

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* yang menggunakan hewan coba tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) dengan metode *control group design* yaitu dengan membandingkan hasil kontrol positif dan kontrol negatif. Penelitian ini termasuk jenis *post test control group design* pengujian dilakukan setelah intervensi diberikan.

4.2 Sampel

4.2.1 Pemilihan Sampel

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

1. Tikus Wistar berusia 8-10 minggu
2. Tikus jantan
3. Kondisi sehat (aktif, tidak cacat)

4.2.2 Jumlah Sampel

Jumlah sampel dihitung dengan rumus Federer (1955):

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

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

$$8r \geq 23$$

$$r \geq 2,875$$

$$r \approx 3$$

Jumlah sampel minimal yang harus digunakan dalam penelitian ini adalah 3 ekor. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan berjumlah total 36 ekor yang dibagi ke dalam 9 kelompok, yaitu:

Tabel 4.1 Daftar kelompok penelitian

Kelompok perlakuan	Pakan		Ekstrak kulit manggis	
	Jenis pakan	Lama pemberian	Dosis	Lama pemberian
Normal diet	Pakan normal	12 minggu	-	-
HFD 4 minggu	Diet tinggi lemak	4 minggu	-	-
HFD 12 minggu	Diet tinggi lemak	12 minggu	-	-
EKM A1	Diet tinggi lemak	12 minggu	200 mg/kgBB	12 minggu
EKM A2	Diet tinggi lemak	12 minggu	400 mg/kgBB	12 minggu
EKM A3	Diet tinggi lemak	12 minggu	800 mg/kgBB	12 minggu
EKM B1	Diet tinggi lemak	12 minggu	200 mg/kgBB	8 minggu*
EKM B2	Diet tinggi lemak	12 minggu	400 mg/kgBB	8 minggu*
EKM B3	Diet tinggi lemak	12 minggu	800 mg/kgBB	8 minggu*

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

Dosis ekstrak kulit manggis kelompok perlakuan diatur berdasarkan penelitian Reanmongkol dan Wattanapiromsakul (2008).

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel bebas (Independent)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian diet tinggi lemak setiap hari dan pemberian ekstrak kulit manggis pada kelompok perlakuan.

4.3.2 Variabel tergantung (dependent)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pengukuran aktivitas superoksida dismutase (SOD) dan kadar hidrogen peroksida (H_2O_2) serum 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 aktivitas superoksida dismutase (SOD) dan

kadar hidrogen peroksida (H_2O_2) serum tikus *Rattus norvegicus* galur wistar.

4.4 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dari bulan Juli sampai September 2013 untuk melakukan pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba. Pengamatan aktivitas superoksida dismutase (SOD) serum diamati di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya, sedangkan pengamatan kadar hidrogen peroksida (H_2O_2) serum dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan:

1. Bahan makanan tikus normal terdiri dari Confeed PARS, tepung terigu dan air dengan total energi 104,6 Kal. Diberikan sebanyak 40 gram per tikus per hari.

Tabel 4.2 Jumlah energi, protein, lemak, dan karbohidrat pada pakan tikus.

	Confeed PARS (100 g)	Tepung Terigu (100 g)
Energi	344 kkal	364 kkal
Protein	19 g	10 g
Lemak	4 g	1 g
Karbohidrat	58 g	76 g

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.

Tabel 4.2 Jumlah energi, protein, lemak, dan karbohidrat dalam bahan tambahan pada pakan tinggi lemak

	Minyak babi (100 g)	Kuning telur bebek (100 g)
Energi	897,7 kkal	118,2 kkal
Protein	0,1 g	8,3 g
Lemak	99,7 g	9 g
Karbohidrat	0 g	1 g

3. Air untuk minum tikus
4. Kulit manggis yang telah diekstraksi
5. Bahan pemeriksaan aktivitas SOD: Serum tikus dan spektrofotometer kit unit
6. Bahan pemeriksaan kadar H_2O_2 : Serum tikus dan ELISA kit.

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

Alat yang dibutuhkan:

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 untuk pemberian ekstrak kulit manggis: Sonde
4. Alat untuk mengambil sampel: Spuit 5 ml, vacotenner, kapas
5. Alat untuk pengukuran aktivitas superoksida dismutase: Tabung reaksi, sentrifuge, spektrofotometer.
6. Alat untuk pengukuran kadar hidrogen peroksida: ELISA kit.

4.6 Definisi Istilah/Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini adalah:

- a. Diet tinggi lemak dibuat dari pars 92%, kolesterol 2 %, asam kolat 0,2%, dan minyak babi 5 %.
- b. Ekstrak kulit manggis diperoleh dari kulit manggis yang dikeringkan, kemudian di larutkan dengan etanol 96% dan diuapkan.
- c. Aktivitas SOD diukur dari serum tikus dengan menggunakan metode spektrofotometri pada setiap kelompok perlakuan.
- d. Kadar H_2O_2 diukur dari serum tikus dengan menggunakan metode ELISA pada setiap kelompok perlakuan.

4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur ekstraksi 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 $80^{\circ}C$ atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air)
2. Proses ekstraksi
 - Setelah kering, haluskan dengan blender sampai halus

- Timbang sebanyak 100 g (sample kering)
- Masukkan 100 g sampel kering ke dalam gelas erlemeyer ukuran 1 liter
- Kemudian rendam dengan etanol sampai volume 1000 ml
- 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 90⁰ 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 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 4 ekor tikus. Kesembilan kelompok tersebut antara lain Normal Diet, HFD 12 minggu, HFD 4 minggu, EKM A1, EKM A2, EKM A3, EKM B1, EKM B2, dan EKM B3. Kelompok normal diet sebagai kontrol negatif, kelompok HFD 12 minggu sebagai kontrol positif, 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. HFD 4 minggu sebagai kontrol positif yang menjadi dasar pemberian ekstrak kulit manggis secara kuratif.

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 12 minggu, dan HFD 4 minggu. Sedangkan untuk kelompok normal diet tetap diberikan pakan normal.

4. Pemberian ekstrak kulit manggis.

Bahan: Ekstrak kulit manggis.

Alat: Sonde.

Ekstrak kulit manggis diberikan peroral dengan menggunakan sonde.

5. Berdasarkan 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.

4.7.3 Pengukuran aktivitas superoksida dismutase (SOD) dengan metode spektrofotometri

Pemeriksaan aktivitas SOD dilakukan dengan metode spektrofotometri, dengan tahapan darah di sentrifus, lalu serum tikus sebanyak 200 mikroliter dicampur EDTA 100mM 200 mikroliter dan 500 mikroliter *buffer vortex*, NBT 25 U 100 mikroliter, Xanthine 25 U 100 mikroliter, dan Xanthin oksidase 1 U 100 mikroliter hingga homogen. Lalu diinkubasi pada suhu 37°C, disentrifus lagi selama 30 menit, dan disaring bila terdapat koloid. Larutan tersebut kemudian dijadikan 3cc dengan akuabides dan dibaca dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm.

4.7.4 Pengukuran kadar hidrogen peroksida (H₂O₂) dengan metode ELISA

Pengukuran kadar H₂O₂ dilakukan dengan menggunakan *Colorimetric Hydrogen Peroxide Kit (Assay Design)* produksi *Abcam*, dengan tahapan sebagai berikut. Larutan standar dibuat dengan mendilusikan 10µl 0,88 M H₂O₂ standard ke dalam 870 µl d H₂O untuk mendapatkan 10 mM H₂O₂ standard, kemudian 10 µl 10 mM H₂O₂ standar ke dalam 990 µl dH₂O untuk memperoleh 0,1 mM H₂O₂ standard. Tambahkan 0, 10, 20, 30, 40, 50 µl senyawa 0,1mM H₂O₂ standard ke dalam 96-well plate untuk memperoleh 0, 1, 2, 3, 4, 5 nmol/well H₂O₂ standar. Selanjutnya masukkan serum tikus ke dalam plate dan campurkan reagen assay buffer 46 µl, OxiRed Probe 2 µl, dan HRP 2 µl pada masing-masing plate. Campurkan dan inkubasi dalam

suhu ruangan selama 10 menit. Selanjutnya dibaca pada panjang gelombang 570 nanometer dengan menggunakan *Microplate Reader*.

4.8 Pengolahan dan Analisis Data

Aktivitas SOD dan kadar H_2O_2 serum dikumpulkan tiap kelompok dan dihitung rata-ratanya. Hasilnya disajikan dalam bentuk tabel dan grafik yang kemudian dianalisis secara deskriptif. Selanjutnya dengan bantuan software SPSS, dilakukan uji statistik berikut:

- Menilai distribusi normalitas data secara analitis. Dapat dilakukan dengan dua cara, yang pertama uji Kolmogorov-Smirnov, digunakan untuk sampel yang lebih besar (lebih dari 50), yang kedua adalah uji Shapiro-Wilk untuk sampel yang sedikit (kurang dari atau sama dengan 50).
- Uji homogenitas menggunakan Levene Test untuk menilai apakah data yang dihasilkan dari setiap kelompok memiliki varian homogen. Syarat untuk kelompok tidak berpasangan adalah varians data harus sama ($p > 0,05$). Jika varians data sama, maka hasil dapat dilanjutkan untuk dianalisis dengan uji One Way ANOVA.
- Uji One Way ANOVA digunakan untuk mengetahui perbandingan antara masing-masing kelompok.
- Uji Post Hoc digunakan untuk menilai apakah ada perbedaan bermakna pada kelompok dari hasil tes ANOVA.
- Uji Korelasi Pearson untuk mengukur hubungan antara lama pemberian ekstrak kulit manggis dan aktivitas SOD serta kadar H_2O_2 .

4.9 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																