

BAB 4

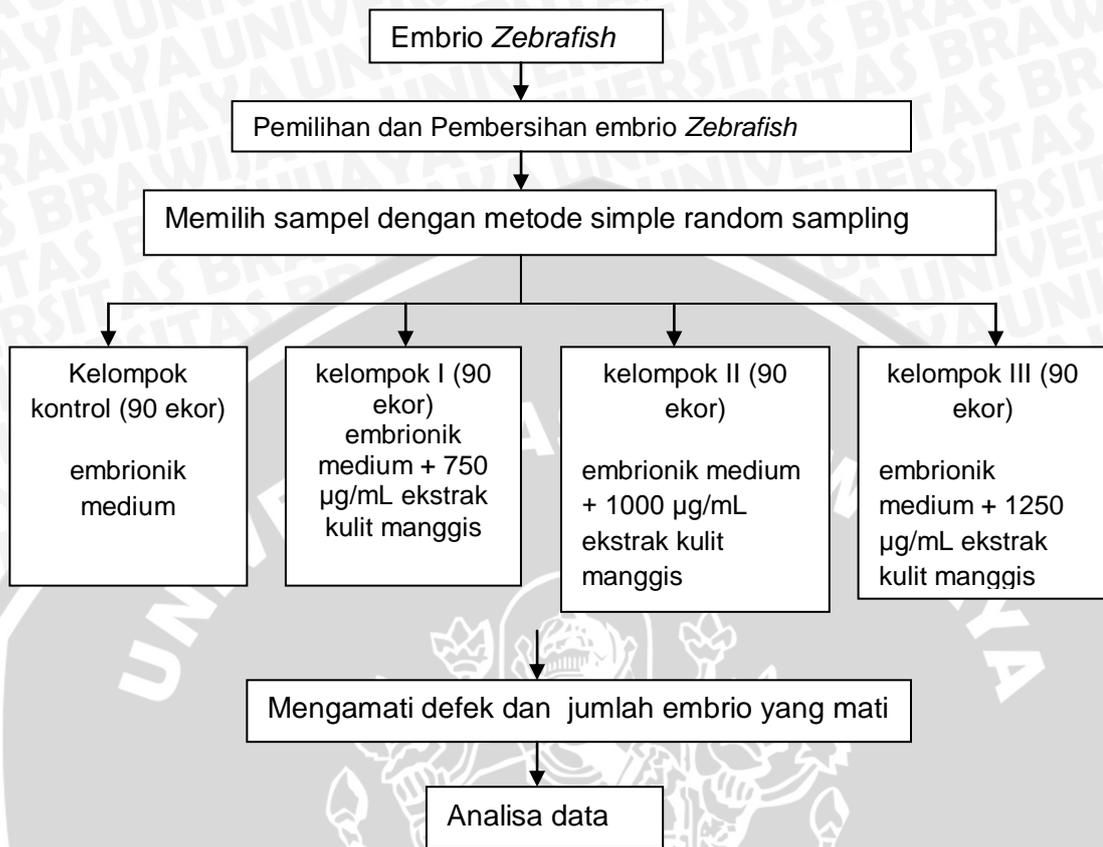
METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan *Simple Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Pada penelitian ini, embrio *Zebrafish* berusia 2 hpf terbagi menjadi 4 kelompok :

1. Kelompok 1: kelompok kontrol (embrio *zebrafish* berusia 2 hpf yang tidak diberi paparan ekstrak manggis).
2. Kelompok 2: embrio *zebrafish* berusia 2 hpf yang diberi paparan ekstrak manggis konsentrasi I (750 µg /mL/hari) selama 24 jam.
3. Kelompok 3: embrio *zebrafish* berusia 2 hpf yang diberi paparan ekstrak manggis konsentrasi II (1000 µg /mL/hari) selama 24 jam.
4. Kelompok 4: embrio *zebrafish* berusia 2 hpf yang diberi paparan ekstrak manggis konsentrasi III (1250 µg /mL/hari) selama 24 jam.

Masing – masing kelompok berisi 30 embrio *zebrafish*. Dalam penelitian ini, pengulangan dilakukan 3 kali, sehingga dalam penelitian ini diperlukan embrio *zebrafish* sebanyak 360 ekor (Cindelaras, 2005). Secara skematik, rancangan penelitian dijelaskan dalam bagan berikut ini:



Gambar 4.1 Bagan Skematik Rancangan Penelitian

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Agustus sampai September 2013.

4.3 Variabel Penelitian

- Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*) yang dibagi dalam kelompok.
- Variabel terikat dalam penelitian ini adalah persen kematian embrio zebrafish.

- c. Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah embrionik medium, umur embrio *zebrafish*, kondisi lingkungan inkubator.

4.5 Definisi Operasional

1. Uji toksisitas akut

Uji efek toksik dari suatu senyawa ditentukan dalam waktu singkat, yaitu rentang waktu selama 24 jam setelah pemberian konsentrasi uji ekstrak kulit manggis terhadap embrio *Zebrafish*.

2. Hewan coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah embrio *Zebrafish* berusia 2 hpf yang telah diidentifikasi dengan metode morfometris di Laboratorium Ilmu Perairan Fakultas Perikanan.

3. Ekstrak kulit manggis

Ekstraksi kulit manggis menggunakan metode maserasi. Kulit manggis adalah bagian pericarp manggis (*Garcinia mangostana*). Manggis yang digunakan berasal dari famili *Guttiferae* yang didapatkan dari pasar tradisional Kota Malang yang berasal dari daerah Lumajang.

4. LC 50 (*Lethal Concentration 50*)

LC 50 merupakan konsentrasi yang mematikan 50% hewan coba yaitu embrio *Zebrafish* setelah diberikan konsentrasi ekstrak kulit manggis 1250 µg/mL; 1000 µg/mL; 750 µg/mL untuk kelompok II, III, dan IV setiap harinya.

4.6 Bahan dan Alat

4.6.1 Bahan

- a. makanan ikan Tetramin
- b. kardus penutup akuarium,
- c. air yang dilewatkan pure it,
- d. embrionik medium dengan komposisi : MgSO_4 0,815 g, NaCl 5,0 g, KCl 0,15 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,26/ distilled water (DW) 500ml (OECD, 2013) yang diencerkan 10 kali
- e. ekstrak kulit manggis

4.6.2 Alat

- a. wadah plastik berukuran 21 cm x 13 cm x 5cm untuk *egg trap*
- b. cawan petri
- c. pipet tetes
- d. gelas ukur
- e. inkubator dengan suhu $\pm 28^\circ\text{C}$
- f. mikroskop stereo Olympus SZ61 yang dilengkapi kamera

4.7 Prosedur Penelitian

- a. Pembuatan Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana*)

Pengeringan Kulit Manggis

1. Kulit manggis yang akan dikeringkan dicuci
2. Kulit manggis dipotong kecil-kecil

3. Lalu dimasukkan ke oven dengan suhu 80°C atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air)

Proses Ekstraksi Kulit Manggis

1. Setelah kering, dihaluskan dengan blender sampai halus
2. Ditimbang sebanyak 100 gr (sample kering)
3. Dimasukkan 100 gr sampel kering ke dalam gelas erlemeyer ukuran 1 liter
4. Kemudian direndam dengan etanol sampai volume 1000 ml
5. Dikocok sampai benar-benar tercampur (kurang lebih 30 menit)
6. Didiamkan 1 malam sampai mengendap

Proses Evaporasi

1. Lapisan atas dari campuran etanol dengan zat aktif yang sudah mengendap diambil
2. Larutan dimasukkan dalam labu evaporasi 1 liter
3. Dipasang labu evaporasi pada evaporator
4. Water bath diisi dengan air sampai penuh
5. Semua rangkaian alat dipasang, termasuk rotary evaporator, pemanas water bath (atur sampai 80°C), disambungkan dengan aliran listrik
6. Larutan etanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu
7. Aliran etanol ditunggu sampai berhenti menetes pada labu penampung (kurang lebih 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu)
8. Hasil ekstraksi dimasukkan dalam botol plastik atau kaca
9. Hasil ekstraksi disimpan dalam freezer.

b. Perawatan pada *Zebrafish* dewasa

Zebrafish dipelihara di dalam akuarium dengan suhu 26 ± 1 °C, pH antara 7,9 – 8,3, kadar oksigen > 95%. *Zebrafish* diberi makan sebanyak 3 kali sehari pada jam 8 pagi, 12 siang dan 4 sore. Di dalam akuarium diberi wadah berukuran 26cm x 20 cm x 12,5 cm dengan diberikan jaring pada penutup wadah tersebut agar telur *Zebrafish* bisa masuk ke dalam wadah. Bagian luar dari akuarium *Zebrafish* diberikan penutup yang terbuat dari kardus atau kain agar *zebrafish* bisa memperoleh lingkungan yang nyaman, karena *Zebrafish* sangat sensitif terhadap lingkungannya. perawatan pada *Zebrafish* juga harus memperhatikan siklus gelap terangnya dengan perbandingan 10:14 jam (OECD, 2013).

c. Perlakuan pada embrio *Zebrafish*

Embrio *Zebrafish* ditampung pada wadah berukuran 26 cm x 20 cm x 12,5 cm mula – mula dipindahkan pada cawan petri yang telah dibersihkan dan diisi dengan air yang dilewatkan pure it secukupnya. Embrio dipindahkan dengan menggunakan pipet tetes secara hati – hati dan dipilih telur yang telah terbuahi, serta dilakukan penghitungan untuk mengetahui berapa jumlah embrio yang didapatkan. Setelah semua embrio dipindahkan ke well yang besar, embrio *Zebrafish* tersebut dibilas dengan air yang dilewatkan pure it sebanyak kurang lebih 5 kali sampai bersih. Setelah embrio *Zebrafish* bersih, dilakukan pengamatan di bawah mikroskop untuk mengetahui embrio *Zebrafish* yang telah dipilih sehat dan tidak mengalami defek atau mati. Jika ditemukan embrio yang mengalami defek atau mati, embrio tersebut segera dikeluarkan dari cawan petri. Setelah itu, embrio *Zebrafish* diletakkan pada

plate 6 well yang sudah diberi embrionik medium, masing – masing diisi 30 embrio.

Embrio *Zebrafish* berumur 2 hpf yang akan dilakukan uji toksisitas diberikan ekstrak kulit manggis sesuai dengan dosis yang akan diuji. 3 well pertama dijadikan sebagai kontrol. 9 well selanjutnya sebagai embrio yang diberi ekstrak. Embrio *Zebrafish* diberikan ekstrak kulit manggis dengan konsentrasi 750 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$, dan 1250 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak kulit manggis dan juga embrionik medium yang diberikan pada embrio *Zebrafish* dilakukan penggantian setiap hari.

d. Menentukan embrio *Zebrafish* yang mengalami defek atau kematian

Embrio *Zebrafish* yang mengalami mortality adalah embrio *Zebrafish* yang memiliki *chorion* keruh, tidak memiliki denyut jantung, serta tidak bergerak saat disentuh dengan jarum. Embrio *Zebrafish* yang mengalami defek adalah embrio *Zebrafish* yang mengalami pembengkakan pada ekornya, ukurannya lebih kecil dari normal.

e. Menentukan LC 50

LC 50 ditentukan dengan cara mencatat jumlah kematian kelompok kontrol dan embrio zebrafish berusia 2hpf yang diberi paparan ekstrak kulit manggis selama 24 jam. Setelah itu menghitung persentase kematian embrio zebrafish sekaligus menghitung rata – rata persentase kematian dan standard deviasi dari masing – masing kelompok dengan menggunakan program microsoft excel 2007. Penentuan konsentrasi LC 50 dapat ditentukan dengan menggunakan Probit analisis dari program SPSS dan persamaan garis liner.