BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan 24 ekor hewan model *Rattus Novergicus Strain Wistar* berumur 2 bulan, dengan berat badan sekitar 150 – 200 gram) yang terbagi dalam 6 (enam) kelompok perlakuan. Besar sampel ditentukan dari jumlah sampel tiap perlakuan (n) pada jumlah kelompok perlakuan (p), dihitung berdasarkan rumus Solimun (2001).

p = 6

p (n – 1) ≥ 15

pn – p ≥ 15

6n ≥ 21

n ≥ 3.5 ≈ 4

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

Penelitian ini meliputi empat kelompok perlakuan dan dua kontrol, yaitu :

1. Kelompok kontrol negatif (KN)

Tikus yang terdapat di kelompok ini diberi pakan normal tanpa diinjeksi dichlorvos 2mg/kgBB/hr, ekstrak kulit manggis maupun xanthone.

2. Kelompok kontrol positif (KP)

   Tikus dipapar dichlorvos dengan dosis 2mg/kgBB/hr selama 21 hari yang diberikan melalui injeksi subkutan. Tikus diberi pakan normal, yang sama dengan kelompok kontrol negatif.

3. Kelompok xanthone 70mg

   Tikus dipapar dichlorvos dengan dosis 2mg/kgBB/hr yang diberikan melalui injeksi subkutan dan diberi xanthone dengan dosis 70mg/kgBB/hr melalui sonde, selama 21 hari. Tikus diberi pakan normal, yang sama dengan kelompok kontrol negatif.

4. Kelompok xanthone dosis 140mg

   Tikus dipapar dichlorvos dengan dosis 2mg/kgBB/hr yang diberikan melalui injeksi subkutan dan diberi xanthone dengan dosis 140mg/kgBB/hr melalui sonde, selama 21 hari. Tikus diberi pakan normal, yang sama dengan kelompok kontrol negatif.

5. Kelompok EKM (Ekstrak Kulit Manggis) 800mg

   Tikus dipapar dichlorvos dengan dosis 2mg/kgBB/hr yang diberikan melalui injeksi subkutan dan diberi EKM dosis 800mg/kgBB/hr melalui sonde, selama 21 hari. Tikus diberi pakan normal, yang sama dengan kelompok kontrol negatif.

6. Kelompok EKM 1200mg

   Tikus dipapar dichlorvos dengan dosis 2mg/kgBB/hr yang diberikan melalui injeksi subkutan dan diberi EKM dosis 1200mg/kgBB/hr melalui sonde,

selama 21 hari. Tikus diberi pakan normal, yang sama dengan kelompok kontrol negatif.

Cara pelabelan tikus dilakukan dengan metode *Simple Random Sampling* (SRS). SRS merupakan teknik pengambilan sampel probabilistik yang paling sederhana dimana satuan pengamatan mempunyai peluang yang sama untuk terpilih ke dalam sampel.

4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada tanggal 29 Maret -29 April 2013. Ekstrak kulit manggis (EKM) yang dipergunakan dalam penelitian ini diperoleh dari proses ekstraksi yang dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUB. Dibutuhkan 1 kg kulit manggis yang didatangkan dari Lumajang untuk menghasilkan 250g ekstrak kulit manggis. Penggunaan kulit manggis asal Lumajang didasarkan pada galur tanaman yang jelas dan sudah tersertifikasi. Pemeliharaan, pembedahan hewan coba, hingga analisis kadar AChE menggunakan metode ELISA dilakukan di Laboratorium Fisiologi (FAAL) FKUB.

4.3. Variabel Penelitian

Varibel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat, yaitu:

a) Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis dichlorvos (2mg/kgBB/hr) yang diberikan pada kelompok KP, EKM 800mg, EKM 1200mg, Xanthone 70mg dan Xanthone 140mg; dosis EKM dan xanthone yang dibagi sesuai kelompoknya.
b) Variabel terikatnya adalah kadar AChE dalam serum darah tikus dan terjadinya tremot otot tikus yang diamati setiap hari.

4.4. Definisi Operasional

1. *True experimental-post test only control group design* adalah jenis rancangan penelitian, dimana dalam penelitian tersebut 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. Penelitian ini menggunakan 24 ekor hewan model *Rattus Novergicus Strain Wistar* berumur 2 bulan, dengan berat badan sekitar 150 – 200 gram. Sebelum perlakuan dimulai, seluruh hewan coba diaklimatisasi selama 1 minggu tanpa diberi perlakuan khusus. Hewan coba hanya diberi pakan normal dan dibiarkan beradaptasi sampai waktu penelitian dimulai.

5. Intoksikasi *dichlorvos* dapat diketahui melalui penurunan kadar AChE dalam serum darah tikus. Mekanisme toksisitas dichlorvos adalah dengan menghambat asetilkolinesterase saraf. Jika asetilkolinesterase dihambat, asetilkolin terakumulasi di celah sinaps dan dapat mengganggu fungsi neuron.
6. Dosis efektif EKM dan xanthone sebagai profilaksis intoksikasi dichlorvos melalui mekanisme reduksi akumulasi dichlorvos, dapat diketahui dari kadar AChE dalam serum darah tikus yang diberi dipapar dichlorvos dan diberi xanthone atau EKM dengan dosis yang berbeda secara bersamaan selama 21 hari.
7. Efek farmakologi xanthone dan ekstrak kulit manggis dapat diketahui melalui kadar AChE yang diukur menggunakan metode *sandwich* ELISA atau ELISA tidak langsung.
8. Secara toksikologis pemaparan pada hewan percobaan terhadap bahan kimia dibagi menjadi empat kategori yaitu akut, subakut, subkronik dan kronik. Pemaparan akut didefinisikan sebgai 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.

4.5. 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. 24 hewan coba masing-masing mendapat 1 kandang.

b) Perlakuan Setiap Hari

Alat : Spuit 5cc 1 kotak, alat sonde, sarung tangan dan masker

Bahan : Dichlorvos 2mg/kgBB, xanthone 70 mg/kgBB, xanthone 140 mg/kgBB, EKM 800mg/kgBB dan EKM 1200mg/kgBB.

c) Pembuatan Ransum Makanan Diet Normal

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

Bahan : PARS 57,3%, tepung terigu 33,4% dan air

d) 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

Cara pembuatan ekstrak kulit manggis:

1. Proses pengeringan
   - Cuci bersih kulit manggis (sample basah) yang akan dikeringkan
   - Potong kecil-kecil
   - Lalu oven dengan suhu 80^0 C atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air)
2. Proses ekstraksi
   - 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 1000ml
   - Kocok sampai benar-benar tercampur (kurang lebih 30 menit)
   - Didiamkan 1 malam sampai mengendap
3. Proses evaporasi
   - Ambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif yang sudah terambil
   - Masukkan dalam labu evaporasi 1 liter
   - Pasang labu evaporasi pada evaporator
   - Isi *water bath* dengan air sampai penuh

- Pasang semua rangkaian alat, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (atur sampai 90^0 C), sambungkan dengan aliran listrik
- Biarkan larutan etanol 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
- Masukkan hasil ekstraksi dalam botol plastik atau kaca
- Simpan dalam *freezer*.

e) Pembedahan Hewan Coba

Alat : Gunting bedah, steroform 2, pinset 2, kapas, jarum pentul 2 set, sarung tangan dan masker.

Bahan : Ketamin, Parafin, Alkohol 70%, spuit 5cc 1 kotak.

f) Pemeriksaan kadar AChE dengan metode ELISA (BT Lab, Gwang-dong, South Korea)

Alat : Pipet tetes dengan ukuran µL, sarung tangan, masker, *vortex*, lemari es, *microelisa stripplate 12well×8strips*, *closure plate membrane* 2 lembar, dan *sealed bags* 1 buah.

Bahan : *wash solution* 20ml×1botol, *stop solution* 6ml×1 botol, *HRP-Conjugate reagent* 6ml×1 botol, *standard* (800nmol/L) 0.5ml×1 botol, *standard diluent* 1.5ml×1botol, *sample diluent* 6ml×1 botol, *chromogen solution* A 6ml×1 botol, *chromogen solution* B 6ml×1 botol.

4.6. Metode Pengumpulan Data

Data yang dibutuhkan adalah gejala tremor otot yang dialami oleh tikus dan kadar AChE dalam serum darah tikus. Data mengenai gejala tremor otot diperoleh melalui observasi aktivitas tikus setiap harinya selama 21 hari. Sedangkan data mengenai kadar AChE diperoleh setelah serum darah tikus yang diambil, dianalisis dengan menggunakan metode *sandwich* ELISA.

Langkah yang dikerjakan adalah:

1. Persiapan pembedahan
    a) Pengkondisian tikus (pemindahan dari kandang ke laboratorium)
    b) Pelabelan spuit yang akan digunakan untuk mengambil darah tikus
    c) Menyiapkan bahan untuk anestesi tikus dengan ketamin
    d) Mempersiapkan paraffin blok (papan bedah)
    e) Menyiapkan peralatan bedah seperti gunting bedah (lurus panjang, lurus pendek dan bengkok), pinset, gelas arloji, cawan petri, pins, beker glas dan kertas saring.

2. Pembedahan
    a) Pembedahan tikus dilakukan dengan cara dibius dengan menginjeksi Ketamin 50mg/kgBB secara subkutan. Setelah tikus tidak sadar, tikus diposisikan pada papan bedah menggunakan *pins*. Dibedah mulai dari bagian perut menggunakan gunting

bengkok. Kemudian dilakukan pengambilan sampel darah dari AORTA tikus menggunakan spuit 5cc.

b) 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.

3. Persiapan Metode *sandwich* ELISA

a) Sampel darah sebanyak 5cc disentrifugasi (3000rpm) selama 10 menit sebanyak 2 kali.

b) Penyimpanan serum darah pada suhu -20^{o}C selama sehari semalam di laboratorium Fisiologi FKUB.

c) Ketika serum darah akan dipergunakan untuk tes ELISA, serum darah dikeluarkan dalam suhu ruangan selama 30 menit agar mencair.

d) Kemudian setelah serum darah mencair, serum darah divortex (10 rpm x 100) supaya tercampur rata.

4. Metode ELISA

Metode ELISA yang digunakan dalam penelitian ini adalah *sandwich* ELISA atau ELISA tidak langsung. *Sandwich* ELISA mengukur

jumlah antigen antara dua lapisan antibodi (yaitu penangkapan dan deteksi antibodi). Antigen yang akan diukur harus mengandung setidaknya dua lokasi antigenik yang mampu berikatan dengan antibodi, karena setidaknya terdapat dua antibodi yang bertindak pada *sandwich*. Baik antibodi monoklonal atau poliklonal dapat digunakan sebagai penangkap dan deteksi antibodi pada *sandwich* ELISA. Antibodi monoklonal mengenali epitop tunggal yang memungkinkan deteksi yang baik dan kuantifikasi perbedaan yang kecil di antigen. Antibodi poliklonal sering digunakan sebagai antibodi penangkap untuk menarik sebanyak mungkin antigen. Keuntungan dari *sandwich* ELISA adalah bahwa sampel tidak harus dimurnikan sebelum analisis, dan uji dapat sangat sensitif (hingga 2 sampai 5 kali lebih sensitif daripada langsung atau tidak langsung) (Abcam, 2013). Prosedur ELISA secara lengkap dapat dilihat di lampiran.

1) Encerkan dan tambahkan sampel : Encerkan *standard* dengan densitas asli menurut tabel berikut:

Tabel 4.1. Pembuatan Sampel sesuai Metode ELISA

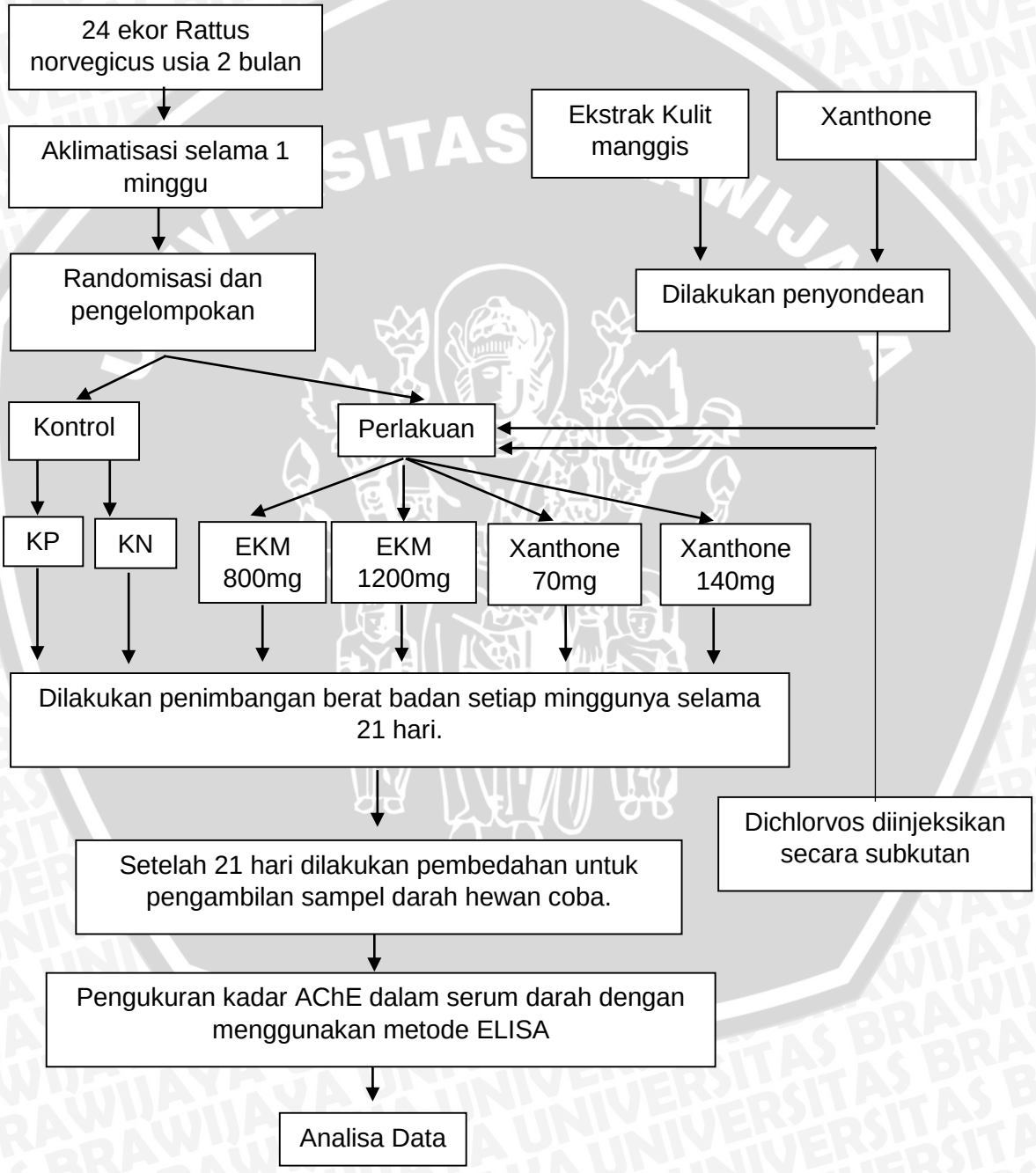
400nmol/L	5 *Standard*	150µl *Standard* dengan densitas asli + 150 ml pengencer *Standard.*
200nmol / L	4 *Standard*	150µl 5 *Standard* + 150 ml pengencer *Standard.*
100nmol / L	3 *Standard*	150µl 4 *Standard* + 150 ml pengencer *Standard.*
50nmol / L	2 *Standard*	150µl 3 *Standard* + 150 ml pengencer *Standard.*

25nmol / L	1 *Standard*	150µl 2 *Standard* + 150 ml pengencer *Standard.*

2) Tambahkan sampel: Set sumur kosong secara terpisah (pada sumur kosong untuk pembanding tidak ditambahkan sampel dan reagen HRP - *Conjugate*, langkah lain juga sama). Uji sampel dengan baik. Tambahkan pengencer sampel 40µl untuk menguji sumur, kemudian tambahkan sampel penguji 10µl (pengenceran akhir sampel 5 kali lipat), tambahkan sampel ke dalam sumur, jangan sampai menyentuh dinding, lalu campurkan perlahan.
3) Inkubasi: Setelah menutup piring dengan membran penutup, inkubasikan sampel selama 30 menit pada 37°C
4) Cairan konfigurasi: larutan pencuci diencerkan 30 kali lipat (atau 20 kali lipat) dengan air hasil sulingan dan simpan.
5) Pencucian: buka membran penutup, buang cairan di dalamnya, keringkan dengan cara diayunkan, lalu tambahkan larutan buffer pencuci pada setiap sumur, kemudian tiriskan. Ulangi sebanyak 5 kali, kering dengan menaruh tisu diatasnya.
6) Tambahkan enzim: Tambahkan 50µl reagen HRP - *Conjugate* pada masing-masing sumur, kecuali pada sumur yang kosong.
7) Inkubasi: Sama dengan langkah ke-3.
8) Pencucian: Sama dengan langkah ke-5.
9) Pewarnaan : Tambahkan *Chromogen Solution* 50ul dan *Chromogen Solution* B 50ul pada masing-masing sumur, hindari cahaya selama 10 menit pada 37°C
10) Penghentian reaksi : Tambahkan Stop Solution 50µl pada masing-masing sumur, lalu hentikan reaksi (ketika warna biru berubah menjadi warna kuning).

11) Pengujian : gunakan sumur kosong sebagai patokan nilai 0. Baca absorbansi pada 450nm setelah menambahkan *Stop Solution* dalam 15 menit .

4.7. Diagram Alur Kerja



Keterangan :

KN : Kontrol negatif, tidak diberi *dichlorvos*, EKM, dan xanthone

KP : Kontrol positif, diinjeksi *dichlorvos* 2mg/kgBB secara subkutan selama 21 hari.

EKM 800mg : Diinjeksi *dichlorvos* 2mg/kgBB secara subkutan dan diberi EKM dosis 800mg/kgBB selama 21 hari.

EKM 1200mg : Diinjeksi *dichlorvos* 2mg/kgBB secara subkutan dan diberi EKM dosis 1200mg/kgBB selama 21 hari.

Xanthone 70mg : Diinjeksi *dichlorvos* 2mg/kgBB secara subkutan dan diberi xanthone dengan dosis 70mg/kgBB selama 21 hari.

Xanthone 140mg : Diinjeksi *dichlorvos* 2mg/kgBB secara subkutan dan diberi xanthone dengan dosis 140mg/kgBB selama 21 hari.

4.8. Pengolahan Data

Pengolahan data dilakukan setelah data kadar AChE terkumpul. Data yang terkumpul akan melalui proses editing dan verifikasi. Selanjutnya data disusun dalam tabel untuk memudahkan analisis. Selanjutnya data tersebut dimasukkan dalam “data entry” pada program *SPSS Statistic 17.0 for Windows.*

4.9. Analisis Data

Hasil perhitungan kadar AChE dianalisa secara statistik menggunakan program *Software Statistical Product and Service Solution (SPSS) for Windows* versi 17.0 dengan tingkat signifikasi 0.05 (p = 0.05) dan selang kepercayaan 95 %

(α = 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* LSD: bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Uji *Post Hoc* yang digunakan memiliki tingkat signifikasi 95 % ($p<0,05$).
e. Uji Korelasi *Pearson* : bertujuan untuk mengukur kekuatan hubungan dua variabel atau lebih yang berskala interval (parametrik).