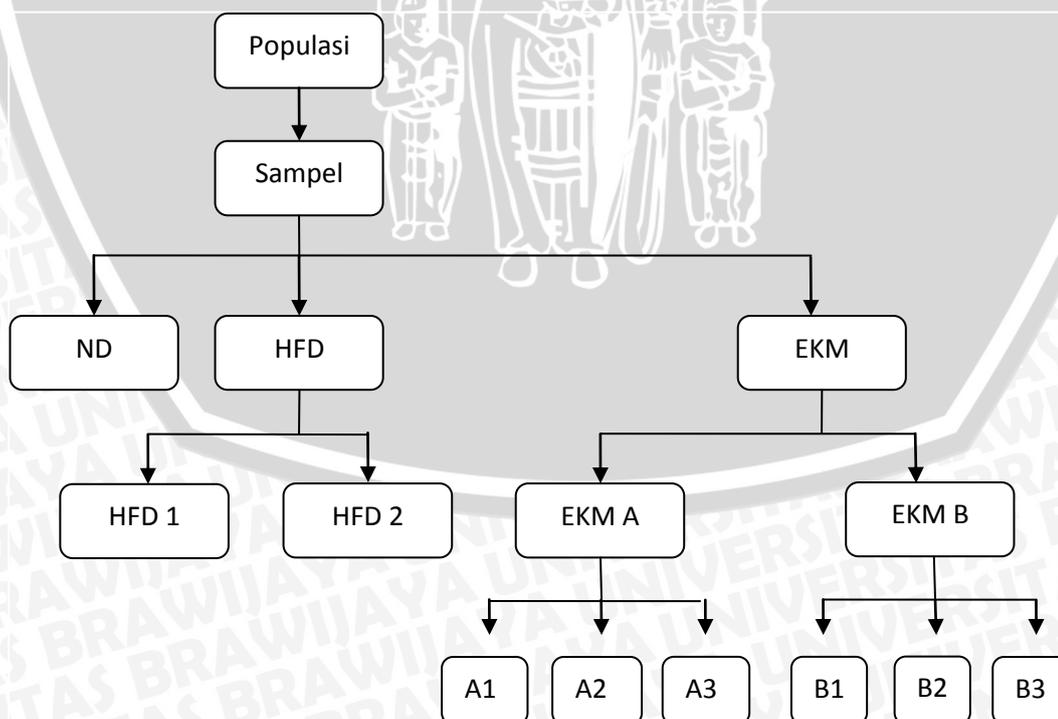


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

Penelitian merupakan penelitian *true experimental laboratory*, dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Setelah itu dilakukan pemberian ekstrak kulit manggis dengan dosis 200, 400 dan 800 mg/kg BB dengan menggunakan sonde pada tikus diet tinggi lemak. Setelah dilakukan aklimatisasi selama 2 minggu baru dilakukan penelitian. Terdapat 54 ekor tikus yang terbagi dalam 3 kelompok besar yaitu yaitu kelompok tikus dengan pemberian pangan normal diet (ND), kelompok pemberian diet tinggi lemak (HFD), kelompok pemberian ekstrak kulit manggis (EKM).. Secara skematis, desain penelitian tersebut dapat digambarkan sebagai berikut:



Keterangan :

1. ND : kelompok yang diberi pakan normal tanpa pemberian ekstrak kulit manggis (EKM)
2. HFD : kelompok yang diberi pakan tinggi lemak tanpa pemberian ekstrak kulit manggis (EKM)
  - HFD 1 : diet tinggi lemak selama 1 bulan
  - HFD 2 : diet tinggi lemak selama 3 bulan
3. Kelompok pemberian ekstrak kulit manggis (EKM). Pada kelompok ini terdapat 2 (dua) macam pemberian EKM, yaitu :
  - a. Pemberian EKM yang secara bersamaan dengan mulai pemberian HFD (EKM A).
    - i) EKM A1: kelompok yang diberi pakan tinggi lemak dan pemberian ekstrak kulit manggis dosis 200mg/tikus/hari selama 12 minggu secara bersamaan
    - ii) EKM A2 : kelompok yang diberi pakan tinggi lemak dan pemberian ekstrak kulit manggis dosis 400mg/tikus/hari selama 12 minggu secara bersamaan.
    - iii) EKM A3 : kelompok yang diberi pakan tinggi lemak dan pemberian ekstrak kulit manggis dosis 800mg/tikus/hari selama 12 minggu secara bersamaan.

b. Pemberian ekstrak kulit manggis (EKM B) yang diberikan setelah 1 (satu) bulan pemberian HFD.

i) EKM B1 : Kelompok yang diberi pakan tinggi lemak selama 4 minggu, dan dilanjutkan pemberian pakan tinggi lemak dan ekstrak kulit manggis dengan dosis 200mg/tikus/hari selama 8 minggu.

ii) EKM B2 : Kelompok yang diberi pakan tinggi lemak selama 4 minggu, dan dilanjutkan pemberian pakan tinggi lemak dan ekstrak kulit manggis dengan dosis 400mg/tikus/hari selama 8 minggu.

iii) EKM B3 : Kelompok yang diberi pakan tinggi lemak selama 4 minggu, dan dilanjutkan pemberian pakan tinggi lemak dan ekstrak kulit manggis dengan dosis 800mg/tikus/hari selama 8 minggu.

#### 4.2. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmako Universitas Brawijaya.

#### 4.3. Sampel Penelitian

Populasi yang menjadi target penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*). Sampel penelitian yang digunakan adalah tikus putih strain wistar yang diberikan diet tinggi lemak (HFD) selama 3 (tiga) bulan., berbadan sehat, jenis kelamin jantan, berat badan 150-200 gram, dan usia 8-10 minggu.



Pemilihan ini didasarkan pada alasan bahwa:

1. *Rattus norvegicus strain wistar* ini secara anatomis dan fisiologis memiliki sistem imunologi yang mirip dengan manusia (John Smith, 1987:43)
2. Jenis kelamin jantan dipilih karena pada *Framingham Study* dikatakan bahwa merupakan penyebab aterosklerosis pada 46% laki-laki dan 27% pada wanita. Selain itu hormon jenis pria dapat mempercepat perkembangan aterosklerosis, sedangkan hormon jenis wanita melindungi terjadinya aterosklerosis (Goodman & Gilman 2001, Ganong, 2003, Robins, 2005).
3. Berat badan tikus yang biasa digunakan sebagai hewan coba rata-rata pada usia tersebut adalah 150-200 gram (Kusumawati dalam surnina, 2009)
4. Berusia 8-10 minggu karena aterosklerosis mulai timbul pada masa anak dan berkembang pada masa dewasa (deFerranti SD, Neufeld E., 2003)

#### 4.3.1. Estimasi Jumlah Sampel dan Pengulangan

Dalam penelitian ini terdapat 9 kelompok perlakuan, dengan demikian jumlah sampel yang diperlukan dapat dihitung sebagai berikut:

$$p = 9$$

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

$$pn - p \geq 15$$

$$9n \geq 24$$

$$n \geq 3$$

(Solimun, 2001)

Jadi, didapatkan jumlah sampel hewan coba untuk tiap perlakuan adalah sebanyak 3 ekor tikus. Untuk mungurangi *lose of sample* di tengah-tengah penelitian karena tikus mati, maka jumlah sampel ditambah menjadi 6 ekor tikus untuk setiap kelompoknya. Sehingga, keseluruhan sampel yang dibutuhkan sebanyak 54 ekor tikus putih.

#### 4.4. Variabel Penelitian

##### 4.4.1. Variabel Independen

Variabel independen dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit buah manggis dalam berbagai dosis.

##### 4.4.2. Variabel Dependen

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah jumlah trombosit/trombosit yang beragregasi pada hapusan darah tepi.

#### 4.5. Definisi Operasional

1. Komposisi diet tinggi lemak untuk tikus putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar) adalah pakan yang ditambah kolesterol 2%, asam kolat 0,2%, minyak babi 5%. Asam kolat diberikan, karena tanpa penambahan asam kolat pemberian diet aterogenik selama 8 minggu tidak dapat meningkatkan kadar kolesterol dan terbentuknya sel busa yang bermakna. Srivastava et al. (9), mengungkapkan bahwa untuk menginduksi aterosklerosis pada mencit (*high-fat/high-cholesterol*)

diperlukan diet yang ditambah dengan asam kolat (cholic acid).

2. Sampel kulit manggis yang digunakan diperoleh dari perkebunan di Lumajang. Kulit manggis yang diukur yaitu : bagian luar (bagian yang keras dan berwarna ungu tua) serta kulit bagian dalamnya. Setelah diketahui kadar *xanthone* dan  $\alpha$ -mangosteen pada kulit manggis maka dilakukan treatment pemberian ekstrak kulit manggis dengan dosis 200, 400 dan 800 mg/kg BB dengan menggunakan sonde pada tikus model aterosklerosis
3. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih strain wistar (*Rattus norvegicus strain wistar*) jantan untuk menyesuaikan dengan tingkat insiden yang banyak pada pria daripada wanita. Tikus diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran UNIBRAW berumur 8-10 minggu dengan berat badan 150-200 gram. Tikus yang sudah disiapkan dengan dibagi menjadi 9 kelompok (setiap kelompok terdiri dari 6 tikus) yaitu 1 kelompok kontrol normal diet (ND), 2 kelompok diet tinggi lemak (HFD 1 dan HFD 2), dan 6 kelompok perlakuan (A1, A2, A3, B1, B2, B3). Penggunaan tikus dalam penelitian ini juga dimintakan sertifikat laik etik penelitian dalam menggunakan hewan coba.
4. Agregasi trombosit adalah perlekatan antar trombosit. Dalam keadaan tidak aktif trombosit tidak mudah melekat karena glikoprotein pada permukaan trombosit mengandung molekul asam sialat yang mengakibatkan permukaan bermuatan negatif sehingga trombosit saling tolak menolak. Agregasi trombosit diukur dengan hapusan darah tepi dapat dirangsang oleh berbagai indiktor antara lain adalah adrenalin. (Sotianingsih, 2001).

#### **4.6. Bahan dan Alat Penelitian**

##### **4.6.1. Bahan dan Alat untuk Pemeliharaan Tikus Putih**

Menyiapkan rak besi untuk penempatan kandang tikus, Menyiapkan kandang dari kotak plastik dengan tutup terbuat dari ram kawat dan didalamnya diberi sekam, Menyiapkan tempat minum tikus. Tikus dimasukkan dalam kandang yang sudah disiapkan dengan diberi pakan biasa dan minum selama 3 hari.

##### **4.6.2. Bahan yang dibutuhkan untuk induksi Aterosklerosis pada tikus putih**

Bahan yang dibutuhkan untuk induksi Aterosklerosis diberikan diet tinggi lemak dengan perlakuan pemberian pakan normal tikus dengan penambahan kolesterol 2 %, asam kolat 0,2 % dan minyak babi 5 % yang diberikan setiap hari 30 gram secara ad libitum (Murwani, 2006).

##### **4.6.3. Bahan dan Alat untuk Pembuatan Ekstraksi Kulit Manggis**

Bahan untuk ekstraksi adalah ethanol, aquadest murni, kulit manggis yang diperoleh dari perkebunan di Lumajang. Alat untuk ekstraksi adalah pisau, blender, timbangan analitik, kertas saring, beaker glass, rotary evaporator, kolom preparatif HPLC (kromatografi kinerja tinggi), kolom khromatografi vakum, lemari pendingin.

##### **4.6.4. Alat untuk Pemberian Ekstrak Kulit Manggis**

Alat yang dibutuhkan adalah spuit dan sonde.

##### **4.6.5. Alat untuk Pembedahan Tikus**

Alat untuk pembedahan kaki tikus adalah papan bedah, pisau bedah, dan pinset.

#### 4.6.6. Alat dan Bahan untuk Tes Agregasi Trombosit pada sediaan Apus Darah Tepi

Alat yang dibutuhkan antara lain spuit panjang 25 cm, Vacutainer Sodium Citrate 1:9, tabung eppendorf, mikro pipette volume 0.2 ml dan 0.02 ml, tips, stop watch, mikroskop cahaya dan minyak immersion, obyek glass, counter. Dan bahan-bahan yang digunakan antara lain adalah adrenalin, darah, cat giemsa dan methanol.

### 4.7 Prosedur Penelitian

#### 4.7.1 Pemberian diet normal

Diet Normal adalah perlakuan terhadap tikus *Rattus novergicus strain wistar* jantan umur 6-8 minggu yang diberi pakan diet normal tikus dengan total energi 104,6 Kal.

#### 4.7.2 Pemberian Diet Tinggi Lemak

Perlakuan pemberian pakan diet tinggi lemak dengan penambahan kolesterol 2 %, asam kolat 0,2 % dan minyak babi 5 % yang diberikan setiap hari 30 gram secara *ad libitum* (Murwani, 2006).

#### 4.7.3 Ekstraksi dan HPLC Kulit Manggis

Prosedur ekstraksi kulit manggis dengan metode ekstraksi kering, beberapa proses yang dilakukan adalah, pertama proses pengeringan dengan cara mencuci bersih bahan alam (sample basah) yang akan dikeringkan, kemudian potong kecil-kecil dan dimasukkan oven dengan suhu 80<sup>0</sup> C atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air). Setelah kering, haluskan dengan blender sampai halus, dan timbang sebanyak 100 gr (sample kering). 100 gr sampel kering dimasukkan ke dalam gelas erlemeyer ukuran 1

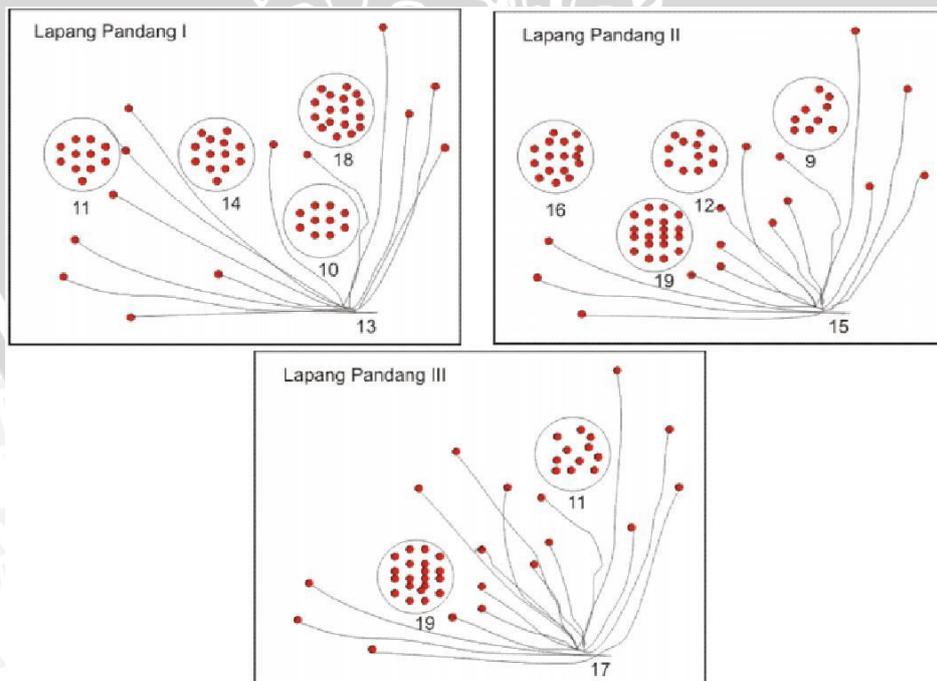
liter, kemudian direndam dengan etanol sampai volume 1000 ml. Dilakukan pengocok sampai benar-benar tercampur (kurang lebih 30 menit), lalu didiamkan 1 malam sampai mengendap. Pada akhir proses ekstraksi dilakukan proses evaporasi, dengan cara mengambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif yang sudah terambil kedalam labu evaporasi 1 liter. Pasang labu evaporasi pada evaporator dan isi water bath dengan air sampai penuh. Pemasangan semua rangkaian alat, termasuk rotary evaporator, pemanas water bath (atur sampai 90<sup>0</sup> C), sambungkan dengan aliran listrik. Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu dan 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 hasil ekstraksi dimasukan dalam botol plastic atau kaca, dan disimpan dalam freezer. Penentuan kadar Mangostin dan *Xanthone* menggunakan HPLC

#### 4.7.4 Pemeriksaan Agregat Trombosit pada sediaan Apusan Darah Tepi

Menurut Velaskar, 1992. Prosedur pemeriksaan agregat trombosit pada sediaan apus darah tepi, dengan cara sampel darah diambil kurang lebih sebanyak 0,9 ml menggunakan spuit kemudian dimasukan dan dicampur dengan sodium citrate 3,8 % sebanyak 0,1 ml yang sudah tersedia didalam *vacutainer*. Dari tabung *vacutainer* tadi diambil darah 0,2 ml dengan micro pipet dpindahkan ke tabung eppendorf, ditambahkan adrenalin sebanyak 0,02 ml. dicampur merata selama 10 detik dan dibuat sediaan apus darah, dengan pipet leukosit diambil 10µl, dibuat sediaan apus. Sediaan apus tersebut ditunggu kering dan difiksasi dengan metil alkohol selama 5 menit kemudian di cat giemsa yang telah diencerkan selama 20 menit, lalu dibilas dengan air suling dan dibiarkan kering. Pembacaan dilakukan dengan pembesaran objectif 100x. Dihitung jumlah

trombosit pada masing-masing kelompok trombosit yang ada dan jumlah trombosit yang tersebar pada lapangan pandang dari satu ujung ke ujung lain dalam arah yang sama. Persentase trombosit yang beragregasi dihitung berdasarkan jumlah trombosit yang berkelompok dibandingkan jumlah trombosit total (trombosit berkelompok dan tidak berkelompok). Kelemahan pembacaan sediaan apus darah tepi terletak pada ketrampilan dan keahlian masing-masing orang dalam membaca agregasi trombosit. Pengecatan apus darah tepi kurang bagus juga akan mempengaruhi dalam pembacaan agregasi trombosit (catatan: menghitung agregasi trombosit tidak menggunakan patokan, jumlah lapang pandang yang diperiksa. Namun menggunakan total jumlah trombosit yang ditemukan kurang lebih 200) (A.J.C.P.,1982)

**4.7.5 Pembacaan agregasi trombosit pada sediaan apus darah tepi secara mikroskopik.**



Contoh :

Trombosit beragregasi :

$$I \quad 11 + 14 + 10 + 18 = 53$$

$$II \quad 16 + 12 + 9 + 19 = 56$$

$$III \quad 20 + 11 \Rightarrow \underline{31+}$$
$$140$$

Trombosit bebas :

$$I \quad 13$$

$$II \quad 15$$

$$III \quad \underline{17} \pm$$

$$45$$

$$\text{Trombosit total} = 140 + 45 = 185$$



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



$$\text{Perhitungan \% agregasi trombosit} = \frac{\text{trombosit beragregasi}}{\text{trombosit total}} \times 100\%$$

$$= \frac{140}{185} \times 100\% = 75,7\%$$

Perhitungan agregasi dengan koreksi =

$$\frac{\% \text{ agregasi 3} - \% \text{ agregasi 0}}{100 - \% \text{ agregasi 0}} \times 100\% = \frac{75,7\% - 0\%}{100 - 0} \times 100$$

$$= 76\% \quad (\text{Keren, 2012})$$

#### 4.8 Analisis Data

Analisis statistik menggunakan One way ANOVA untuk mengetahui apakah ada pengaruh yang bermakna dari pemberian EKM yang dilakukan. Uji *one way* ANOVA merupakan uji hipotesis untuk membandingkan rerata 3 kelompok atau lebih, dengan variabel bebas diklasifikasikan dengan satu cara. Dalam penelitian ini besar interval kepercayaan yang dipakai adalah 95%, untuk tingkat signifikansi ( $\alpha$ ) = 0,05. Pada uji ANOVA, bila didapatkan:

- Sig. (p) > 0,05 : tidak bermakna atau perbedaan tidak signifikan.
- Sig. (p) < 0,05 : bermakna atau berbeda signifikan.

Kemudian dilakukan uji korelasi *Pearson* untuk melihat kekuatan hubungan antara efek ekstrak kulit manggis terhadap penurunan agregasi trombosit, dengan. Pada uji korelasi *Pearson*, bila didapatkan:

- Sig. (p) > 0,05 : tidak ada korelasi antara dua variabel.
- Sig. (p) < 0,05 : ada korelasi antara dua variabel
- Kekuatan korelasi > 0,5 : korelasi yang cukup kuat
- Kekuatan korelasi < 0,5 : korelasi yang lemah
- Arah korelasi positif (+) : searah. Semakin besar nilai suatu variabel, semakin besar pula nilai variabel lainnya.
- Arah korelasi negatif (-) : berlawanan arah. Semakin besar nilai suatu variabel, semakin kecil nilai variabel lainnya (Yogaswara, 2008).

Pengambilan data dilakukan setelah pembedahan minggu ke-12. Selanjutnya, untuk mengetahui seberapa besar pengaruh pemberian ekstrak kulit buah manggis terhadap ratio agregasi trombosit pada darah perifer tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar dewasa, dapat diketahui dengan menggunakan analisis bentuk hubungan (regresi), karena dari uji korelasi belum bisa menjelaskan hal tersebut.