

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni – April 2014 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian tersebut menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar umur 12 minggu dengan berat rata – rata 200 gram. Pada penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan. Sampel ini diadaptasi selama tujuh hari sebelum diberi perlakuan yang bertujuan untuk menyesuaikan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, dapat disimpulkan bahwa untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

4.3 Bahan dan Alat Penelitian

4.3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), rokok Marlboro, ekstrak etanol kulit manggis, PBS Azida, HCl, NaOH, etanol absolut 98%, etanol 50%, aquades, NaCl Fisiologi 0,9%, alkohol 70 %, aluminium foil, plastik klip, spuit, larutan PBS pH 7,4, KCl, KHPO₄, NaHPO₄, H₂O, Pereaksi Wagner, gelatin, plat KLT, Dietileter, Toluene, Asam asetat, antibodi poliklonal goat TNF- α , PFA 4%, H₂O₂ 3%, *Fetal Bovine Serum* (FBS), *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP), *Diamino Benzidine* (DAB), *Mayer Hematoxylen*, *Eosin*, *Entellan*, *Propylene* murni, *Gliserin*, *Parafin*, *Xylol*, *Formaldehid* 37% dan larutan *Azida*.

Pada penelitian tersebut menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan strain Wistar umur 12 minggu dengan berat rata – rata 200 gram sebagai hewan coba diperoleh dari UPHP UGM. Tikus dilakukan pembedahan secara dimatikan dengan cara dislokasi leher dan diambil organ hepar. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (**Lampiran 2**).

4.3.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain bak pemeliharaan hewan coba, gunting, pinset, cawan petri, labu takar (10 mL, 25mL, 100 mL, 250mL, 500 mL, 1000 mL), pipet tetes, gelas ukur 100 mL, gelas kimia (50 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL), tabung reaksi, corong gelas, mortar, mikro pipet (10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L), rak tabung reaksi, penangas air, stirer, cawan petri, botol semprot, apendorf, tabung polipropilen, lemari pendingin, neraca analitik, seperangkat alat sentrifugasi (Hettich Zentrifugen D-7200 Tuttlingen), inkubator (Mettler), vortex (Guo-Huq), Spektrofotometer IR, freezer -20° C, dan kulkas 4°C.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan lima kelompok perlakuan yaitu terdiri dari kelompok kontrol negatif (P1), kelompok kontrol positif (P2), kelompok terapi 200 mg/kg BB (P3), kelompok terapi 400 mg/kg BB (P4), kelompok terapi 600 mg/kg BB (P5).

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Pemberian dosis terapi ekstrak etanol kulit manggis

Variabel terikat : Ekspresi TNF – α dan gambaran histopatologi pada jaringan hepar.

Variabel kendali : Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan strain Wistar, umur, berat badan, pakan tikus, air minum dan lingkungan laboratorium.

4.6 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian tersebut yang dilakukan antara lain sebagai berikut:

1. Persiapan hewan percobaan tikus (*Rattus norvegicus*)
2. Pemaparan asap rokok pada tikus (*Rattus norvegicus*)
3. Pembuatan ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia mangostana L*)
4. Uji fitokimia ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia mangostana L*)
5. Analisis Kromotografi Lapis Tipis (KLT)
6. Pemberian terapi ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia mangostana L*)
7. Pengambilan organ hepar
8. Pewarnaan Imunohistokimia
9. Analisa data

4.7 Cara Kerja Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Percobaan

Tikus yang digunakan untuk penelitian diadaptasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian makanan berupa ransum basal pada semua tikus. Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok terapi dengan dosis 200 mg/kg BB, kelompok terapi dengan dosis 400 mg/kg BB, dan kelompok terapi dengan dosis 600 mg/kg BB. Kelompok kontrol negatif merupakan tikus yang

tidak dipapar asap rokok dan tidak diberi terapi. Kelompok kontrol positif merupakan tikus dipapar dengan asap rokok. Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari lima ekor tikus sebagai ulangan.

4.7.2 Pemaparan Asap Rokok

Pemaparan asap rokok ini dilakukan terhadap tikus sehat selama 30 hari menggunakan 2 batang rokok per hari. Pemaparan ini dilakukan pada pagi hari dengan cara hewan coba diletakkan di dalam kedap udara akuarium serta batang rokok yang telah di bakar ke dalam tempat tersebut (Mansour, 2013).

4.7.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Manggis (*Garcinia mangostana L*)

Kulit manggis dipotong kecil-kecil dengan ukuran 0,5 x 1 cm², dikeringkan semalaman dengan diinkubasi pada suhu 45°C, setelah kering kulit manggis dihancurkan dengan menggunakan blender untuk membuat serbuk, kemudian serbuk ditambahkan aquades dengan perbandingan 1:4 dipanaskan dengan penangas air pada suhu 70°C selama 15 menit, pemanasan itu dilakukan terus menerus selama 4 kali kemudian disaring. Hasil dalam bentuk filtrat untuk uji tanin, sedangkan hasil dalam bentuk residu diinkubasi pada suhu 40°- 45°C.

Tahap selanjutnya dilakukan maserasi dengan menggunakan etanol 50% didiamkan selama 7 hari dalam tabung erlemeyer dan ditutup dengan aluminium foil. Didapatkan ekstrak kulit manggis dalam bentuk cairan yang telah didestilasi dalam pelarut aquades. Dilakukan Destilasi yaitu bertujuan untuk memisahkan etanol dan air, langkahnya adalah 500 ml hasil maserasi di destilasi dan

menghasilkan ekstrak penguapan etanil sebanyak 27,6 ml (**Lampiran 4**) (Mansour, 2013).

4.7.4 Uji Fitokimia Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana L*)

Uji fitokimia ini meliputi uji tanin, flavonoid, alkaloid, dan terpenoid. Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa bahan alam yang terkandung dalam ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana linn*). Adanya senyawa tanin diuji dengan cara membuat perbandingan 1:4 antara berat serbuk dengan aquades, setelah itu dipanaskan pada suhu 70°C akan terbentuk suspensi atau endapan, kemudian sisa air yang terbentuk dibuang, hal tersebut dilakukan sebanyak 4 kali dengan cara yang sama sampai hasil menunjukkan negatif, untuk pengujian tanin di tambah dengan gelatin 1%. Setelah uji tanin selesai dilakukan maka ekstrak dioven selama dua hari dengan suhu 40 – 45°C (Shofia, 2012) (**Lampiran 6**).

Uji flavanoid dengan cara mereaksikan 0,5 ml ekstrak kulit manggis ditambahkan dengan 1 ml larutan NaOH 10% dan ditambahkan 1 ml larutan HCl encer. Ekstrak menunjukkan hasil positif berwarna kuning (Shofia, 2012) (**Lampiran 6**).

Uji terpenoid dengan cara mereaksikan 0,5 ml ekstrak kulit manggis dengan ditambahkan 2ml kloroform (CHCl₃), kemudian ditambahkan 2ml asam sulfat pekat. Hasil positif terpenoid, jika terbentuk warna merah kecoklatan pada antar muka 2 lapisan larutan (Shofia, 2012) (**Lampiran 6**).

Uji alkaloid dengan cara mereaksikan 0,5 ml ekstrak kulit manggis dengan ditambahkan 10 ml kloroform (CHCl_3) dan 1 ml amonia (NH_3) 0,05 M. Larutan dicampurkan dengan H_2SO_4 2 M sebanyak 1 ml dikocok dan terbentuk 2 lapisan. Lapisan asam sulfat diambil dan ditambahkan pereaksi Wagner. Hasil positif menunjukkan terbentuk endapan coklat pada larutan (Shofia, 2012) (**Lampiran 6**).

4.7.5 Analisis KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Sebelum di lakukan analisis IR, ekstrak kulit manggis diisolasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) berfungsi untuk memisahkan campuran senyawa yang terkandung dalam ekstrak kulit manggis. Fase gerak (pengembang) yang digunakan adalah asam asetat: dietil eter: etil asetat (3:4:4). Noda (Spot) yang terbentuk pada silika dilihat dengan lampu UV pada panjang gelombang 366 nm. Tiap – tiap noda dihitung harga R_f -nya dengan rumus :

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan noda dari tempat awal}}{\text{jarak pergerakan eluen dari tempat awal}}$$

Selanjutnya tiap noda pada silika dikerok dan dianalisis dengan spektrofotometer IR menggunakan pelet KBr. Analisis spektrofotometer bertujuan untuk mengetahui gugus – gugus fungsi senyawa yang terkandung dalam ekstrak kulit manggis (**Lampiran 7**) (Shofia, 2012).

4.7.6 Pemberian Terapi Ekstrak Etanol Kulit Manggis (*Garcinia mangostana L*)

Perlakukan terapi dengan menggunakan ekstrak etanol kulit manggis pada 15 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang terdiri dari 5 tikus kelompok terapi dengan dosis 200 mg/kg BB, 5 tikus kelompok terapi dengan dosis 400 mg/kg BB, dan 5 tikus kelompok terapi dengan dosis 600 mg/kg BB. Pemberian terapi itu dilakukan setelah tikus diberi paparan asap rokok selama 30 hari. Ekstrak etanol kulit manggis diberikan masing – masing sebanyak 1 ml/hari/ekor selama 21 hari secara oral (sonde).

4.7.7 Pengambilan Organ Hepar

Pengambilan organ hepar dilakukan dengan cara tikus didislokasi pada bagian leher, setelah itu hewan coba diposisikan terlentang dan difiksasi. Pembedahan dilakukan pada bagian abdomen dan diambil organ hepar. Organ hepar dicuci dengan menggunakan NaCl-fis 0,9% kemudian dipotong menjadi dua bagian satu bagian dimasukkan pada larutan PBS-Azida pH 7,4 dan satu bagian dimasukkan pada larutan PFA 4%.

4.7.8 Pembuatan Preparat Histopatologi Organ Hepar dengan Metode Pewarnaan HE

Proses pembuatan preparat dimulai dengan hepar direndam dalam larutan fiksatif berupa formalin atau PFA 4% selama 1 – 7 hari. Setelah itu dilakukan perendaman dengan menggunakan alkohol 70% selama 24 jam, dan dilanjutkan dengan alkohol 80% selama 2 jam, selanjutnya direndam dalam alkohol 90% selama 20 menit. Tahapan selanjutnya adalah memindahkan hepar pada xylol 1 dan 2 masing – masing 20 menit. Xylol 3 dapat dilakukan pada suhu 60 – 63°C selama 20 menit. Selanjutnya hepar dicelupkan dalam parafin cair pada wadah. Setelah itu, parafin akan memadat dan hepar berada dalam blok parafin. Jaringan hepar di potong dengan menggunakan *microtome* dengan ketebalan 4-5 µm dan direndam dengan *waterbath*. Jaringan hepar selanjutnya diletakkan pada *object glass* dan dikeringkan pada suhu 38 – 40°C sampai kering. Preparat siap diwarnai dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE) (Shofia, 2012) (**Lampiran 8**).

Pewarnaan Hematoksin Eosin (HE) terdiri dari zat warna *hematoxylin* dan *eosin*. Proses pewarnaan dilakukan pada bagian awal dengan deparafinisasi preparat hepar menggunakan xylol yang bertujuan untuk menghilangkan parafin jaringan. Selanjutnya dilakukan rehidrasi menggunakan alkohol untuk mengembalikan kandungan air jaringan. Preparat kemudian dicuci menggunakan aquades. Setelah dilakukan pencucian, preparat dimasukkan kedalam larutan pewarna *hematoxylin*. Preparat yang telah terwarnai dibilas kembali dengan aquades. Tahap selanjutnya setelah preparat bersih diletakkan kembali di dalam pewarna *eosin*. Proses akhir

preparata dicuci dengan aquades hingga bersih kemudian dehidrasi, clearing dan mounting (Shofia, 2012) (**Lampiran 8**).

4.7.9 Ekspresi TNF – α dengan menggunakan Metode Imunohistokimia

Imunohistokimia diawali dengan tahapan pada xilol 1, xilol2, etanol bertingkat (98%,90%80%,70%) dan aquades. Slide preparat dicuci dengan PBS pH7,4 selama 5 menit. Preparat ditetesi H₂O₂ 3% selama 20 menit, kemudian dicuci dengan PBS pH7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya dilakukan Bloking dengan 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah itu preparat di cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak tiga kali. Preparat kemudian diinkubasi dengan antibody primer *anti TNF – α* selama semalam pada suhu 40 °C, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Preparat diinkubasi menggunakan antibody sekunder berlabel *anti rabbit biotin* (Santa Cruz) selama 1 jam pada suhu ruang. Selanjutnya dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin-horse radin peroxidase*) diinkubasi selama 40 menit. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali. Setelah itu ditetesi dengan DAB (*Diamano Benzidine*) dan dinkubasi selama 10 menit kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. *Counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 10 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir kemudian dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Preparat di *mounting* dengan *entellan* dan ditutup dengan *cover glass*. Pengamatan dengan perbesaran 400x

dan 600 x dan dihitung jumlah sel/100 sel dengan dilakukan perulangan sebanyak 3 kali (**Lampiran 8**) (Junquiera, 2007).

4.8 Analisa Data

Analisa data penelitian ini terdiri dari data kuantitatif dan kualitatif. Data kuantitatif yaitu analisa data yang digunakan dalam perhitungan ekspresi TNF – α dengan dianalisa menggunakan ANOVA (*Analysis of variance*) diperoleh dari *software SPSS 16 for windows* dan dilanjutkan analisa uji Beda Nyata Jujur (Tukey) $\alpha = 0,05$. Data kualitatif berupa hasil pengamatan histopatologi jaringan hepar dianalisis secara deskriptif (**Lampiran 10**).

