

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* pada hewan coba tikus wistar (*Rattus norvegicus*) dengan menggunakan *post test only control group design*, yaitu membandingkan hasil yang didapat setelah perlakuan dengan menggunakan kontrol positif dan negatif. Pengukuran parameter dilakukan setelah diberikan perlakuan yang dalam penelitian ini parameter yang diukur adalah kadar nitrit oksida (NO) serum tikus *Rattus norvegicus* strain wistar berjenis kelamin jantan dan perlakuan yang diberikan ialah diet aterogenik dan pemberian ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana Linn*) dengan berbagai dosis pemberian.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Sampel penelitian

Sampel penelitian adalah model tikus jenis *Rattus norvegicus* jantan Tikus yang digunakan berusia 8 minggu yang diberikan diet atherogenik dan kemudian diberikan perlakuan.

Jumlah sampel dihitung berdasarkan rumus Federer (1955)

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$(6 - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$6r - 6 - r + 6 \geq 15$$

$$5r \geq 15$$

$$r \geq 3$$

Jadi, minimal dilakukan pengulangan perlakuan ialah 3, tetapi untuk menghindari bias nya hasil pengukuran, pengulangan yang dimasukan dalam perhitungan analsis data ialah 4 pengulangan. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan perjumlah total 36 ekor.

4.2.2 Pemilihan Sampel

Kriteria Inklusi

1. Tikus wistar berusia 8-10 minggu
2. Tikus jantan karena tikus betina terdapat estrogen yang mempengaruhi metabolisme lemak dan kolesterol.
3. Kondisi sehat (aktif, tidak cacat)

Kriteria Eksklusi

1. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan. Tikus yang tidak mau makan dapat dilihat dari sisa pakan tikus yang diganti setiap hari
2. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung. Penurunan kondisi tikus dapat dilihat melalui evaluasi berat badan tikus yang ditimbang setiap satu minggu sekali setiap hari rabu.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juni sampai dengan September 2013 mulai dari pemeliharaan, perlakuan hingga pembedahan hewan coba. Pengukuran kadar nitrit oksida (NO) serum diamati dan diukur di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas atau Variabel Independen

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak *etanol* kulit manggis yaitu 200 mg/Kg BB, 400 mg/Kg BB, dan 800 mg/Kg BB.

Penelitian ini membagi sampel dalam delapan kelompok perlakuan yaitu :

- a. Kelompok kontrol negatif (K -) : Sampel dengan kondisi tanpa diet aterogenik, pakan diberikan normal diet dan tidak diberikan ekstrak kulit manggis
- b. Kelompok kontrol positif 4 minggu –*High Fat diet* (HFD 4 minggu) : Sampel dengan diet aterogenik tidak diberi ekstrak kulit manggis selama 4 minggu. Fungsi kelompok ini untuk mengetahui perubahan kadar NO serum tikus pada minggu ke 4
- c. Kelompok kontrol positif 12 minggu – *High fat diet* (K+) : Sampel dengan diet aterogenik tidak diberi ekstrak kulit manggis selama 12 minggu
- d. Kelompok B1 : Sampel dengan pemberian ekstrak kulit manggis bersamaan dengan diet aterogenik selama 12 minggu dengan dosis 1 (200mg/Kg/BB)
- e. Kelompok B2 :Sampel dengan pemberian ekstrak kulit manggis bersamaan dengan diet aterogenik selama 12 minggu dengan dosis 2 (400mg/Kg/BB)
- f. Kelompok B3 : Sampel dengan pemberian ekstrak kulit manggis bersamaan dengan diet aterogenik selama 12 minggu dengan dosis 3 (800mg/Kg/BB)

4.4.2 Variabel tergantung atau Variabel Dependen

Variabel tergantung atau variabel terikat atau variabel dependen dalam penelitian ini ialah Kadar NO serum tikus, yang diukur menggunakan KIT

:Total NO /Nitrite/Nitrate Assay KGE 001 R&D system. Test Nitrit oksida menggunakan ELISA dan pembacaan menggunakan *ELISA Reader* dengan panjang gelombang 540 nm /690 nm.

4.4.3 Variabel Luar

1. Jenis kelamin tikus
2. Faktor lingkungan laboratorium di mana tikus di tempatkan dan dilakukan pengukuran kadar NO

4.5 Definisi Operasional

1. **Ekstrak Kulit Manggis** : Kulit Manggis didapatkan dari kota Lumajang dan Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Jumlah dosis dari ekstrak kulit manggis yang diberikan untuk perlakuan adalah 200 mg/Kg BB/hari, 400 mg/Kg BB/hari, dan 800 mg/Kg BB/hari . kulit manggis yang digunakan ialah bagian luar dan dalam kulit. Pemilihan dosis ini didasarkan pada penelitian secara in vitro mengenai efek ekstrak kulit manggis sebagai anti inflamasi anti piretik, dan analgesik terhadap tikus, dosis yang memberikan efek ialah 200mg/kg BB/ hari, 400 mg/kg BB/ hari, dan 800 mg/kg BB/ hari . Dosis ekstrak kulit manggis kelompok perlakuan diatur berdasarkan penelitian Reanmongkol (2008).
2. **Hewan Coba** : Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jenis *Rattus norvegicus* jantan berusia 8 minggu.
3. **Diet Aterogenik** : ialah diet yang diberikan dengan maksud untuk menginduksi pembentukan plak atherosklerosis pada subendotel aorta tikus. Komposisinya berupa PAR-S, tepung terigu, minyak babi, minyak kambing, minyak kelapa, kuning telur, *cholic acid*, dan air. (Karlina, 2008).

4. Kadar NO : NO ialah suatu EDRF (*Endotelium - derived relaxing factor*) yaitu faktor pelepas vaskuler yang berasal dari sel endotel. NO dapat mengindikasikan keadaan suatu vaskuler terhadap aterosklerosis. Pemeriksaan konsentrasi NO ini berdasarkan konversi enzimatis dari nitrat menjadi nitrit oleh nitrat reductase. Reaksi ini diikuti dengan deteksi kolorimetri dari nitrat sebagai *dye product* dari reaksi Greiss. (Miles et al, 1996) . NO diukur menggunakan ELISA, dengan satuan Conc (pg/ml).

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan Perawatan Tikus

1. Alat perawatan tikus :
 - 36 buah bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm
 - 36 buah tutup kandang terbuat dari kawat
 - 36 buah botol air minum tikus
 - 2 buah Timbangan berat badan dengan neraca Sartorius
2. Bahan Perawatan tikus :
 - sekam 10 karung
 - Air untuk minum tikus

4.6.2 Alat dan Bahan Makanan Tikus (Karlina, 2008) :

Alat : Timbangan, neraca analitik, 3 buah baskom, Pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, nampan, kompor listrik dan panci.

Bahan :

Bahan pembuatan diet normal untuk kelompok kontrol negatif:

1. PARS 16 gram x 6 tikus kontrol negatif = 96 gram

2. Tepung terigu 2.2 gram x 6 tikus kontrol negatif = 13.2 gram
3. Air secukupnya

Bahan pembuatan diet atherogenik :

1. PARS 16 gram x 36 tikus = 576 gram
2. Tepung terigu 8 gram x 36 tikus = 288 gram
3. Minyak Babi 2.6 gr x 36 tikus= 93,6 gram
4. Minyak Kambing 3.2 x 36 tikus= 115,2 gram
5. Asam Kolat 0.04 gram x 36 tikus = 1,44 gram
6. Minyak Kelapa 0.32 gram x 36 tikus = 11,52 gram
7. Bahan Tambahan peningkat nafsu makan tikus <10 gram

Berat pakan pertikus 40 gram

4.6.3 Alat dan bahan pembedahan tikus

Alat : Gunting bedah, steroform 2 buah, pinset 2 buah, kapas, jarum pentul 2 set

Bahan : Kloroform 20 ml, spuit insulin 1 ml 30 buah, formalin 10% 200 ml, wadah plastic + tutup 25 buah, alkohol, vacuotainer 25 buah

4.6.4 Alat dan bahan pembuatan Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana Linn*)

Alat :

- 1 buah Oven
- 1 buah timbangan
- 2 gelas erlenmeyer
- 1 corong gelas

- kertas saring
- 1 labu evaporator
- 1 pendingin spiral/rotary evaporator
- 1 labu penampung etanol
- Evaporator
- 1 buah selang water pump
- water bath
- 1 vacum pump

Bahan : Kulit Manggis, etanol 96%, aquades, botol hasil ekstrak.

4.6.5 Alat dan Bahan Pengukuran Kadar NO serum

Alat :

1. Kolorimetri KIT
2. Mikrotubul
3. blue tip
4. yellow tip
5. white tip
6. Mikroplate 96 well polystrene (12 strips 8 well)

Bahan :

1. Nitrat reduktase : Lypholized nitrat reductase, 1,2 mL/vial pada buffer yang terdiri dari gliserol
2. NADH : lypholized reduced beta-nicotinamide adenine dinucleotide, harus disimpan ditempat yang gelap atau diwadah yang telah terbungkus dengan aluminium foil



3. Nitrat standard : 0,5 mL/vial dari sodium nitrat (2000 mikromol/L) pada buffer
4. Reaction diluent (konsentrasi 10x) 30 mL/vial dari *10-fold-concentrated buffer containing detergent*
5. Griess reagent I 12 mL/vial sulfonamide pada 2 Nasam hydroklorat
6. Griess reagent II 12 mL/vial dari N-(1-Naphytl ethylenediamine pada 2 N asam hydroklorat)

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Adaptasi dan perawatan tikus

Pada penelitian ini selama proses adaptasi, semua tikus diberi pakan standar (normal). Masing-masing tikus mendapatkan 40 gram. Agar terbebas dari rasa stres dan tidak nyaman, hewan coba diletakkan dalam kandang yang sesuai dengan besar dan jumlahnya yaitu 1 kandang berisi satu tikus, ukuran kandang 20 cm x 30cm x 40cm yang dapat tampak dari luar agar memudahkan evaluasi dasar kandang dilapisi dengan sekam padi setebal 0,5 - 1cm dan diganti dalam interval seminggu sebanyak dua kali penggantian. Penutup kandang terbuat dari kawat berjaring. Temperatur dan kelembapan ruangan dibiarkan pada kisaran alamiah yang baik dengan kebutuhan fisiologis tikus antara 27°C- 28°C. Selain itu agar tikus bebas dari rasa nyeri dalam perlakuan pemberian ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana L.*) secara sonde dilakukan oleh tenaga profesional untuk menghindari aspirasi dan kemungkinan infeksi. Kebutuhan pakan tikus disesuaikan dengan perlakuan diberi setiap hari satu kali pada pagi hari, sisa pakan makanan pada hari

sebelumnya tidak digunakan kembali, dan pemberian minum dilakukan setiap hari sebanyak 150ml.

4.7.2 Diet Atherogenik

Pembuatan diet atherogenik dilakukan setiap hari. Kebutuhan makanan tikus dewasa per-ekor setiap hari adalah 40 gram sehingga komposisi untuk tiap tikus perlakuan adalah 40 gram yang terdiri dari campuran comfeed PAR-S 50 %, terigu 25 %, minyak babi 8 %, asam kolat 0,125 %, dan minyak kambing 10 %, minyak kelapa 1% dan kuning telur 5%. Pembuatan makanan dilakukan setiap hari dengan ketentuan 40 gram/ekor dan dibentuk bulatan agar memperkuat tekstur pakan untuk ditimbang sisanya keesokan harinya.

4.7.3 Pembuatan Ekstrak ethanol *Garcinia mangostana* Linn

Proses pengeringan

1. Kulit Manggis bagian luar dan dalam (*Garcinia mangostana* Linn) dicuci sampai bersih
2. Dipotong kecil-kecil
3. Dioven dengan suhu 80 °C atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air)

Proses ekstraksi

1. Setelah kering, dihaluskan dengan blender sampai halus
2. Ditimbang sebanyak 100 gr sampel kering ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter
3. Diredam dengan ethanol sampai volume 900 ml
4. Dikocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit)

5. Didiamkan 1 malam sampai mengendap
6. Lapisan atas atau bagian pelarut diambil , disaring menggunakan kertas saring.

Proses evaporasi

1. Diambil lapisan atas campuran ethanol dengan zat aktif yang sudah terambil
2. Dimasukkan dalam labu evaporasi 1 liter
3. Dipasang labu evaporasi pada evaporator
4. Water bath diisi dengan air sampai penuh
5. Semua rangkaian alat termasuk rotary evaporator, pemanas water bath (diatur sampai 90°) dipasang kemudian disambungkan dengan aliran listrik
6. Larutan etanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu
7. Ditunggu sampai aliran ethanol berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ sampai 2 jam untuk 1 labu)
8. Hasil yang diperoleh kira-kira 18 gram ekstrak etanol kulit manggis dari 100 gram bubuk kulit manggis yang digunakan
9. Hasil ekstraksi dimasukkan dalam botol plastik
10. Disimpan dalam freezer

(Nagulendran, 2007 dengan modifikasi laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya)

4.7.4 Penentuan kadar Mangostin dan Xanthon menggunakan HPLC

Penentuan dosis didasarkan pada kadar xanton dan alfa mangostin dalam ekstrak kulit manggis dan penghitungan kadar dilakukan dengan metode HPLC, dengan metode sebagai berikut :

a. Preparasi Larutan Standar Xanthone (Sigma aldrich)

(Satuan 1 ppm = 1 g/1000.000ml = 1mg/1000ml = 1mg/L = 1 µg/ml)

- (1) Stok xanthone 5 mg/10 ml (5 mg/10 ml = 5000 µg/10 ml = 500 µg/ml) dilarutkan menggunakan etanol absolut sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 1500 µg/ml

Perhitungan:

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$V_1 \cdot 500 \mu\text{g/ml} = 1000\text{ml} \cdot 1500 \mu\text{g/ml}$$

$$V_1 = 3000 \mu\text{g} = 3\text{mg}$$

- (2) Buat larutan baku 40 µg/ml, dan selanjutnya dibuat larutan baku 16,8,4,2,1 µg/ml

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$V_1 \cdot 1500 \mu\text{g/ml} = 1000 \text{ ml} \cdot 40 \mu\text{g/ml}$$

$$V_1 = 26,7 \mu\text{g}$$

- (3) Penyimpanan pada suhu 4°C dan sebelum digunakan harus dikondisikan disuhu ruang terlebih dahulu

b. Preparasi Larutan Standar Mangostin (Chromadex)

- (4) Stok mangostin 5000 µg/ml dilarutkan menggunakan etanol absolut sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 800 µg/ml

Perhitungan:

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$V_1 \cdot 5000 \mu\text{g/ml} = 1000 \text{ml} \cdot 800 \mu\text{g/ml}$$

$$V_1 = 160 \mu\text{g}$$

- (5) Buat larutan baku 400,200,100 dan 50 $\mu\text{g/ml}$
- (6) Penyimpanan pada suhu 4°C dan sebelum digunakan harus dikondisikan disuhu ruang terlebih dahulu

Fase gerak

Etanol (A): aquabidest dengan 3% Asam Asetat (B) = 95:5% (v/v)

Setting alat

Suhu : RT

Kolom : C_{18}

Detektor : UV ($\lambda=337 \text{ nm}$)

Laju aliran : 0,5 ml/menit

Volume injeksi : 20 μL

Validasi Metode

1. Linearitas

Dilakukan kalibrasi kurva terhadap larutan baku mangostin dan xanthone, kemudian dihasilkan besarnya regresi mendekati 1

2. Presisi

3. Akurasi

c. Penentuan mangostin pada Ekstrak Kulit Luar Manggis (EKM) dan Ekstrak Kulit Dalam Manggis (EDM)

- (1) Ekstrak kasar sebanyak 100 μ L diambil menggunakan pipet kedalam flask volumetri 10 ml dan ditambahkan etanol ad 10 ml
- (2) Larutan disaring menggunakan membran ukuran 0,45 μ m
- (3) Analisis kromatografi dilakukan pada suhu ruang dengan laju aliran 0,5 ml/menit dan eluasi dilakukan pada $\lambda=337$ nm dengan fase gerak etanol:aquabidest (95:5% v/v)

d. Hasil dalam bentuk chromatogram

e. Interpretasi data

1000 ppm=1 mg/ml \rightarrow Kadar 3,911 μ g/mg = 3,911 mg/g

Ct: xanthone 3,911 μ g/ml(1 mg=ml) = 3,911 μ g/mg = 3,911 mg/g

4.7.5 Pemberian ekstrak kulit *Garcinia mangostana* Linn pada Tikus

Ekstrak kulit manggis yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari limbah kulit manggis yang dibeli dari Lumajang. Dengan dosis 200mg/tikus/hari, 400 mg/tikus/hari, 800 mg/tikus/hari selama 8 minggu. Pemberian ekstrak kulit manggis dilakukan sore hari setelah pemberian pakan. Ekstrak kulit manggis dimasukkan dalam spuit 3ml sebanyak 1cc yang telah dipasang sonde, kemudian ujung sonde dimasukan per oral melalui langit-langit masuk ke faring lalu ke esofagus tikus, kemudian dorong hingga mencapai lambung. Dalam penelitian ini, berat badan tikus dianggap sama sehingga digunakan satuan mg/tikus/hari.

4.7.6 Pembedahan Tikus

Setelah dilakukan perlakuan selama 12 minggu, tikus dianestesi sebelum dibedah dengan cara memasukkan tikus kedalam stoples kaca atau wadah yang tertutup berisi kapas yang ditetesi eter, kemudian ditutup rapat dan ditunggu beberapa menit sampai tikus tidak sadarkan diri dan tidak merasa nyeri.

Tikus yang telah teranestesi diletakkan diatas alas papan dengan perut menghadap keatas dan terfiksasi dengan baik. Tikus ditempatkan pada alas suatu papan dengan menggunakan nald yang ditancapkan pada ke empat telapak kaki, jika perlu cukur bulu yang berada pada perut tikus yang akan dibedah. Dinding perut dibuka, dengan menggunakan pinset dan gunting secara hati-hati, dengan sayatan pada garis tengah dilanjutkan kesamping kiri dan kanan pada sisi atas dan bawah diaphragma dibuka.

Setelah itu darah diambil dari jantung dengan menggunakan spuit 10cc, dan kemudian darah disentrifuge selama 15 menit sebanyak 1000 g / 1600 rpm untuk memisahkan serum dengan supernatan. Bangkai tikus yang sudah tidak digunakan dikubur.

4.7.7 Pengukuran Kadar NO Serum Tikus

Pengukuran kadar NO menggunakan KIT : *Total NO /Nitrite/Nitrate Assay KGE 001 R&D system*. Test NO menggunakan ELISA dan pembacaan menggunakan *ELISA Reader*. KIT ini dapat mengukur total NO, nitrit endogen dan nitrat. Karena parameter yang digunakan pada penelitian ini adalah total NO, maka prosedur yang harus dilakukan adalah prosedur pengukuran reduksi nitrat. Hasil total NO didapatkan melalui konversi nitrat oleh enzim nitrat reduktase menjadi nitrit dan dari reaksi tersebut akan didapatkan total NO.

1. Pengumpulan sampel dan penyimpanan

Sampel yang diteliti adalah serum. Penyimpanan dan pengumpulan serum setelah pembedahan menggunakan *Serum separator tube* (SST). Serum di Sentrifugasi selama 15 menit sebanyak 1000 g / 1600 rpm untuk memisahkan serum dan supernatan. Serum disimpan pada suhu $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

2. Persiapan Sampel

Sampel harus disaring dan diencerkan sebelum pemeriksaan, agar tidak terlalu pekat, karena jika sampel terlalu pekat, *ELISA Reader* tidak dapat menerjemahkan hasil pembacaan.

3. Persiapan Reagen

Bawa semua reagen pada suhu ruangan sebelum digunakan. Gunakan air yang sudah dideionisasi atau distilasi ketika mendilusi reagen dan jangan sampai terkontaminasi dengan nitrit atau nitrat.

Reaction diluent berfungsi sebagai pengencer dari standart. Sebelum persiapan standard, nilai *Reaction diluent* yang akan digunakan ialah 1x, diencerkan terlebih dahulu dengan pelarutnya yaitu *Deionized Water* 1x dan dengan nilai *Reaction diluents* sebelum diencerkan 10x.

$$\frac{1}{10} \times 15.000 = 1500 \text{ mikroliter}$$

10

4. Persiapan Standard Nitrat

Lyophilized atau NADH reagent disiapkan dengan mencampur 5 ml *Deonized Water*, didiamkan selama 3 menit didalam botol gelap dan

tertutup aluminium foil. Kemudian ditempatkan diatas es. Lyophilized dipersiapkan 15 menit sebelum persiapan standard.

Standard dibuat tingkatan sejumlah 8 buah .standard diencerkan terlebih dahulu dan dibagi sesuai jumlah tersebut. Nilai kemolaritasan standard awal ialah 2000µmol/L, diencerkan dengan harapan molaritas sesudah diencerkan ialah 200µmol/L, dengan volume standard awal 1000µlit. Prinsip pengenceran menggunakan rumus Pengenceran dasar :

Keterangan :

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

M_1 = Molaritas awal standard sebelum pengenceran

M_2 = Molaritas akhir standard sesudah pengenceran

V_1 = Volume standard per eppendorph sebelum pengenceran

V_2 = Volume standard per eppendorph sesudah pengenceran

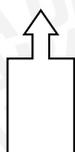
$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$2000 \mu\text{mol/L} \times 1000 \mu\text{lit} = 2000 \mu\text{mol/L} \times V_2$$

$$2000 \mu\text{mol/L} \times 1000 \mu\text{lit} = V_2$$

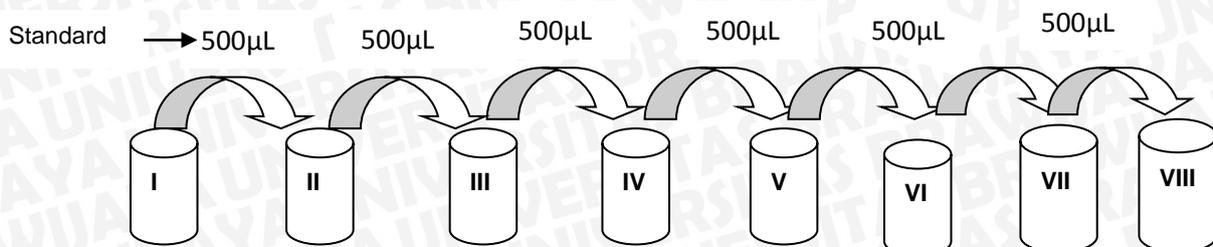
$$2000 \mu\text{mol/L}$$

$$100 \mu\text{lit} = V_2$$



Kemolaritasan standard = 2000 µmol/L

Gambar 4.1 Jumlah Kemolaritasan standard



Gambar 4.2 Pembagian standard

Keterangan :

Eppendorph I diberikan 100µlit standard dan 900µlit *Reaction diluent*. Dengan molaritas 200µmol/L.

Eppendorph II diberikan 500 µlit *Reaction diluent* dan 500µlit standard dari tabung I dengan molaritas setengah dari eppendorph I yaitu 100 µmol/L.

Eppendorph ke III diberikan 500µlit *Reaction diluent* dan 500 µlit standard dengan molaritas 50µmol/L.

Eppendorph ke IV diberikan 500 µlit *Reaction diluent* dan 500 µlit standard, dengan molaritas 25 µmol/L.

Eppendorph ke V diberikan 500µlit *Reaction diluent* dan 500µlit standard dengan molaritas 12,5 µmol/L.

Eppendorph ke VI diberikan 500µlit *Reaction diluent* dan 500 µlit standard dengan molaritas 6,25µmol/L.

Eppendorph ke VII diberikan 500µlit *Reaction diluents* dan 500µlit standard dengan molaritas 3,12 µmol/L.

Eppendorph ke VIII sebagai standard 0 , tidak ada kandungan dari standardnya, hanya *Reaction diluent* saja.

Jumlah standard dibuat ganda untuk dirata-rata.

5. Prosedur pengujian Nitrat

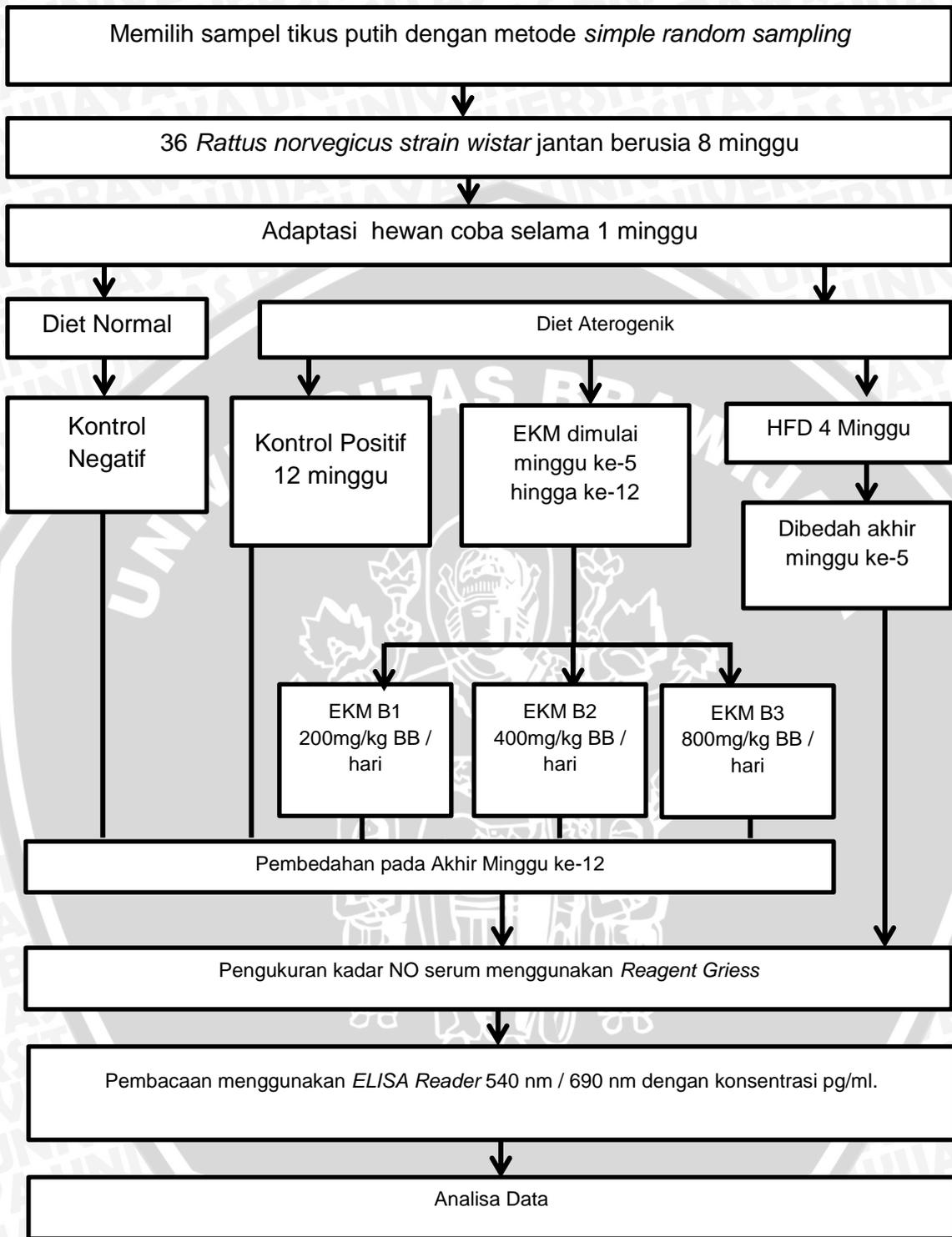
1. Semua reagen, standard yang digunakan dan sampel serum yang akan diukur disiapkan
2. Strip mikroplate dilepas dari *frame plate* dan simpan pada tas penyimpanan
3. Well disiapkan dengan jumlah sumur 8 kolom kebawah yang diwakilkan dengan abjad, dan sumur 12 baris kesamping yang diwakilkan dengan angka arab.
4. Sumur well A1 dikosongkan, sebagai blangko, sumur A1 diisi dengan *Deionized water* jika akan mulai pembacaan
5. Standard dari eppendorph I hingga VII dimasukan dari B1 hingga H1. B2 dan H2 dimasukan standard diplo
6. B3 dan sisa well yang lain dimasukan sampel .
7. *Reaction diluents* 1x sebanyak 50 ml dimasukan ke semua well
8. *Reagent Griess I* dimasukan ke semua well sebanyak 50 ml
9. *Reagent Griess II* dimasukan ke semua well sebanyak 50 ml
10. Inkubasi 30 menit suhu ruangan sekitar 37°C
11. Pembacaan di *ELISA Reader* 540 nm / 690 nm

6. Penghitungan Hasil

Setelah dibaca di *ELISA reader*, perlu dibuat kurva standard dengan mereduksi data menggunakan komputer untuk dapat mengetahui kadar total NO. Kurva standard dibuat dengan memasukan rata-rata absorbansi dari setiap standard pada aksis y dan pada aksis x masukan konsentrasi dan kemudian gambar dengan kurva yang sesuai berdasarkan grafik. Data berupa linear dengan memasukan log konsentrasi versus log optical

density (O.D) dan garis yang menghubungkan dapat dibuat dengan analisis regresi (lampiran).





Gambar 4.3 Alur Penelitian

4.8 Pengolahan dan Analisa Data

Pengolahan dan analisis data dibuat berdasarkan penghitungan kadar NO setelah pemberian ekstrak kulit manggis untuk tiap-tiap dosis sesuai waktu yang ditentukan.

Hasil penelitian dianalisis dan disajikan dalam bentuk tabel. Kemudian dianalisis dengan metode uji normalitas yang bertujuan untuk mengetahui data yang diperoleh dari setiap kelompok memiliki sebaran normal, jika sebaran data normal, maka dilanjutkan dengan uji ANOVA, jika tidak normal dilanjutkan dengan uji non parametrik. Setelah dilakukan uji normalitas, dilanjutkan dengan uji homogenitas varian yang bertujuan untuk menguji apakah data yang dimiliki dari setiap kelompok memiliki variasi data yang homogen, jika varian homogen analisa dilanjutkan dengan uji ANOVA, tetapi jika tidak homogen atau heterogen dilakukan uji non parametrik. Setelah uji normalitas dan uji homogenitas memenuhi syarat dilakukan uji ANOVA, maka dilanjutkan dengan uji One-way ANOVA yang bertujuan untuk membandingkan rata-rata nilai masing-masing kelompok, serta mengetahui terdapat minimal dua kelompok yang berbeda signifikan. Jika hasil analisis yang didapatkan tidak signifikan dilakukan uji alternatif yaitu uji kruskal Wallis. Kemudian dilanjutkan dengan uji Posthoc Tukey untuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang berbeda bermakna. Selanjutnya dilakukan uji korelasi Pearson untuk mengetahui keeratan hubungan antara variasi dosis ekstrak kulit manggis dengan peningkatan kadar NO pada tikus yang sudah dipapar diet aterogenik dengan waktu sesuai kelompok masing masing.