

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post-Test Only Control Group Design*.

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian diambil secara random dari populasi dengan kriteria sebagai berikut :

1. Tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan dan betina
2. Usia 6 minggu
3. Berat badan 150-200 gram (jantan) dan 100-150 (betina)
4. Kondisi fisik sehat
5. Bergerak aktif dan mau makan

Besar sampel ditentukan jumlah sampel tiap perlakuan (n) pada jumlah kelompok perlakuan (p), dihitung berdasarkan rumus Solimun (2001), dengan $p = 10$

$$p(n-1) \geq 15$$

$$pn - p \geq 15$$

$$10n \geq 25$$

$$n \geq 3$$

Didapatkan jumlah sampel hewan coba untuk tiap perlakuan adalah 3 ekor tikus. Untuk mengantisipasi apabila ada tikus yang mati saat masa adaptasi dan perlakuan maka tiap kelompok menjadi 5 ekor dan total tikus yang digunakan sebanyak 50 ekor.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juli sampai November 2013.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*) dosis:

1. Kontrol (K): kelompok kontrol (tikus yang tidak diberikan per oral ekstrak kulit manggis) diberikan per oral *aquadest*.
2. Perlakuan 1 (P₁): kelompok tikus yang diberikan per oral ekstrak kulit manggis dosis I (200 mg/kgBB)
3. Perlakuan 2 (P₂): kelompok tikus yang diberikan per oral ekstrak kulit manggis dosis II (400 mg/kgBB)
4. Perlakuan 3 (P₃): kelompok tikus yang diberikan per oral ekstrak kulit manggis dosis III (800 mg/kgBB)
5. Perlakuan 4 (P₄): kelompok tikus yang diberikan per oral ekstrak kulit manggis dosis IV (1600 mg/kgBB)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran sel hepar tikus Wistar.

Variabel terkendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar obyek penelitian selalu terkendali secara homogen. Variabel terkendali dalam penelitian ini sebagai berikut :

1. Jenis tikus
2. Umur tikus
3. Jenis kelamin tikus
4. Berat badan tikus
5. Pemberian pakan
6. Kondisi lingkungan kandang
7. Cara pemberian ekstrak (*Garcinia mangostana*)

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Hewan coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan dan betina berusia 6 minggu, ditempatkan dalam kandang yang berbeda.

4.5.2 Ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*)

Kulit manggis didapatkan dari perkebunan manggis di daerah Senduro, Lumajang, Jawa Timur. Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Jumlah dari ekstrak kulit manggis yang diberikan untuk perlakuan adalah 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, 800 mg/kgBB, 1600 mg/kgBB untuk perlakuan I, II, III, dan IV setiap harinya.

4.5.3 Gambaran sel hepar

Sel hepar adalah komponen struktural utama hepar yang tersusun secara radier membentuk lobulus hepar. Lempeng sel hepar ini tersusun dari perifer lobulus ke pusatnya yaitu vena sentralis (Junqueira, 2007). Sel hepar dalam lobulus hepar dapat menunjukkan gambaran sebagai berikut:

a) Normal:

Tampak sel berbentuk poligonal, sitoplasma berwarna merah homogen, dan dinding sel berbatas tegas.

b) Degenerasi parenkimatososa:

Bengkak, sitoplasma keruh karena terdapat endapan protein.

c) Degenerasi hidropik:

Bengkak, sitoplasma pucat, tampak vakuola berisi air pada sitoplasma sel maupun di sekeliling inti sel.

d) Nekrosis:

Tampak inti sel piknotik atau karioreksis atau kariolisis dan sitoplasma sel lebih padat. Sel mengerut, lebih bulat (Crawford, 2005).

4.6 Bahan dan Alat

4.6.1. Perawatan tikus :

Alat yang dibutuhkan untuk merawat tikus selama penelitian adalah kandang plastik berukuran 20 cm x 30 cm x 40 cm. Kandang diberi penutup yang terbuat dari kawat. Alat yang digunakan untuk memberi minum tikus adalah botol air dari bahan plastik. Dalam

perawatan tempat tinggal tikus diberi sekam dan diganti secara berkala.

4.6.2. Pembuatan ransum makanan diet normal

Alat yang digunakan untuk membuat ransum makanan diet normal terdiri dari: timbangan, baskom, pengaduk, gelas ukur, dan nampan. Bahan yang digunakan untuk membuat ransum tersebut adalah buras dan tepung dengan komposisi 3 : 1 serta ditambahkan aquades untuk mencampur bahan-bahan tersebut.

4.6.3. Pembuatan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*)

Beberapa alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak kulit manggis adalah oven, blender, timbangan, gelas erlenmeyer, labu evaporasi, evaporator, *water bath*, rotary evaporator, labu penampung, corong gelas, kertas saring, botol plastik atau kaca, dan *freezer*.

Pembuatan ekstrak kulit manggis membutuhkan bahan-bahan sebagai berikut: kulit manggis (*Garcinia mangostana*), air, aquades, dan etanol 96%.

4.6.4. Pembedahan tikus

Peralatan yang digunakan dalam proses pembedahan tikus sebagai berikut: gunting bedah, alas bedah, pinset 2 buah, kapas, dan jarum pentul 2 set.

Beberapa bahan yang disiapkan untuk proses pembedahan tikus adalah kloroform atau eter, formalin 10%, botol organ 50 buah.

4.6.5. Pembuatan Preparat Histopatologi Hepar

Alat yang digunakan untuk pembuatan sediaan histopatologi hepar diantaranya: botol organ, mikrotom, slide kaca, *cover glass*, kertas filter, label.

Bahan untuk pembuatan sediaan diantaranya: formalin 10%, alkohol 70%, 80%, 96%, absolute, *xylol*, parafin cair, bahan pengecatan HE, *propylene glycol* 85%, 100%, *Oil Red O* 0,5% *propylene glycol*, aquades steril, *Mayer's Hematoxylin*, gelatin jelly 10%.

4.6.6. Penilaian Gambaran Sel Hepar

Alat untuk menilai gambaran sel hepar adalah mikroskop *scan dot slide* dan program komputer *Olyvia*. Bahan untuk menilai gambaran sel hepar adalah slide preparat hepar.

4.6.7. Analisa Data

Alat untuk menganalisa hasil evaluasi gambaran sel hepar adalah *Software Statistical Product and Service Solution (SPSS) 16.0 for windows*. Bahan untuk menganalisa data adalah hasil perhitungan rerata gambaran sel hepar.

4.7 Metode Pengumpulan Data

4.7.1 Adaptasi

Selama proses adaptasi, semua tikus diberi pakan normal dengan komposisi buras dan tepung. Tikus dibiarkan beradaptasi selama 2-3 minggu sebelum waktu penelitian dimulai.

4.7.2 Pembuatan Ransum Makanan Diet normal

Pembuatan diet atau pakan normal dilakukan setiap hari. Kebutuhan makanan disesuaikan dengan kebutuhan tikus dewasa per ekor. Komposisi diet normal terdiri dari buras dan tepung dengan rasio 3 : 1. Diet normal diberikan selama 14 minggu.

4.7.3 Pembuatan Ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*) menggunakan etanol

1. Proses Pengeringan

Diawali dengan mencuci bersih bahan alam (sampel basah) kulit manggis yang akan dikeringkan. Kemudian sampel tersebut dipotong kecil-kecil. Selanjutnya dioven dengan suhu 80°C atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air) (Wijaya, 2010).

2. Proses Ekstraksi

Setelah kering, kulit manggis dihaluskan dengan blender sampai halus. Sampel kering ditimbang sebanyak 100 gram. Kemudian memasukkan 100 gram sampel tersebut ke dalam gelas erlemeyer ukuran 1 liter. Selanjutnya direndam dengan etanol 96% sampai volume 1000 mL. Kocok sampai benar-benar tercampur (kurang lebih 30 menit). Campuran tersebut didiamkan satu malam sampai mengendap (Wijaya, 2010).

3. Proses Evaporasi

Ambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif yang sudah terambil. Campuran tersebut dimasukkan dalam labu

evaporasi 1 liter. Langkah selanjutnya memasang labu evaporasi pada evaporator dan mengisi *water bath* dengan air sampai penuh. Semua rangkaian alat dipasang, termasuk rotary evaporator, pemanas *water bath* (atur sampai 90°C), dan sambungkan dengan aliran listrik. Larutan etanol dibiarkan agar memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu. Tunggu sampai aliran etanol 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. Kemudian hasil ekstraksi dimasukkan dalam botol plastik atau kaca. Langkah terakhir hasil ekstraksi disimpan dalam *freezer* (Wijaya, 2010).

4.7.4 Pembedahan Tikus

Pembedahan dilakukan dengan anastesi terlebih dahulu dengan cara memasukkan tikus ke dalam stoples kaca (wadah yang tertutup) berisi kapas yang ditetesi eter, kemudian ditutup rapat dan ditunggu beberapa menit sampai tikus tidak sadarkan diri dan tidak merasakan nyeri.

Tikus yang telah teranastesi diletakkan di atas alas papan dengan perut menghadap ke atas (terfiksasi dengan baik). Tikus ditempatkan pada alas suatu papan dengan menggunakan *nald* yang ditancapkan pada ke empat telapak kaki. Dinding perut dibuka dengan menggunakan pinset dan gunting secara hati-hati.

Setelah darah diambil, dilakukan pengangkatan organ hepar yang kemudian dimasukkan ke dalam botol yang berisi larutan

fiksatif buffer formalin 10%, lalu direndam selama 12-24 jam. Organ siap dikirim untuk pemrosesan menjadi preparat di Laboratorium Patologi Anatomi. Bangkai tikus yang sudah tidak digunakan dikubur.

4.7.5 Pembuatan Preparat Histopatologi Hepar

Hepar hasil dari pembedahan yang segera difiksasi dengan fiksatif buffer formalin 10% dalam botol organ siap untuk dibuat preparat histologi. Setelah fikasis selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan akuades selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksatif. Potongan hepar dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat. Jaringan menjadi lebih jernih dan transparan. Jaringan kemudian dimasukkan dalam larutan alkohol-*xylol* selama 1 jam dan kemudian larutan *xylol* murni selama 2x2 jam. Selanjutnya jaringan dimasukkan dalam oarafin cair selama 2x2 jam. Pada proses *embedding* jaringan ditaman dalam parafin padat dengan suhu 56-58°C, ditunggu sampai parafin padat. Jaringan dalam parafin dipotong setebal 4 mikron dengan mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca obyek yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyek dipanaskan dalam inkubator suhu 56-58°C sampai parafin mencair.

Langkah pertama preparat organ hasil dari potong beku disiapkan. Kemudian teteskan propylene glycol 100% pada preparat. Setelah ditunggu selama 15 menit kemudian tetesi dengan Oil Red O 0,5% dan inkubasi lagi selama 1 jam. Selanjutnya tetesi kembali propylene glycol 85% dan lakukan

kembali inkubasi selama 5 menit, ulangi langkah ini tiga kali. Cuci preparat dengan aquades steril dan inkubasi selama 5 menit, ulangi langkah ini tiga kali. Teteskan Mayer's Hematoxylin dan inkubasi selama 5 menit. Cuci preparat dengan tap water kemudian biarkan selama 5 menit, ulangi langkah ini tiga kali. Kemudian biarkan preparat kering kurang lebih 30 hingga 60 menit. Tutup preparat dengan menggunakan gelatin jelly 10% (Utami, 2008).

4.7.6 Penilaian Gambaran Sel Hepar

Preparat organ hepar *discan* menggunakan mikroskop *scan dot slide*. Kemudian diamati gambaran sel hepar pada komputer (PC) dengan *software OlyVia* perbesaran 400x dalam lima lapang pandang dengan jumlah sel yang diamati adalah 100 sel per lapang pandang. Sasaran yang diamati adalah gambaran sel hepar yang ada di sekitar vena centralis. Lapang pandang yang dijadikan sasaran adalah sel-sel yang memiliki morfologi mirip. Pengamatan sel hepar dilakukan memutar vena sentralis searah jarum jam hingga didapatkan jumlah 100 sel hepar, dengan kriteria *Manja Roenigk* sebagaimana ditampilkan pada Tabel 4.1 (Setyowati, 2010).

Tabel 4.1. Kriteria penilaian gambaran sel hepar (Maretnowati *et al*, 2005)

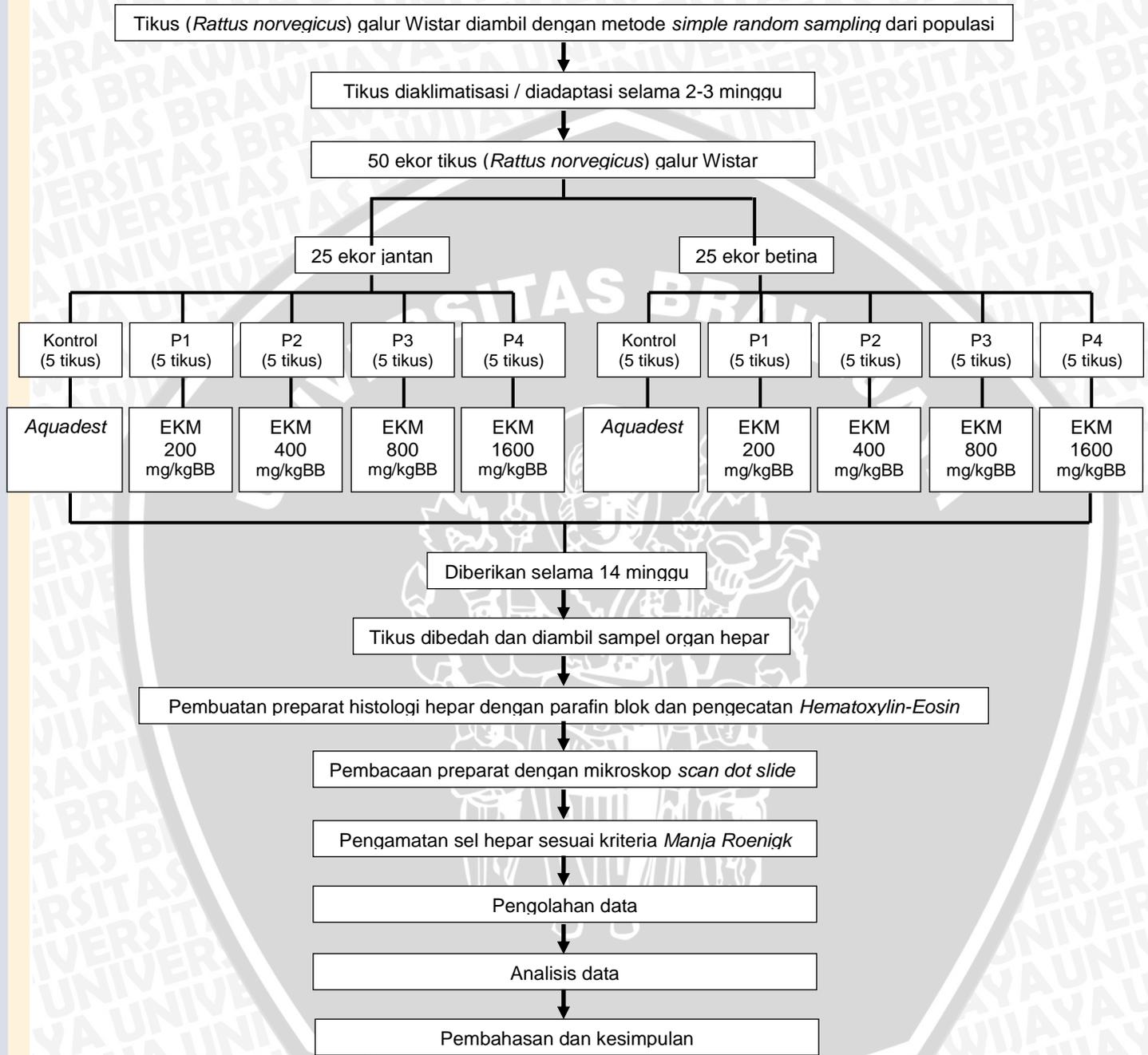
No.	Tingkat Perubahan
1.	Normal
2.	Degenerasi Parenkimatosa
3.	Degenerasi Hidropik
4.	Nekrosis

Dari data yang didapat dihitung rerata gambaran sel hepar setiap kriteria dari lima lapang pandang pada masing-masing preparat yang mewakili setiap ekor tikus (Amalina, 2009).

4.8 Pengolahan Data

Data yang diperoleh dari semua kelompok diolah dengan program komputer *Software Statistical Product and Service Solution (SPSS) 16.0 for windows*. Langkah pertama menilai sebaran distribusi menggunakan uji *Saphiro-Wilk*, didapatkan distribusi data tidak signifikan ($p < 0,05$) sehingga tidak bisa menggunakan uji komparasi parametrik. Selanjutnya dilakukan uji komparasi non-prametrik yaitu *Kruskal-Wallis* bertujuan mengetahui adanya perbedaan signifikan minimal antar dua kelompok hewan coba. Setelah didapatkan hasil signifikan dalam uji komparasi, dilanjutkan uji *Post Hoc* yaitu *Mann Whitney* bertujuan mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan (Dahlan, 2011).

4.9 Alur Penelitian



Keterangan:

1. EKM : Ekstrak Kulit Manggis

Gambar 4.1 Alur Penelitian

