

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* yaitu metode dengan membandingkan hasil kontrol positif dan kontrol negatif dan pengujiannya dilakukan setelah intervensi diberikan, yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana L.*) terhadap kadar MDA (*Malonyldialdehid*) serum pada tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan yang diberi diet aterogenik.

4.2 Sampel**4.2.1 Pemilihan Sampel****Kriteria Inklusi**

1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar berusia 8 – 10 minggu
2. Tikus jantan
3. Dalam kondisi sehat (aktif, tidak cacat)

4.2.2 Jumlah Sampel

Perhitungan besarnya pengulangan sampel adalah (Anshori, 2008):

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

t : jumlah perlakuan, r : jumlah ulangan

Pada penelitian ini $t = 9$ sehingga jumlah pengulangan adalah:

$$(9 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$8 (r - 1) \geq 15$$

$$8r - 8 \geq 15$$

$$8r \geq 23$$

$$r \geq 23/8 = 2,875$$

mengalami pembulatan menjadi 3 kali pengulangan

Jumlah sampel yang digunakan untuk penelitian ini adalah 54 ekor, yang dibagi ke dalam 9 kelompok, yaitu:

Kelompok perlakuan	Kode	Pakan		Ekstrak kulit manggis	
		Jenis	Lama Pemberian	Dosis	Lama pemberian
Normal Diet	ND	Pakan normal	12 minggu	-	-
<i>High fat diet</i> 4 minggu	HFD 4 minggu	Diet tinggi lemak	4 minggu	-	-
<i>High fat diet</i> 12 minggu	HFD 12 minggu	Diet tinggi lemak	12 minggu	-	-
Ekstrak Kulit Manggis A1	EKM A1	Diet tinggi lemak	12 minggu	200 mg/ kg BB/hari	12 minggu
Ekstrak Kulit Manggis A2	EKM A2	Diet tinggi lemak	12 minggu	400 mg/kg BB/hari	12 minggu
Ekstrak Kulit Manggis A3	EKM A3	Diet tinggi lemak	12 minggu	800 mg/kg BB/hari	12 minggu
Ekstrak Kulit Manggis B1	EKM B1	Diet tinggi lemak	12 minggu	200 mg/ kg BB/hari	8 minggu*
Ekstrak Kulit Manggis B2	EKM B2	Diet tinggi lemak	12 minggu	400 mg/kg BB/hari	8 minggu*
Ekstrak Kulit Manggis B3	EKM B3	Diet tinggi lemak	12 minggu	800 mg/kg BB/hari	8 minggu*

*Pemberian ekstrak kulit manggis dimulai sejak minggu ke-5 pemberian diet

tinggi lemak

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Independen

Variabel independen dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit manggis dengan dosis 200 mg/kg BB/hari, 400 mg/kg BB/hari, dan 800 mg/kg BB/hari. Dosis tersebut ditentukan dengan melihat penelitian yang sebelumnya pernah dilaksanakan oleh Wantana dan Chatchai pada tahun 2008 (Reanmongkol, 2008)

4.3.2 Variabel Dependen

Kadar MDA serum darah tikus *Rattus norvegicus* galur wistar.

4.3.3 Variabel Luar

1. Jenis kelamin tikus
2. Faktor lingkungan laboratorium di mana tikus di tempatkan dan dilakukan pengukuran kadar *malonyldialdehyde* (MDA) serum darah tikus *Rattus norvegicus* galur wistar.

4.4 Waktu dan Lokasi Penelitian

4.4.1 Tempat Penelitian

Pemeliharaan hewan coba dan pengujian variabel penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembacaan variabel penelitian dilaksanakan di Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei - September 2013.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

Bahan – bahan yang digunakan:

1. Bahan makanan tikus normal terdiri dari PARS, tepung terigu dan air dengan total energi 104,6 Kal diberikan sebanyak 40 gram per tikus per hari
2. Bahan makanan tikus tinggi lemak terdiri dari pakan normal ditambah kolesterol 2 % (kuning telur bebek), asam kolat 0,2 % dan minyak babi 5 %. Diberikan 40 gram per tikus per hari.
3. Kulit manggis yang telah diekstraksi
4. Air untuk minum tikus
5. Bahan untuk pembedahan tikus: kloroform 20 ml, alkohol,
6. Bahan pemeriksaan kadar MDA serum : serum darah tikus dan spektrofotometer kit unit, TCA 100%, HCL 1 N, aquabides 0,5 cc, Na – thio 1%.

4.5.2 Alat/instrumen penelitian

1. Alat pembuatan pakan hewan coba: timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, nampan, kompor listrik, dan panci.
2. Alat untuk membuat ekstrak kulit manggis:
 1. Oven
 2. Timbangan (1)
 3. Gelas Erlemeyer (2)
 4. Corong Gelas (1)
 5. Labu Evaporator (1)
 6. Labu penampung etanol (1)

7. Evaporator (1)
8. Pendingin spiral/rotary evaporator (1)
9. Selang water pump (1)
10. Water pump
11. Water bath
12. Vakum pump (1)
3. Alat perawatan tikus: Bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm sebanyak 54 buah, tutup kandang terbuat dari anyaman kawat sebanyak 54 buah, botol air sebanyak 54 buah, sekam 10 karung, dan timbangan berat badan dengan neraca Sartorius.
4. Alat untuk pemberian ekstrak kulit manggis: Sonde
5. Alat untuk pembedahan tikus: Gunting bedah 2, Pinset 2, Jarum pentul 2 set, steroform, kapas
6. Alat untuk mengambil sampel: spuit 10cc, vacotenner, kapas
7. Alat untuk pengukuran kadar MDA serum: multichannel pipet, mikropipet, tube, sentrifuge, termos, spektrofotometer

4.6 Definisi istilah/operasional

Definisi operasional dari penelitian ini adalah:

- a. Diet tinggi lemak (HFD) dibuat dari dan pars 92%, kolesterol 2 %, asam kolat 0,2%, dan minyak babi 5 % (Murwani, 2006).
- b. Ekstrak kulit manggis (EKM) diperoleh dari kulit manggis yang diambil dari Lumajang. Ekstraksi dilakukan pada kulit buah manggis yang telah dikeringkan dengan menggunakan metode ekstraksi menggunakan etanol 96%.

- c. Pengukuran MDA serum menggunakan metode tes TBARS (Thiobarbituric acid-reactive substance). Dasar pemeriksaan adalah dimana satu molekul MDA akan terpecah menjadi 2 molekul 2-asam thiobarbiturat. Reaksi ini berjalan pada pH 2-3. TBA akan memberikan warna pink-chromogen yang dapat diperiksa secara spektrofotometri (Orrego, 2009). Satuan dari kadar MDA adalah $\mu\text{M/ml}$.

4.7 Metode Pengumpulan Data

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Kulit Manggis

Cara pembuatan ekstrak bahan alam (kulit manggis):

1. Proses pengeringan
 - Cuci bersih bahan alam (sample basah) yang akan dikeringkan
 - Potong kecil-kecil
 - Lalu oven dengan suhu 80°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° 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 plastic atau kaca
- Simpan dalam freezer

4.7.2 Penentuan Dosis Ekstrak Kulit Manggis

Penentuan dosis didasarkan pada kadar xanton dan alfa mangostin dalam ekstrak kulit manggis. Penghitungan kadar dilakukan dengan metode HPLC, yaitu:

- 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 µg/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 : C₁₈

Detektor : UV (λ=337 nm)

Laju aliran : 0,5 ml/menit

Volume injeksi: 20 μ L

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 (dilampirkan)

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

4.7.3 Proses perlakuan pada tikus percobaan

1. Tikus diletakkan dalam kandang, ditimbang berat badannya, dan diukur umurnya.

2. Tikus *Rattus norvegicus* galur wistar dikelompokkan kedalam delapan kelompok berbeda dengan metode simple random sampling, dimana masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus. Kesembilan kelompok tersebut antara lain Normal Diet (kontrol negatif), *High fat diet* (HFD) 4 minggu, HFD 12 minggu (kontrol positif), Ekstrak kulit manggis (EKM) A1, EKM A2, EKM A3, EKM B1, EKM B2, dan EKM B3. Kelompok EKM sebagai kelompok dengan perlakuan terapi ekstrak kulit manggis. Huruf A menyatakan kelompok preventif, dimana terapi ekstrak kulit manggis dimulai bersamaan dengan pemberian diet tinggi lemak. Huruf B menyatakan kelompok terapeutik, dimana terapi ekstrak kulit manggis diberikan setelah pemberian diet tinggi lemak selama satu bulan. Angka 1, 2 dan 3 menyatakan dosis ekstrak kulit manggis. Angka 1 berarti diberikan dosis 200 mg/ml, angka 2 berarti diberikan dosis 400mg/ml, dan angka 3 berarti diberikan dosis 800 mg/ml.
3. Persiapan hewan uji. Setelah itu tikus ditimbang berat badannya dan ditempatkan pada kandang. Masa penyesuaian tikus dilakukan selama 2 minggu dengan pemberian pakan normal dan air minum. Setelah masa penyesuaian, dimulailah penelitian. Pemberian diet tinggi lemak untuk kelompok EKM A1, EKM A2, EKM A3, EKM B1, EKM B2, EKM B3, HFD 1 bulan dan HFD. Sedangkan untuk kelompok normal diet tetap diberikan pakan normal.
4. Pemberian ekstrak kulit manggis dengan cara penyondean.
5. Menurut Murwani et al (2006) pemberian diet tinggi lemak selama 8 minggu dapat meningkatkan kadar kolesterol dan memicu terbentuknya sel busa,

maka pemberian diet tinggi lemak dilakukan selama lebih dari 8 minggu (12 minggu) untuk meningkatkan perkembangan lesi aterogenik.

4.7.4 Pembedahan Tikus

Pembedahan tikus dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan per inhalasi dengan kloroform dalam suatu wadah tertutup. Menaruh tikus yang sudah diberi anestesi di atas steroform, difiksasi, lalu dibedah mulai dari perut. Potong usus halusnya terlebih dahulu kemudian diambil darahnya dengan spuit 10 cc melalui jantung untuk pemeriksaan MDA serum. Kemudian darah dimasukkan ke dalam wadah plastik.

4.7.5 Pengukuran Spektrofotometer

Pemeriksaan kadar MDA nya dengan tes TBARS (Thiobarbituric acid-reactive substance). Dasar pemeriksaan adalah dimana satu molekul MDA akan terpecah menjadi 2 molekul 2-asam thiobarbiturat. Reaksi ini berjalan pada pH 2-3. TBA akan memberikan warna pink-chromogen yang dapat diperiksa secara spektrofotometrik (Orrego, 2009).

Pada awalnya serum diambil sebanyak 100 μ l serum kemudian ditambahkan dengan larutan TCA 100% sebanyak 250 μ l. Selanjutnya ditambahkan HCl 1 N 200 μ l dilanjutkan aquabides 0,5 cc. Kemudian ditambahkan Na-thio 1 % 100 μ l. Setelah itu larutan dipanaskan dengan suhu 100°C selama 20 menit. Setelah pemanasan selesai, sampel diberi aquabides agar seimbang sebelum dilakukan sentrifugasi 2000 rpm dalam waktu 15 menit. Usai disentrifugasi, kemudian diambil supernatant di atasnya. Supernatan diletakkan pada tabung terpisah, dijadikan 3 cc dengan penambahan aquabides.

Kadar *Malondialdehid* (MDA) dibaca dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 532 nm.

4.7.6 Analisa Statistik

Pengolahan data menggunakan *Software Statistical Product and Service Solution* (SPSS), untuk uji beda dengan taraf signifikansi $p < 0.05$, ataupun uji hubungan.

4.8 Pengolahan dan Analisa Data

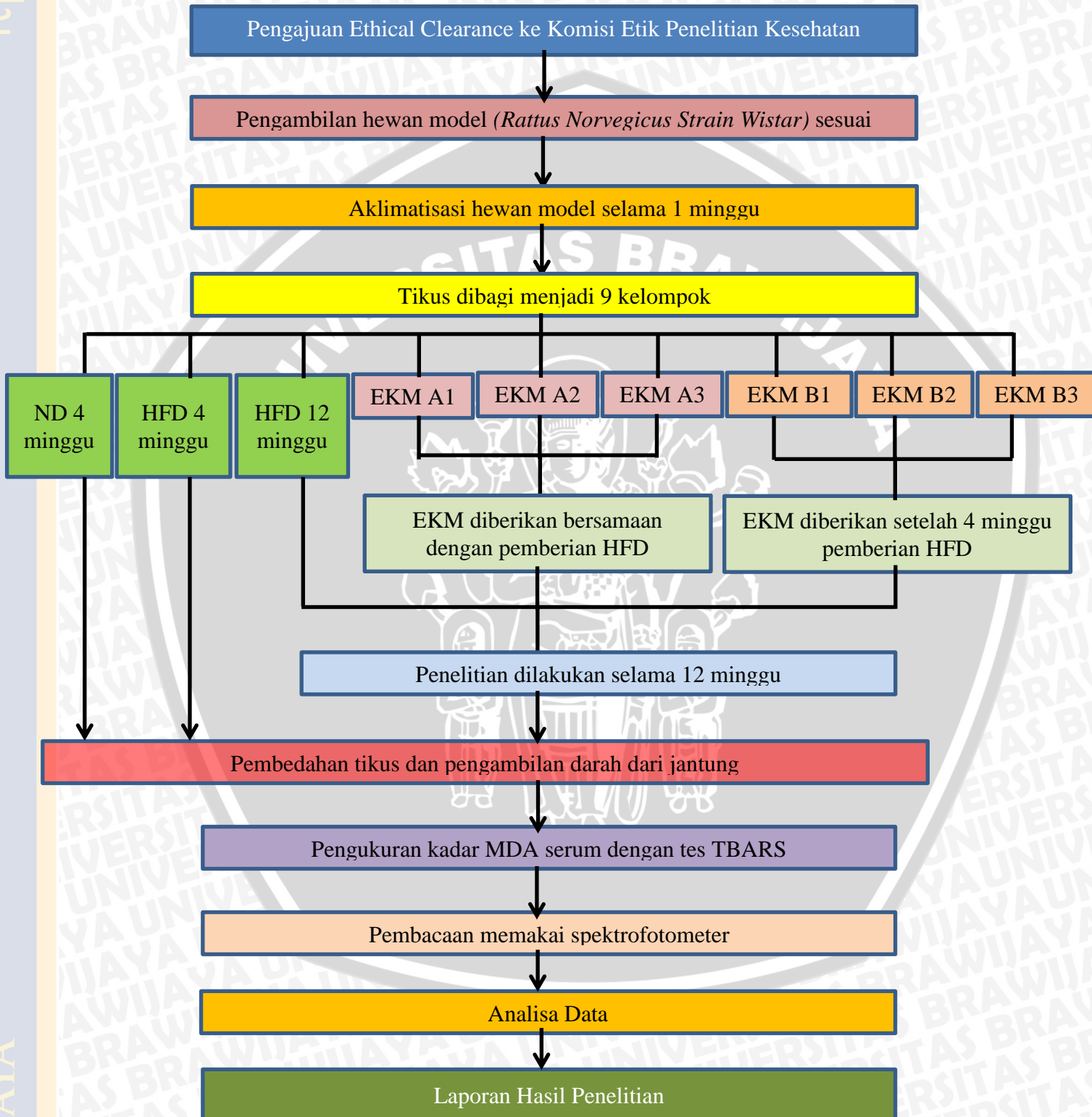
Pengambilan data dilakukan setelah pembedahan hari ke 7. Data yang diperoleh akan dilakukan uji normalitas untuk mengetahui persebaran data normal atau tidak dan uji varian homogenitas untuk menentukan varian data sama atau tidak.

- Uji normalitas dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu uji *Kolmogorov-Smirnov* atau uji *Shapiro-Wilk*. Dalam penelitian ini digunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk mengetahui normalitas data.
- Uji homogenitas untuk menilai apakah data yang dihasilkan dari setiap kelompok memiliki varian homogen. Dalam penelitian ini digunakan uji *Levene*. Syarat untuk kelompok tidak berpasangan adalah varians data harus sama ($p > 0,05$).
- Jika sebaran data normal dan varian data sama atau homogen maka uji hipotesis *one way anova* dapat dilakukan. Uji *One Way ANOVA* digunakan untuk mengetahui perbandingan antara masing-masing kelompok. Namun, jika sebaran data tidak normal dan varian data tidak sama atau tidak

homogen maka digunakan uji *Kruskal Wallis*. H_0 diterima apabila nilai signifikansi yang diperoleh dari uji *ANOVA* berada di atas α 0.05 ($p > 0,05$). Sedangkan H_1 diterima apabila nilai signifikansi yang diperoleh dari uji *ANOVA* berada di bawah α 0.05 ($p < 0,05$).

- Selanjutnya apabila H_1 diterima, untuk melihat perbedaan dari setiap kelompok digunakan uji *Post Hoc* sebagai lanjutan *one way anova* atau dilakukan uji *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis*. Uji *Post Hoc* digunakan untuk menilai apakah ada perbedaan bermakna pada kelompok dari hasil tes *ANOVA*. Penelitian ini dinilai bermakna bila $p < 0,05$.
- Kemudian, dilanjutkan dengan mencari dan mengetahui kekuatan hubungan antar variabel dengan uji korelasi *Pearson*. Uji statistik di atas dicek dengan menggunakan program statistik SPSS (Andika, 2009)

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Skematik Rancangan Penelitian

4.10 Jadwal Kegiatan

No	Kegiatan	Bulan 1				Bulan 2				Bulan 3				Bulan 4			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Tahap persiapan																	
1.	Mengurus ethical clearance																
2.	Mengurus perijinan laboratorium																
3.	Belanja alat dan bahan penelitian																
4.	Aklimatisasi Tikus																
5.	Ekstraksi Kulit Manggis																
6.	Penginduksian tikus dengan diet aterogenik																
Tahap pelaksanaan																	
1.	Pemberian ekstrak kulit manggis																
2.	Pembedahan tikus																
Tahap penyelesaian																	
1.	Analisa data																
2.	Penyusunan laporan akhir																