

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *true experimental-post test only control group design* secara *in vivo* yang bertujuan untuk mengetahui Mengetahui kemampuan Xanthone dan Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana L.*) dalam mereduksi Ox-LDL sebagai upaya proteksi penyakit kardiovaskuler akibat paparan subkronis pestisida selama 21 hari.

4.2. Populasi dan Sampel

Sampel penelitian adalah model tikus jenis *Rattus norvegicus* jantan dan betina berusia 8 minggu. Besar sampel ditentukan dari jumlah sampel tiap perlakuan (n) pada jumlah kelompok perlakuan (p), dihitung berdasarkan rumus Solimun .

$$\begin{aligned} p &= 5 \\ p(n - 1) &\geq 15 \\ pn - p &\geq 15 \\ 5n &\geq 20 \\ n &\geq 4 \end{aligned}$$

Didapatkan jumlah sampel hewan coba untuk setiap perlakuan adalah sebanyak 4 ekor. Jadi, keseluruhan sampel yang dibutuhkan sebanyak 24 ekor tikus tikus *Rattus Norvegicus* galur *Wistar*.

Penelitian ini meliputi empat perlakuan dan dua kontrol, yaitu :

a) Kontrol Negatif (KN)

Kelompok yang diberi pakan normal tanpa pemberian diklorvos, xanthone dan ekstrak kulit manggis namun diberikan aquades saja dengan menggunakan sonde.

b) Kontrol Positif (KP)

Kelompok yang diberi pakan normal , di beri injeksi diklorvos 2 mg/kgBB secara perkutan tanpa Xanthone dan Ekstrak Kulit Manggis selama 21 hari

c) Kelompok perlakuan I

Kelompok yang diberi pakan normal , diberi paparan injeksi diklorvos 2 mg/kgBb secara subkutan dan Ekstrak kulit manggis dosisnya 800 mg/kgbb peroral secara sonde satu kali sehari selama 21 hari.

d) Kelompok perlakuan II

Kelompok yang diberi pakan normal , diberi paparan injeksi diklorvos 2 mg/kgBb secara subkutan dan Ekstrak kulit manggis dosisnya 1200 mg/kgbb peroral secara sonde satu kali sehari selama 21 hari.

e) Kelompok perlakuan III

Kelompok yang diberi pakan normal, diberi paparan injeksi diklorvos 2 mg/kgBb secara subkutan dan Xanthone dosisnya 70 mg/kgbb peroral secara sonde satu kali sehari selama 21 hari.

f) Kelompok perlakuan IV

Kelompok yang diberi pakan normal, diberi paparan injeksi diklorvos 2 mg/kgBb secara subkutan dan Xanthone dosisnya 140 mg/kgbb peroral secara sonde satu kali sehari selama 21 hari.

Kriteria *Drop out* adalah jika tikus putih mati pada saat proses penelitian berlangsung.

4.3. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Januari - Mei 2013.

4.4. Variabel Penelitian

Variabel dari penelitian ini terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat yaitu :

a) Variabel bebas :

- Dichlorvos
- dosis Xanthone dan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana L.*)

b) Variabel terikat : Kadar OX-LDL dan PON-1

4.5. Definisi Operasional

1. *True experimental-post test only control group design* adalah rancangan penelitian yang dilakukan randomisasi pada sampel sehingga kelompok kontrol dan eksperimen dianggap sama sebelum diberi perlakuan dan tidak diadakan *pre-test*.
2. Kulit manggis yang digunakan berwarna merah coklat, permukaan dalam licin, berbau khas, berasa sepat dan pahit.
3. Ekstrak kulit manggis yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dengan cara merendam ekstrak kulit manggis yang telah dikeringkan di dalam etanol 96%, dibiarkan selama satu malam, disaring, dan dilakukan proses evaporasi.

4. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus Norvegicus*) jantan dan betina berumur 6 minggu dengan berat jantan 120-190 gram dan betina 65-117 gram. Sebelum perlakuan dimulai, seluruh hewan coba diaklimatisasi selama 2 minggu tanpa diberi perlakuan khusus. Hewan coba hanya diberi pakan normal dan dibiarkan beradaptasi sampai waktu penelitian dimulai.
5. Efek Farmakologi Xanthone dan ekstrak kulit manggis dapat diketahui melalui Level ox-LDL dan PON-1 yang diukur menggunakan metode ELISA *immunoassay enzyme*.
6. Durasi Pemaparan
Toksikologis membagi pemaparan pada hewan percobaan terhadap bahan kimia dibagi menjadi empat kategori yaitu akut, subakut, subkronik dan kronik. Pemaparan akut didefinisikan sebagai pemaparan terhadap bahan kimia dalam waktu 24 jam (pemberian tunggal atau diulang untuk agen dengan toksisitas rendah atau tidak ada) dan jalur yang digunakan adalah intraperitoneal, intravena, injeksi subkutan, intubasi oral dan aplikasi dermal. Pemaparan subakut diartikan sebagai pemaparan berulang terhadap agen kimia dalam jangka waktu 2 minggu, paparan subkronik dalam jangka waktu 2 minggu sampai 3 bulan, dan pemaparan kronik untuk jangka waktu lebih dari 3 bulan.

4.6 Instrumen Penelitian

a) Perawatan hewan coba

Botol air minum, timbangan berat badan dengan neraca Sartorius, dan bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan tutup kandang

terbuat dari kawat dan sekam di dalamnya. Setiap tikus menempati satu kandang.

b) Pembuatan Ransum Makanan Diet Normal

Alat : timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, nampan

Bahan : komposisi buras dan tepung (3:1)

c) Pembuatan ekstrak kulit manggis

Alat : blender, corong gelas, gelas ukur, labu erlenmeyer atau beaker glass (dengan volume 1 liter), oven, neraca analitik, kertas saring, wadah plastik transparan berpenutup rapat, dan 1 set alat evaporasi yang terdiri dari labu penampung, pendingin spiral, labu rotasi ekstraksi, waterbath dan vakum, klem statis, selang plastik, waterpump, bak penampung aquabidest, tabung penampung hasil ekstraksi, cawan penguap.

Bahan : kulit manggis, etanol 96%, aquabidest

d) Pembedahan Hewan Coba

Alat : Gunting bedah, steroform 2, pinset 2, kapas, jarum pentul 2 set, spuit 5 CC 24 buah

Bahan : Ketamin, Parafin, Formalin 10% 500 ml, Alkohol 100%, 96%, 85%, 70%, 50%, Xylol, wadah plastic+tutup 48 buah.

e) Pengukuran Level Ox-LDL dan PON-1 dengan menggunakan metode ELISA

Alat : Spectrophotometric 1

Selaput Penutup Plat	2
<i>Microelisa stripplate</i>	12well x 8 strips
Bahan :	
Spesimen serum darah	24
<i>Washing Solution</i>	20mlx1botol
<i>HRP-Conjugate reagent</i>	6mlx1 botol
Pengencer Sampel	6mlx1 botol
<i>Chromogen Solution A</i>	6mlx1 botol
<i>Chromogen Solution B</i>	6mlx1 botol
<i>Stopp Solution</i>	6mlx1 botol
Standard (64µg/L)	0.5mlx1 botol
Pengencer Standard	1.5mlx1botol

4.7. Metode Pengumpulan Data

a) Aklimatisasi

Hewan uji coba tikus yang berumur 6 minggu diaklimatisasi selama 2-3 minggu tanpa diberi perlakuan khusus. Hewan uji coba hanya diberi pakan normal secara *ad libitum* dan dibiarkan beradaptasi sampai waktu penelitian dimulai.

b) Pembuatan Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana L*)

Pengeringan Kulit Manggis

- Kulit manggis yang akan dikeringkan dicuci
- Kulit manggis dipotong kecil-kecil
- Lalu dimasukkan ke oven dengan suhu 80⁰ C atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air)

Proses Ekstraksi Kulit Manggis

- Setelah kering, haluskan dengan blender sampai halus

- Timbang sebanyak 100 gr (sample kering)
- Masukkan 100 gr sampel kering ke dalam gelas erlemeyer ukuran 1 liter
- Kemudian rendam dengan etanol sampai volume 1000 ml
- Kocok sampai benar-benar tercampur (kurang lebih 30 menit)
- Didiamkan 1 malam sampai mengendap

Proses Evaporasi

- Lapisan atas dari campuran etanol dengan zat aktif yang sudah terambil diambil
- Larutan dimasukkan dalam labu evaporasi 1 liter
- Pasang labu evaporasi pada evaporator
- Water bath diisi dengan air sampai penuh
- Semua rangkaian alat dipasang, termasuk rotary evaporator, pemanas water bath (atur sampai 90⁰ C), disambungkan dengan aliran listrik
- Larutan etanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu
- Aliran etanol ditunggu sampai berhenti menetes pada labu penampung (kurang lebih 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu)
- Hasil yang diperoleh kira-kira seperempat dari bahan alam kering
- Hasil ekstraksi dimasukkan dalam botol plastik atau kaca
- Hasil ekstraksi disimpan dalam freezer.

c) Persiapan Larutan untuk Perlakuan

Dalam penelitian ini terdapat yakni kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Untuk kelompok kontrol positif (KP) hanya diberikan diklorvos

2 mg/KgBB. Untuk kelompok perlakuan digunakan ekstrak kulit manggis dengan 2 dosis yang berbeda, yaitu 800 mg/kgBB dan 1200 mg/kgBB dan Xanthone dengan 2 dosis yang berbeda, yaitu 70 mg/kgBB dan 140 mg/kgBB

d) Uji Farmakologi Ekstrak Kulit Manggis terhadap Tikus *Rattus Norvegicus*

- Dilakukan penimbangan terhadap tikus untuk menentukan dosis masing masing tikus berdasarkan berat badan.
- Diclorvos disediakan dalam spuit, kemudian diinjeksi ke tikus dengan dosis 2 mg/kgBB perhari perkutan.
- Xanthone dan Ekstrak kulit manggis disediakan dalam berbagai konsentrasi yang telah ditentukan. Xanthone dan Ekstrak dimasukkan dalam alat sonde.
- Ekstrak kulit manggis diberikan setelah tikus mendapat pakan normal dan di injeksi Diklorvos.
- Kontrol Negatif (KN) diberi pakan normal tanpa pemberian diklorvos, xanthone dan ekstrak kulit manggis namun diberikan aquades saja dengan menggunakan sonde.
- Kontrol Positif (KP) diberi pakan normal , di beri injeksi diklorvos 2 mg/kgBB secara perkutan tanpa Xanthone dan Ekstrak Kulit Manggis selama 21 hari
- Kelompok perlakuan I diberi pakan normal , diberi paparan injeksi diklorvos 2 mg/kgBb secara subkutan dan Ekstrak kulit manggis dosisnya 800 mg/kgbb peroral secara sonde satu kali sehari selama 21 hari.

- Kelompok perlakuan II diberi pakan normal, diberi paparan injeksi diklorvos 2 mg/kgBb secara subkutan dan Ekstrak kulit manggis dosisnya 1200 mg/kgbb peroral secara sonde satu kali sehari selama 21 hari.
- Kelompok perlakuan III diberi pakan normal, diberi paparan injeksi diklorvos 2 mg/kgBb secara subkutan dan Xanthone dosisnya 70 mg/kgbb peroral secara sonde satu kali sehari selama 21 hari.
- Kelompok perlakuan IV diberi pakan normal, diberi paparan injeksi diklorvos 2 mg/kgBb secara subkutan dan Xanthone dosisnya 140 mg/kgbb peroral secara sonde satu kali sehari selama 21 hari.
- Selama penelitian hewan coba ditimbang berat badannya setiap satu minggu sekali. Hewan coba diberi minum dan diberi pakan normal dengan komposisi buras dan tepung (3:1) setiap hari. Penggantian sekam dilakukan dua kali dalam satu minggu.
- Setelah 21 hari, dilakukan pembedahan hewan coba, diambil darahnya untuk dilakukan pengukuran level Ox-LDL dan PON-1 dengan metode ELISA

e) Pembedahan Tikus

Prosedur pembedahan ini dilakukan melalui tahap persiapan, pembedahan dan sanitasi. Tahap persiapan, disiapkan pot organ yang sudah diberi label sesuai dengan nomor tikus yang akan dibedah. Pot organ diisi dengan formalin 4-10% untuk menyimpan organ dan diberi label sesuai dengan nomor hewan coba. Disiapkan peralatan bedah seperti gunting bedah (lurus panjang, lurus pendek dan bengkok),

pinset, gelas arloji, cawan petri, papan bedah, pins, beker gelas dan kertas saring.

Tahap pembedahan tikus dengan cara dibius dengan menyuntikkan Ketamin. Setelah tikus tidak sadar, tikus diposisikan pada papan bedah menggunakan *pins*. Dibedah mulai dari bagian perut ataupun uterus menggunakan gunting bengkok. Sample darah diambil dari AORTA dengan menggunakan spuit 5 cc. Masing-masing organ diambil dan dipisahkan menggunakan gunting lurus. Organ dibersihkan dari lemak yang masih menempel. Organ dicuci menggunakan aquades berulang-ulang hingga bersih dari darah. Dicuci menggunakan NaCl 0,9% berulang-ulang. Diamati secara makroskopis adanya nodul yang tampak dan dicatat perubahan yang ditemukan. Ditiriskan diatas kertas saring. Organ dimasukkan dalam pot berisi formalin 4-10%.

Tahap sanitasi dilakukan dengan cara memasukkan sisa organ tikus yang tidak terpakai ke dalam kantong plastik. Kantong plastik yang berisi sisa organ dimusnahkan dengan cara insinerasi. Sampah lain berupa plastik, kertas dan lain-lain yang tidak berhubungan dengan organ dibuang dalam kantong plastik tersendiri. Area kerja sisa pembedahan dibersihkan dengan sabun dan jika perlu disemprot dengan alkohol.

- f) Pengukuran Level Ox-LDL dan PON1 dengan menggunakan metode ELISA

Dilakukan Pada semua hewan coba baik pada kelompok kontrol maupun perlakuan. Level antibodi ox-LDL diukur menggunakan metode ELISA *immunoassay enzyme* dengan urutan cara sebagai berikut :

i. Persiapan Spesimen

Ekstrak sesegera mungkin setelah pengumpulan spesimen , dan sesuai dengan literatur yang relevan , dan lakukan pengukuran sesegera mungkin setelah ekstraksi. Jika tidak bisa, spesimen dapat disimpan dalam $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, Hindari siklus *freeze-thaw* berulang-ulang .Tidak dapat mendeteksi sampel yang mengandung NaN_3 , karena NaN_3 menghambat aktivasi HRP.

ii. Prosedur Pengujian Kadar Ox-LDL dengan Uji ELISA

1. Encerkan dan tambahkan sampel standard, seperti berikut:

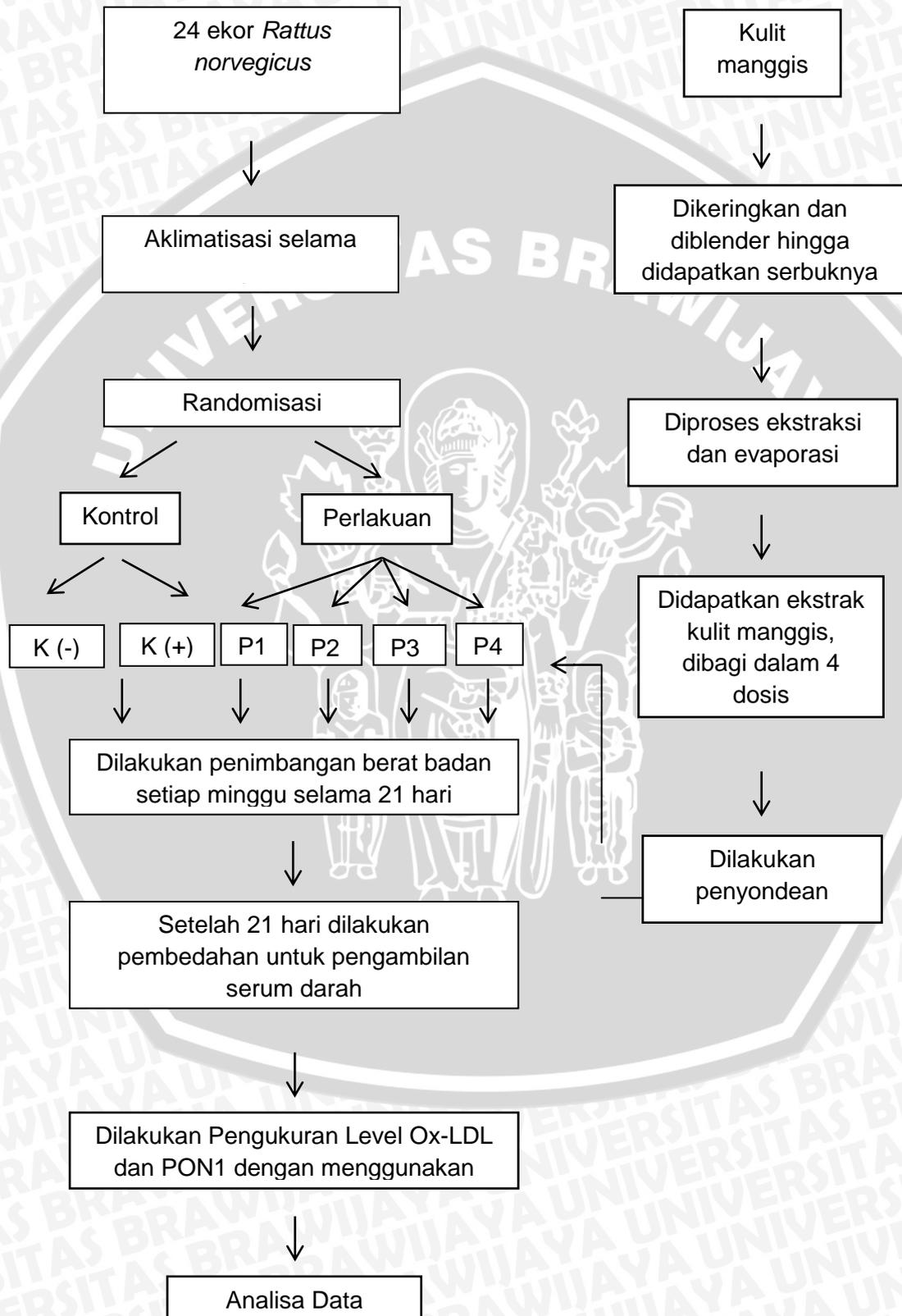
- a. $32\mu\text{g} / \text{L}$; *Standard 5*; $150\mu\text{l}$ *Standard* ; 150 ml pengencer *Standard*
- b. $16\mu\text{g} / \text{L}$; *Standard 4* ; $150\mu\text{l}$ *Standard 5* ; 150 ml pengencer *Standard*
- c. $8\mu\text{g} / \text{L}$; *Standard 3* ; $150\mu\text{l}$ *Standard 4* ; 150 ml pengencer *Standard*
- d. $4\mu\text{g} / \text{L}$; *Standard 2* ; $150\mu\text{l}$ *Standar 3* ; 150 ml pengencer *Standard*
- e. $2\mu\text{g} / \text{L}$; *Standard 1* ; $150\mu\text{l}$ *Standard 2* ; 150 ml pengencer *Standard*

2. Tambahkan sampel yang sudah diencerkan (Sampel $10\mu\text{L}$ dan Pengencer sampel $40\mu\text{L}$ (pengenceran dilakukan sebanyak 5 x)) ke *Microelisa stripplate* 12 well x 8 strip, sebisa mungkin tidak menyentuh sampel maupun wadahnya dan campurkan dengan baik.

3. Tutup plat dengan membran penutup plate, inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

4. Cairan konfigurasi : washing solution diencerkan sebanyak 20-30 kali .
5. *washing* :
Buka Membran Penutup Plate, buang cairannya, kringkan dengan cara mengayunkan, tambahkan *washing solution* , diamkan 30 detik, kemudian keringkan. Ulangi sampai 5 kali.
6. Tambahkan 50µl reagen HRP - Conjugate pada masing-masing *well* , kecuali bagian yang kosong.
7. Inkubasi : Sama dengan prosedur 3 .
8. *washing* : samadengan prosedur 5. .
9. Warna : Tambahkan *chromogen Solution A 50UL* dan *chromogen Solution B* pada masing-masing *well*, hindarkan dari cahaya selama 15 menit pada 37 °C.
10. Stop reaksi : Tambahkan *Stop Solution 50µl* ke masing-masing *well* , Reaksi akan berhenti (warna biru berubah menjadi warna kuning)
11. Pembacaan : bagian *well* yang kosong gunakan sebagai 0 , Baca absorbansi dengan menggunakan spektrofotometri pada 450nm setelah *Menambahkan Stop Solution* dalam 15 menit .

4.8 Diagram Alur Kerja



Keterangan :

K (-) : Kontrol negatif, diberi aquades tanpa diberi Dilorvos, Xanthone dan ekstrak kulit manggis

K (+) : di beri injeksi diklorvos 2 mg/kgBB secara perkutan tanpa Xanthone dan Ekstrak Kulit Manggis

P1 : diberi paparan injeksi diklorvos 2 mg/kgBb secara subkutan dan Ekstrak kulit manggis dosisnya 800 mg/kgbb peroral

P2 : diberi paparan injeksi diklorvos 2 mg/kgBb secara subkutan dan Ekstrak kulit manggis dosisnya 1200 mg/kgbb peroral

P3 : diberi paparan injeksi diklorvos 2 mg/kgBb secara subkutan dan Xanthone dosisnya 70 mg/kgbb peroral

P3 : diberi paparan injeksi diklorvos 2 mg/kgBb secara subkutan dan Xanthone dosisnya 140 mg/kgbb peroral

4.9 Analisis Data

Hasil perhitungan jumlah foam cell ada tikus kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik menggunakan program *Software Statistical Product and Service Solution (SPSS) for Windows* versi 16.0 dengan tingkat signifikasi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$). Langkah – langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut :

- a. Uji Normalitas Data Shapiro-wilk : bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak.
- b. Uji Homogenitas Levene : bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen.
- c. Uji *One-way ANOVA* : bertujuan untuk membandingkan nilai rata – rata dari masing – masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan. Perbedaan pada dua kelompok dianggap bermakna bila $p < 0,05$.
- d. Uji *Post hoc*: bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Uji *Post Hoc* yang digunakan adalah Uji LSD dan TAMHANE dengan tingkat signifikansi 95 % ($p < 0,05$).
- e. Uji Korelasi *Pearson* : bertujuan untuk mengukur kekuatan hubungan dua variabel atau lebih yang berskala interval (parametrik).