

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini memiliki ruang lingkup pada ilmu Farmakologi, Terapi dan Biokimia.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di beberapa tempat:

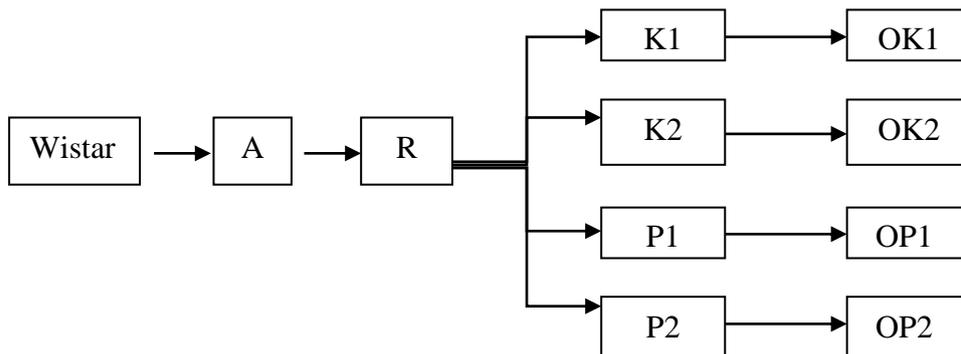
- 1) Laboratorium Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang untuk pembuatan ekstrak kulit manggis
- 2) Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk pengadaan hewan coba, intervensi terhadap hewan coba, pengambilan sampel
- 3) Laboratorium Unit Penelitian Terpadu Universitas Diponegoro untuk pemeriksaan kadar SOD

Waktu : Mei - Juni 2017

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini berjenis *true experimental post-test only with control group design* yang menggunakan binatang coba sebagai objek penelitian. Perlakuan yang diberikan adalah dengan memberikan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*) terhadap tikus wistar yang diinduksi minyak jelantah.

Perlakuan yang diberikan adalah dengan memberikan ekstrak kulit manggis (*Garcinia Mangostana L.*) *ad libitum* dan minyak jelantah, sedangkan luaran (*outcome*) adalah kadar enzim enzim SOD plasma tikus *Wistar*.



Keterangan :

- A : Adaptasi. Pada kelompok ini sampel hanya akan diberi pakan standar dan air minum *ad libitum* untuk beradaptasi selama 7 hari.
- R : Randomisasi. Sampel akan dibagi ke dalam 4 kelompok secara acak
- K1 : Kelompok kontrol negatif yang hanya akan diberi pakan standar dan air minum *ad libitum* selama 28 hari.
- K2 : Kelompok Perlakuan pertama akan diberikan pakan standar, air minum *ad libitum* dan diinduksi minyak jelantah selama 28 hari.
- P1 : Kelompok perlakuan pertama akan diberikan pakan standar, air minum, dan ekstrak kulit manggis dengan dosis 400 mg/KgBB/hari selama 28 hari.

P2 : Kelompok perlakuan kedua akan diberikan pakan standar, air minum, minyak jelantah dan ekstrak kulit manggis dengan dosis 400 mg/KgBB/hari selama 28 hari .

OK1 : Hasil pemeriksaan kadar SOD tikus kelompok K1

OK2 : Hasil pemeriksaan kadar SOD tikus kelompok K2

OP1 : Hasil pemeriksaan kadar SOD tikus kelompok P1

OP2 : Hasil pemeriksaan kadar SOD tikus kelompok P2

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Sampel

Populasi dalam penelitian ini direncanakan adalah tikus wistar jantan berumur 3 bulan dengan berat badan 200-220 gram. Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah 24 ekor tikus *Wistar* yang dikandangkan dalam kandang yang terbuat dari bahan *stainless steel* dengan siklus pencahayaan 12 jam, mendapat makan dan minum *ad libitum*.

3.4.2 Kriteria Inklusi

- 1) Tikus jantan *Wistar*
- 2) Usia tikus 12 minggu
- 3) Berat badan tikus 200-220 gram
- 4) Tikus sehat, tampak aktif dan tidak ada kelainan anatomis

3.4.3 Kriteria Eksklusi

- 1) Pada pengamatan visual tikus tampak tidak aktif dan sakit

3.4.4 Kriteria *Drop Out*

- 1) Tikus mati saat penelitian.

3.4.5 Cara Sampling

Alokasi sampel dengan menggunakan metode *Random Allocation Sampling*. tikus wistar dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu dua kelompok kontrol dan dua kelompok perlakuan.

3.4.6 Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan 6 ekor tikus untuk setiap kelompoknya, sebagai antisipasi apabila terdapat tikus yang *drop out* saat penelitian berlangsung. Terdapat 2 kelompok kontrol dan 2 kelompok perlakuan pada penelitian ini, sehingga total tikus yang dibutuhkan selama penelitian berjumlah 24 ekor tikus.

Penentuan jumlah tikus untuk masing-masing kelompok pada penelitian ini telah sesuai dengan ketentuan yang dikeluarkan oleh WHO yaitu minimal 5 ekor tikus untuk setiap kelompoknya.

3.5 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*)

Variabel terikat : Kadar enzim *superoxide dismutase* SOD tikus Wistar

3.6 Definisi Operasional

Tabel 4. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Unit	Skala
1	Minyak Jelantah	Minyak jelantah dibuat dengan memanaskan minyak goreng jenis kelapa sawit yang di beli di toko untuk menggoreng 1 kg singkong sebanyak 6 kali. Proses pemanasan dimulai dengan memasukkan minyak goreng sebanyak 2500 mL, kemudian digoreng pada suhu 150° C selama 8 menit. Setelah Setelah 8 menit minyak didinginkan pada suhu ruangan selama 5 jam dan penggorengan akan diulang sebanyak sampai 5 kali. Minyak yang digunakan adalah minyak yang sama tanpa penambahan apapun. Dosis minyak goreng kelapa sawit yang digunakan dalam penelitian ini adalah: $0,006 \times 7,0 = 0,42 \text{ ml} / 200 \text{ grBB}$ tikus wistar. ⁴¹	mL	Nominal
2	Ekstrak Kulit Manggis	Buah manggis dibeli di toko sebanyak 2 kg, kemudian kulit manggis dipisahkan dari buahnya. Ekstrak kulit buah manggis adalah ekstrak dari seluruh bagian kulit buah manggis (<i>Garcinia mangostana L.</i>) yang diperoleh dari hasil ekstraksi dengan pelarut ethanol 70%. Dosis yang diberikan adalah 400	Ya/Tidak	Nominal

mg/KgBB tikus pada kelompok P1 dan P2. Ekstrak kulit manggis diberikan secara per oral dengan menggunakan sonde.

Kadar Superoksida Dismutase Plasma	Kadar antioksidan dalam tubuh yang diukur pada plasma dengan ELISA KIT. Pada penelitian ini diukur kadar SOD plasma diperiksa oleh petugas Laboratorium Unit Penelitian Terpadu Universitas Diponegoro	ng/ml	Rasio
------------------------------------	--	-------	-------

3.7 Pengumpulan Data

3.7.1 Alat dan Bahan

Alat	Bahan
Kandang Tikus	Plasma darah tikus <i>Wistar</i> jantan
Sonde lambung <i>syringe</i>	Ekstrak kulit manggis
Timbangan hewan	Pakan standar hewan coba dan minum Minyak Jelantah
	EDTA
	SOD <i>activity</i> ELISA Kit

3.7.2 Jenis Data

Pemeriksaan kadar SOD plasma setelah pemberian ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*) pada tikus *Wistar* yang di induksi minyak jelantah merupakan data primer

3.7.3 Cara Kerja

3.7.3.1 Pembuatan Minyak Jelantah

Minyak jelantah dibuat dengan memanaskan minyak goreng curah kelapa sawit sebanyak 2500 mL untuk menggoreng 1 kg singkong sebanyak 6 kali pada suhu 150 °C selama 8 menit. Setelah 8 menit minyak didinginkan pada suhu ruangan selama 5 jam dan penggorengan akan diulang sebanyak sampai 5 kali. Minyak yang digunakan adalah minyak yang sama tanpa penambahan apapun. Setelah pemanasan ke-5 kemudian didinginkan kembali dan kemudian diinduksi ke tikus *Wistar* yang mendapat perlakuan K2 dan P2 dengan dosis $0,006 \times 7,0 = 0,42 \text{ ml} / 200 \text{ grBB}$ selama 28 hari.

3.7.3.2 Pembuatan Ekstrak Kulit Manggis

Buah manggis dicuci bersih kemudian dipisahkan antara kulit dengan daging buahnya. Kulit buah dipotong kecil-kecil selanjutnya dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Kulit manggis kering kemudian dimaserasi dengan etanol 70% selama 24 jam, dan diremaserasi lagi sebanyak dua kali. Residu dipisahkan dari filtrat melalui proses penyaringan. Filtrat yang diperoleh diuapkan pelarutnya pada temperatur 60-70 °C untuk mendapatkan ekstrak kental. Untuk mencegah terjadinya kontaminasi, ekstrak kental tersebut dipindahkan ke dalam botol kaca steril dan dilindungi dari sinar matahari langsung.

Ekstrak disuspensikan menggunakan CMC (*Carboxymethylcellulose*) 1% sebagai bahan pensuspensi. Suspensi ini disimpan dalam lemari pendingin. Untuk menjaga kestabilan suspensi tersebut, suspensi baru dibuat dan diberikan pada

hewan coba menjelang percobaan. Pemberian pada hewan coba dilakukan secara oral dengan teknik sonde sebanyak 2 ml suspensi.

3.7.3.3 Perlakuan Terhadap Hewan Coba

Seluruh sampel tikus *Wistar* akan dikandangkan secara individual di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Selama penelitian berlangsung, sampel akan mendapatkan pakan dan air minum standar yang sama. Untuk adaptasi, sampel hanya akan diberikan pakan standar dan air minum *ad libitum* selama tujuh hari pertama. Pada hari selanjutnya, sampel akan dibagi secara acak ke dalam empat kelompok sebagai berikut:

1. Kelompok Kontrol Negatif (K1)

Kelompok kontrol negatif hanya akan diberikan pakan standar dan air minum *ad libitum* selama 28 hari.

2. Kelompok Kontrol Positif (K2)

Kelompok Kontrol Positif akan diberikan pakan standar, air minum *ad libitum*, dan paparan minyak jelantah dengan dosis 0,42 ml/ekor/hari selama 28 hari.

3. Kelompok Perlakuan Ekstrak Kulit Manggis (P1)

Kelompok Perlakuan 1 akan diberikan pakan standard dan ekstrak kulit buah manggis dosis 400 mg/KgBB selama 28 hari.

4. Kelompok Perlakuan Ekstrak Kulit Manggis dan Minyak Jelantah (P2)

Kelompok perlakuan 2 akan diberikan pakan standard, ekstrak kulit manggis dosis 400 mg/KgBB dan minyak jelantah dengan dosis 0,42 ml /ekor/hari selama 28 hari.

Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa pemberian ekstrak kulit manggis pada hewan coba berjenis tikus sebanyak 400 mg /KgBB dapat mengurangi peroksidase lipid dan menaikkan kadar glutathione, SOD, dan katalase yang mengalami kerusakan radikal bebas⁴¹.

3.7.3.4 Prosedur Pengambilan Darah Vena Tikus

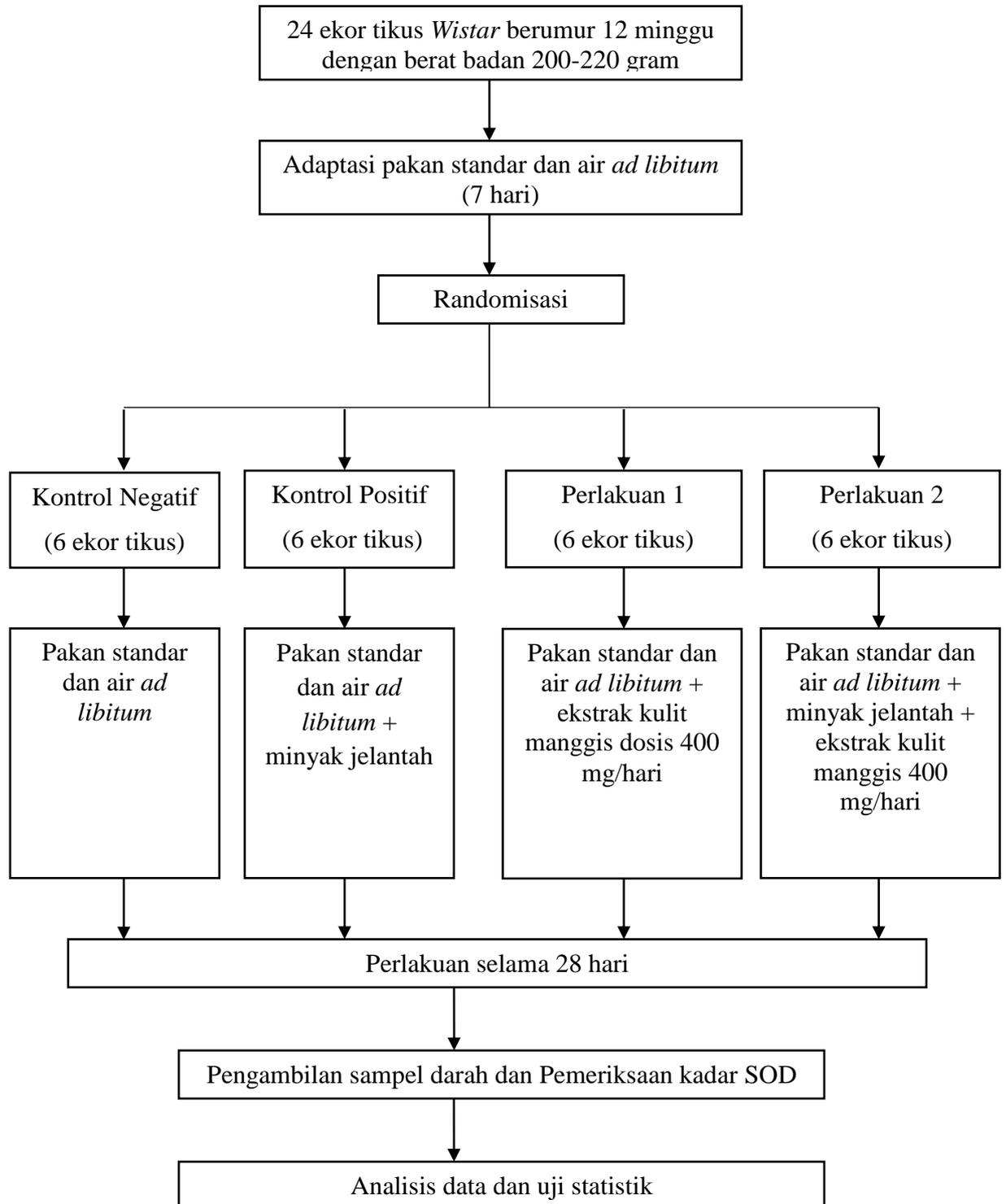
Prosedur pengambilan darah vena pada *pleksus retroorbitalis* tikus dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Tikus dianastesi injeksi ketamine kemudian dibaringkan menyamping sehingga salah satu sisi menempel pada meja. Kemudian dilakukan fiksasi dan kepala tikus menghadap kebawah. Jari telunjuk menarik kulit dengan tekanan sekitar kulit mata agar bola mata mengalami protusi maksimal.
2. Ambil pipet Pasteur/ pipet hematokrit lalu masukkan ujung disudut bawah cavum orbita. Arahkan dan miringkan pada kemiringan 45° kearah *media superior cavum orbita* dan didorong sedikit kedalam. Saat pendorongan kebelakang pipet diputar dengan jari
3. Longgarkan penekanan agar darah lebih cepat masuk.
4. Setelah darah tercukupi, tutup bagian ujung pipet dengan jari sebelum benar-benar mencabut pipet tersebut dari *cavum orbita*. Hal ini dimaksudkan darah yang sudah masukkedalam pipet tidak keluar saat pencabutan.
5. Setelah pencabutan pipet selesai, biasanya perdarahan akan berhenti spontan.

3.7.3.5 Pemeriksaan kadar SOD

Sampel yang digunakan untuk mengukur aktivitas SOD darah adalah bagian plasma. Pertama, mempersiapkan alat dan bahan yang diperlukan pada suhu ruangan 18°C-25°C. Menambahkan 50uL standar dan sampel disetiap sumur. Segera setelah itu menambahkan 50uL sample diluent pada setiap sumur kontrol. Tambahkan 100uL HRP *conjugate* disetiap sumur dan inkubasi selama 60 menit dengan suhu 37°C . Setelah itu cuci mikrotiter selama 4 kali. Tambahkan chromogen solution A 50 uL dan chromogen solution B 50 uL pada setiap sumur. Campurkan untuk perlindungan cahaya dan inkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Tambahkan *stop solution* setiap sumur, segera melakukan pembacaan pada panjang gelombang 450 nm selama 15 menit mendapatkan hasil kadar SOD plasma.

3.8 Alur Penelitian



3.9 Analisis Data

Data hasil penelitian ini dianalisis menggunakan program *software* statistik dengan menggunakan uji homogenitas data dengan uji Levene's test dan uji Shapiro-Wilk untuk mengetahui distribusi data. Jika distribusi data normal dan homogen dengan $P > 0,05$, maka dilanjutkan uji ANOVA untuk menganalisis perbedaan antar kelompok, bila terdapat perbedaan bermakna $p < 0,05$ akan dilanjutkan dengan uji *post hoc* untuk uji perbedaan antara 2 kelompok. Apabila data tidak berdistribusi normal, maka akan dilakukan transformasi data. Apabila setelah dilakukan transformasi data tetap tidak berdistribusi normal, maka akan dilakukan uji *Kruskal Wallis* yang kemudian dilakukan dengan uji *Mann Whitney*.

3.10 Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dan kelayakan etik berupa *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr.Kariadi dengan nomor *ethical clearance* yaitu 36/EC/H/FK-RSDK/2017 yang diterbitkan pada tanggal 16 Juni 2017. Seluruh biaya penelitian ini ditanggung oleh Ika Medika.