikus yang telah diabetes dibagi menjadi 4 kelompok sesuai dengan banyaknya perlakuan.

3.5.2 Pembuatan Ekstrak

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

- a. Menyiapkan bubuk jintan hitam sebanyak 50 gram.
- b. Dimaserasi dengan pelarut aseton dan n-heksan dengan volume 200 ml.
- c. Dikocok dengan shaker selama 2 jam.
- d. Didiamkan dan disaring dengan corong bunchner sehingga diperoleh residu dan filtratnya ditampung.
- e. Hasil residunya dimaserasi lagi dengan pelarut etanol 96 % dengan volume 200 ml.
- f. Didiamkan dan disaring dengan corong bunchner sehingga diperoleh filtrat dan residunya dibuang.
- g. Filtrat yang diperoleh pertama kali digabung dengan filtrat kedua.
- h. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan Rotary Evaporator sampai diperoleh ekstrak kental.

3.5.3 Persiapan Perlakuan

3.5.3.1 Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Sebelum perlakuan pemberian ekstrak biji jintan hitam, dilakukan pengukuran kadar glukosa darah untuk memastikan 20 tikus telah mengidap diabetes. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan dengan cara mengambil darah tikus melalui ekor yang

dibersihkan dengan alkohol terlebih dahulu. Kemudian darah diteteskan pada strip glukotest dan dimasukkan pada glukotest untuk dibaca kadar glukosa darahnya.

3.5.3.2 Pembagian Kelompok Sampel

Setelah 20 tikus positif diabetes, tikus dibagi menjadi 4 kelompok, yang terdiri dari :

- a. Kelompok P0 : tikus diabetes dengan induksi streptozotocin tanpa diberi ekstrak biji jintan hitam.
- b. Kelompok P1 : tikus diabetes dan diberi ekstrak biji jintan hitam dosis I.
- c. Kelompok P2 : tikus diabetes dan diberi ekstrak biji jintan hitam dosis II.
- d. Kelompok K0 : tikus normal tanpa diberi ekstrak biji jintan hitam.

3.5.3.3 Perhitungan Dosis Biji Jintan Hitam

Menurut Burhan (2008), bahwa kebutuhan manusia akan biji jintan hitam perhari adalah sebanyak 90 gram. Kusumawati (2004) menyatakan bahwa faktor konversi dari manusia ke tikus dengan berat badan untuk manusia 70 kg dan berat badan tikus 200 gram berat badan (BB) adalah 0,018. Untuk 1 gram yang dikonversikan dengan tikus 200 gram adalah $0,018 \times 1 \text{ gram} = 18 \text{ mg}/200 \text{ gr BB}$.

Ketika dikonversikan dengan hasil ekstraksi biji, maka:

$$\frac{18 \text{ mg}}{150.000 \text{ mg}} \times 60.000 \text{ mg} = 7,2 \text{ mg}/200 \text{ mg BB}$$

$$= 3,6 \text{ mg}/100 \text{ mg BB}$$

Pengenceran ekstrak biji jintan hitam:

$$\text{Dosis I} = 3,6 \text{ mg}/100 \text{ gr BB} \times 40 \%$$

$$= 3,6 \times 0,4$$

$$= 1,44 \text{ mg}/100 \text{ gr/ekor}$$

0,5 mg ekstrak Aseton

0,5 mg ekstrak n-heksan

0,5 mg ekstrak etanol

$$\text{Dosis II} = 3 \text{ mg}/100 \text{ gr/ekor}$$

1 mg ekstrak Aseton

1 mg ekstrak n-heksan

1 mg ekstrak etanol

Maka, penelitian ini menggunakan dua dosis yang berbeda yaitu :

- a. Dosis I : 0,5 mg/tikus/hari
- b. Dosis II : 1 mg/tikus/hari

3.5.4 Kegiatan Penelitian

3.5.4.1 Perlakuan Pemberian Ekstrak Biji Jintan Hitam

Pemberian ekstrak biji jintan hitam untuk perlakuan, ditimbang 20 mg CMC kemudian ditambahkan 1 ml aquades dan diaduk sampai CMC homogen. Kemudian, ditambah 45 µl ekstrak aseton dan diaduk hingga homogen, ditambah 45 µl n-heksan dan diaduk hingga homogen, ditambah 45 µl etanol dan diaduk hingga homogen. Kemudian ditambahkan aquades sedikit demi sedikit hingga volumenya menjadi 22,5 ml. Lalu diambil 15 ml larutan tersebut untuk digunakan sebagai ekstrak dosis II, kemudian sisa larutan (7,5 ml) diencerkan lagi dengan penambahan 7,5 ml aquades sehingga larutan menjadi 15 ml. masing-masing tikus diabet di gavage 0,5 ml ekstrak

setiap hari secara oral selama 30 hari. Sedangkan untuk kelompok P0 dan tikus kontrol hanya diberi suspensi CMC Na 0,5 % tanpa ekstrak biji jintan hitam.

Kadar glukosa darah sesudah perlakuan diukur pada hari ke-1 dan 30. Dasar pemberian 30 hari dikarenakan pada jangka waktu tersebut sel-sel yang mengalami kerusakan sudah mulai melakukan regenerasi meskipun belum pada tahap penyembuhan atau pengembalian struktur sel pada keadaan normal.

3.5.4.2 Pengukuran GPT Dan SGPT

a. Pengukuran GPT

Ditimbang 1 gram organ hepar kemudian dimaserasi dan dicampurkan dengan garam fisiologi dengan menggunakan pengenceran 10 ml sehingga menjadi 10 %. Selanjutnya disaring dan diambil filtratnya. Setelah itu disentrifuse dengan kekuatan 4000-6000 rpm selama 10 menit sehingga diperoleh supernatan 100 μ L. Kemudian ditambah Reagen kit (Reagen R₁ sebanyak 1 ml dan R₂ sebanyak 0,25 ml). kemudian dikocok selama 5 menit setelah itu diukur daya absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm dan dicatat penurunan absorbansinya setiap menitnya selama 3 menit.

b. Pengukuran SGPT

Pada pengukuran kadar SGPT, didahului dengan pengambilan darah melalui jantung (intra cardial) dengan alat suntik sebanyak $\pm$ 3 ml. Darah yang telah diambil dimasukkan dalam tabung venoject yang bersih dan kering, kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum yang terpisah diambil dan

dimasukan dalam tabung lainnya yang bersih dan kering dan ditutup. Jika serum tidak langsung diperiksa, maka harus disimpan pada freezer suhu 2°C-8°C selama maksimal 4 hari, karena jika lebih dari 4 hari akan mengalami degradasi aktifitas sebesar 10 %.

Pengukuran aktivitas SGPT dilakukan pada masing-masing kelompok perlakuan setelah pemberian ekstrak biji jintan hitam selama 45 hari. Pembuatan larutan pereaksi dengan melarutkan tablet reagen dalam larutan buffer dengan perbandingan 1 : 10. Pengukuran aktifitas enzim SGPT dilakukan dengan mengambil serum sebanyak 50 µl dan ditambahkan 500 µl larutan pereaksi. Kemudian dihomogenkan dan ditunggu selama 1 menit sebelum diukur. Setelah 1 menit, diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm, dan dicatat penurunan absorbansinya setiap menitnya selama 3 menit.

3.6 Data dan Teknik Pengambilan Data

3.6.1 Teknik pengambilan data kadar GPT dan SGPT

Data dalam penelitian ini berupa kadar transaminase (GPT dan SGPT) pada hepar tikus. Data yang diperoleh dimasukan ke dalam tabel berikut :

Tabel 3.6.1.1 Kadar GPT Hepar Tikus

Perlakuan	Kadar GPT (U/l)				
	1	2	3	4	5
P0					
PI					
P2					
K0					

Tabel 3.6.1.2 Kadar SGPT pada Tikus

Perlakuan	Kadar SGPT (U/l)				
	1	2	3	4	5
P0					
P1					
P2					
K0					

Keterangan :

- P0 : Kelompok tikus diabetes dengan diinduksi streptozotocin tanpa diberi ekstrak biji jintan hitam.
- P1 : Kelompok tikus diabetes dan diberi ekstrak biji jintan hitam dosis I
- P2 : Kelompok tikus diabetes dan diberi ekstrak biji jintan hitam dosis II
- K0 : Kelompok tikus normal tanpa diberi ekstrak biji jintan hitam (tanpa perlakuan).

3.7 Analisa Data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji jintan hitam terhadap kadar transaminase hepar tikus Diabetes Mellitus yang diinduksi streptozotocin, data hasil pengamatan yang sudah ditabulasi diuji statistik dengan uji ANOVA (*Analysis of Variance*). Jika hasil uji ANOVA menunjukkan perbedaan signifikan maka dilanjutkan dengan uji lanjut BNT dengan parameter $\alpha = 1\%$.