

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan pre-post test control group design dimana kelompok perlakuan diberi ekstrak kulit manggis (*Garcinia Mangostana, L*). Dalam aplikasinya penggunaan ekstrak kulit manggis sebagai variabel bebas, dan kadar LDL sebagai variabel tergantung.

B. Tempat & Waktu

Penelitian ini berlangsung di dua tempat, pembuatan ekstrak kulit manggis di Lab. Penelitian Farmasi UMY dengan periode 11 maret sampai 1 april 2013 , dan perlakuan terhadap hewan uji di PAU UGM pada periode april sampai akhir mei 2013.

C. Populasi & Sampel

Obyek penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Spargue Dawley. Obyek yang diteliti memiliki kriteria sebagai berikut :

Kriteria Inklusi yaitu :

- 1.Usia sekitar 2 bulan
- 2.Memiliki berat badan 150-200 gram
- 3.Berjenis kelamin jantan

Kriteria eksklusi yaitu:

1. Tikus putih yang cacat
2. Berat badan tikus < 150 gram
3. Tikus tidak sehat

Pengambilan sampel dilakukan secara random sampling sederhana. Hewan uji didapat dari kantor PAU UGM dan Lab Farmako UGM. Jumlah hewan uji dalam penelitian ini adalah 25 ekor, dan masing-masing kelompok 5 ekor. Hasil tersebut berdasarkan rumus besar sampel eksperimental menurut Supranto J (2000), yaitu $(t-1)(r-1) \geq 15$ uraiannya sebagai berikut :

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

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

$$(4)(r-1) \geq 15$$

$$(r-1) \geq 15/4$$

$$r-1 \geq 3,7$$

$$r-1 \geq 4$$

$$r \geq 4+1$$

$$r \geq 5$$

keterangan :

- 1) r : jumlah hewan coba per kelompok
- 2) t : jumlah kelompok

Jadi, sampel tiap kelompok berjumlah 5 ekor tikus atau lebih. Setelah itu hewan uji diinduksi alloxan dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok akan diperlakukan berbeda.

D. Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel

- a) Variabel bebas: ekstrak kulit manggis yang diberikan 1 kali sehari selama 14 hari dengan dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB
- b) Variabel terikat : kadar LDL
- c) Variabel terkendali :
 - 1) Obyek penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Spargue Dawley (umur 2 bulan dan berat 150-200 gram).
 - 2) Faktor hormonal menggunakan tikus jantan agar tidak terpengaruh oleh siklus hormonal yang akan mengganggu hasil penelitian dan proses pengambilannya menggunakan randomisasi.
 - 3) Kondisi pakan dan kandang sama.
 - 4) Waktu pengambilan sampel adalah sebelum diinduksi alloxan, 48 jam setelah diinduksi alloxan dan sesudah 14 hari perlakuan.
 - 5) Lama penelitian dan takaran sampel yang di uji adalah 14 hari dengan takaran sampel yang berbeda untuk masing masing obyek yaitu 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB ekstrak kulit manggis.

2. Definisi operasional

a. Ekstrak kulit manggis :

Ekstrak kulit manggis adalah kulit manggis yang diekstraksi menggunakan metode maserasi. Ekstrak kulit manggis yang diberikan kepada hewan uji masing masing dengan dosis 50mg/kgBB tikus, 100mg/KgBB tikus, 200mg/KgBB tikus. Ekstrak diberikan secara oral dengan menggunakan spuit.

b. LDL :

LDL merupakan salah satu fraksi lipoprotein tubuh. Lipoprotein merupakan suatu bentuk molekul yang penting dalam pengangkutan lemak. LDL terdiri dari lemak yaitu kolesterol ester , fosfolipid, kolesterol tidak teresterifikasi , dan trigliserida. Fungsi utama dari LDL adalah untuk mengangkut kolesterol dari hati ke jaringan. LDL diperiksa dengan metode enzimatik yaitu CHOD-PAP.

c. Tikus Spargue Dawley :

Dalam penelitian ini digunakan galur *Sprague-Dawley* dengan ciri-ciri berwarna putih, berkepala kecil dan ekornya lebih panjang daripada badannya. Kelebihan lainnya sebagai hewan laboratorium adalah sanga mudah ditangani, dapat ditinggal sendirian dalam kandang asal dapat mendengar suara tikus lain dan berukuran cukup besar sehingga memudahkan pengamatan.

E. Instrumen Penelitian

Bahan : Alloxan, aquades, Glibenklamid, Serum darah, Buah manggis (ekstrak kulit manggis), Etanol 70%, Na-CMC 0,5 %

Alat : Neraca analitik, blender, kain saring, tabung, saringan, sonde, pipet, gelas kaca, spuit

F. Cara pengambilan data

1. Pembuatan Ekstrak Kulit Manggis

Pembuatan ekstrak kulit manggis dilakukan di laboratorium *fito medicine*. Kulit manggis yang telah dikupas bersih, kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringkan di udara terbuka. Selanjutnya, potongan kulit manggis diblender dan dijadikan serbuk simplisia. Serbuk kulit manggis disari dengan penyari etanol 70% menggunakan metode maserasi yaitu dengan merendam serbuk simplisia dalam etanol 70% hingga 2 cm dari permukaan serbuk simplisia selama 5 x 24 jam. Selama maserasi, sesekali serbuk diaduk agar penyarian sempurna. Selanjutnya, serbuk disaring dan diambil sarinya. Serbuk diremaserasi menggunakan penyaring yang sama selama 7 hari. Filtrat diuapkan dengan rotary evaporator hingga menghasilkan ekstrak kental.

2. Pengelompokan hewan uji

Sebanyak 25 ekor tikus ditimbang dan dibagi secara acak menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor, yaitu :

- a) kelompok I : kontrol negatif (tanpa perlakuan) hanya diberi 2 ml Na-CMC 0,5 %

- b) kelompok II: kontrol positif diberi Glibenklamid 0,09 mg/200grBB yang ditambahkan 2 ml Na-CMC 0,5 % .
- c) kelompok III: diberi ekstrak kulit manggis 50 mg/kgBB yang ditambahkan 2 ml Na-CMC 0,5 %
- d) kelompok IV: diberi ekstrak kulit manggis 100 mg/kgBB yang ditambahkan 2 ml Na-CMC 0,5 %
- e) kelompok V: diberi ekstrak kulit manggis 200 mg/kgBB yang ditambahkan 2 ml Na-CMC 0,5 %

Setelah di bagi menjadi 5 kelompok hewan uji diadaptasi terlebih dahulu selama 3 hari.

3. Pengambilan sampel darah awal

Pengambilan sampel darah pertama di lakukan setelah hewan uji di adaptasikan 3 hari. Sampel darah diambil pada pleksus retroorbitalis tikus. Sebelum pengambilan darah hewan uji berpuasa selama 8-12 jam. Pengambilan sampel darah awal ini di gunakan untuk melihat kadar LDL normal pada hewan uji sebanyak 1,5 ml.

4. Induksi Alloxan

Setelah pengambilan sampel darah awal, semua hewan uji diinduksi Alloxan. Alloxan disuntikan dengan dosis 80mg/kgBB tikus secara intraperitoneal agar menjadi diabetes mellitus tipe II. Tiap 80 mg/kgBB alloxan ditambahkan 2 ml Na-CMC 0,5 %. Alloxan di suntikan secara intraperitoneal pada tikus, dihitung dengan rumus :

$$\text{Dosis alloxan/hewan} = \frac{\text{berat hewan (g)}}{1000g} \times 80mg$$

Untuk melihat reaksi yang telah ditimbulkan maka pengambilan sampel darah berikutnya di lakukan setelah 48 jam pasca induksi alloxan. Selanjutnya di lakukan pemeriksaan kadar LDL sebagai sampel ke-1 sebelum perlakuan.

5. Pembuatan Suspensi CMC 0,5 %

Suspensi CMC dibuat dengan melarutkan CMC 0,5 g ke dalam akuades 10 ml, aduk sampai mengembang, kemudian dihaluskan sampai homogen. Setelah itu ditambahkan dengan akuades hangat sampai volume total larutan CMC 100 ml.

6. Pemberian Glibenklamid

Kelompok II dari hewan uji yang diinduksi alloxan diberi glibenklamid dengan dosis 0,09mg/200gr BB dan ditambahkan 2 ml Na-CMC 0,5 % dimana didapat dari hasil konversi dari dosis manusia yaitu 5mg/kgBB. Hasil konversi dosis glibenklamid manusia pada hewan uji (mg/200grBB) = $5mg \times 0,018 = 0,09mg/200grBB$

$$\text{Dosis Glibenklamid per ekor} = \frac{\text{berat hewan}(g)}{200g} \times 0,09 \text{ mg}$$

7. Pemberian perlakuan ekstrak kulit manggis

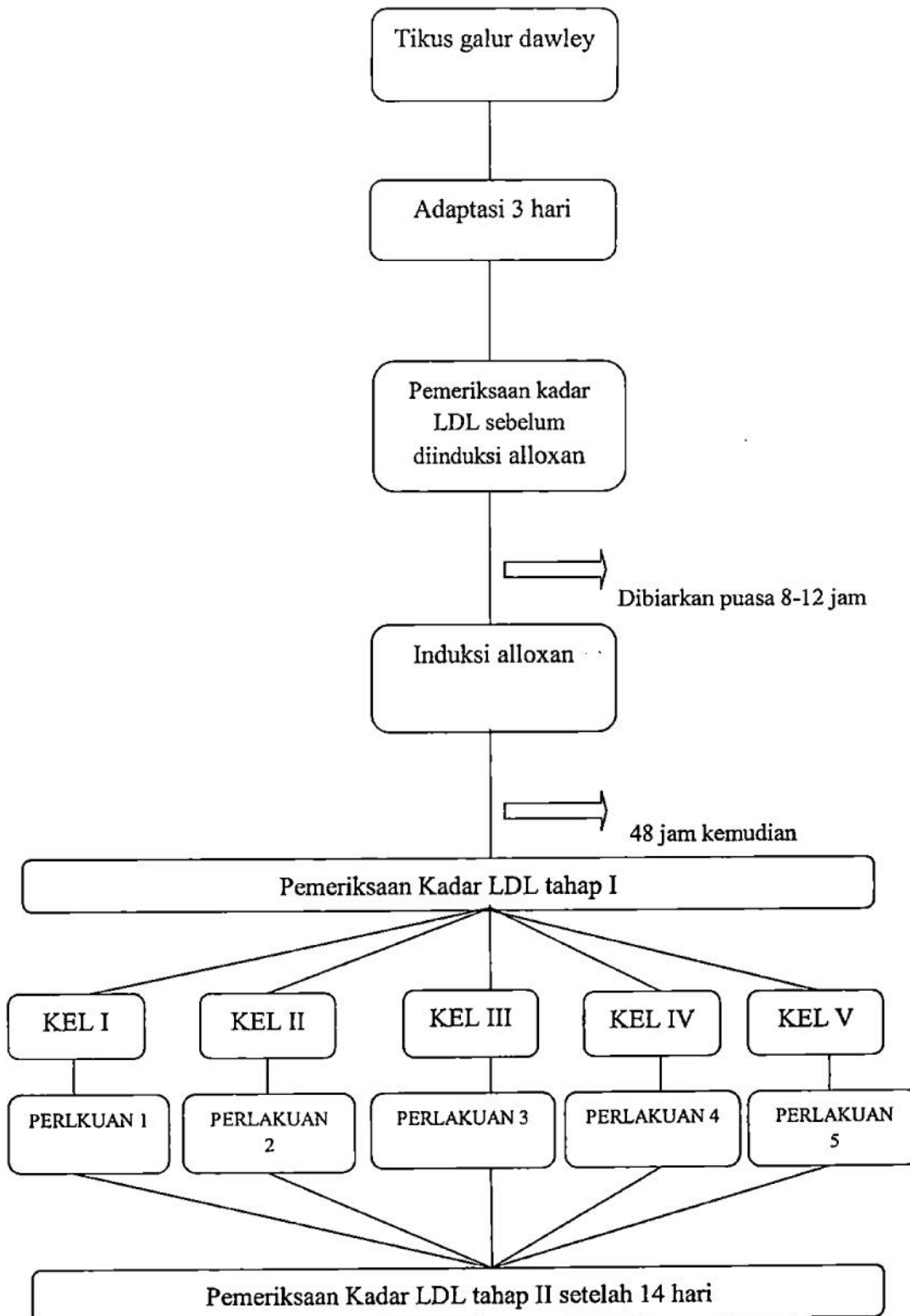
Kelompok III, IV, dan V dari hewan uji yang di induksi alloxan diberi ekstrak kulit manggis masing masing dengan dosis 50mg /kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB dan masing masing ditambahkan 2 ml Na-CMC 0,5% agar larutannya homogen, dan diberikan selama 14 hari.

Masing masing dosis :

1. Dosis ekstrak kelompok III = $\frac{\text{berat badan tikus (g)}}{1000 \text{ g}} \times 50 \text{ mg}$
2. Dosis ekstrak kelompok IV = $\frac{\text{berat badan tikus (g)}}{1000 \text{ g}} \times 100 \text{ mg}$
3. Dosis ekstrak kelompok V = $\frac{\text{berat badan (g)}}{1000 \text{ g}} \times 200 \text{ mg}$

8. Pengambilan data

Pengambilan data dilakukan 3 kali. Sampel darah vena diambil di bagian pleksus retroorbitalis tikus spargue dawley untuk pemeriksaan kadar LDL. Sampel darah yang akan diperiksa adalah serum darah puasa, sehingga hewan uji harus di puasakan terlebih dahulu sebelum pengambilan sampel darah. Waktu pengambilan sampel adalah sebelum hewan uji diinduksi aloxan, 48 jam setelah diinduksi alloxan, dan setelah 14 hari pemberian perlakuan.

G. Alur Penelitian

H. Analisis Data

Pengukuran kadar LDL menggunakan metode enzimatis LDL Kolesterol CHOD-PAP dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 500nm. Kadar LDL ditentukan dengan rumus sebagai berikut :

Kadar Kolesterol disupernatan =

$$\frac{\Delta A \text{ sampel}}{\Delta A \text{ standar}} \times \text{Konsentrasi standar (mg/dl)}$$

Keterangan :

1. $\Delta A \text{ sampel}$ = Absorbansi sampel – Absorbansi blanko
2. $\Delta A \text{ standar}$ = Absorbansi standar – Absorbansi blanko
3. Konsentrasi standar = 200mg/dl atau 5,2 mmol/l

Kadar LDL Kolesterol = Total kolesterol (mg/dl) – Kolesterol disupernatan (mg/dl)

Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan seperangkat komputer yaitu sistem SPSS dengan analisis menggunakan uji Paired Sample T-Tes untuk pre-post test alloxan dan dilanjutkan dengan uji one way ANOVA untuk mengetahui perbedaan rata-rata.

I. Uji Validitas dan Realibilitas

Kesahlian (validitas) dan keterandalan (realibilitas) pada penelitian ini di tentukan oleh ketepatan alat ukur (Spektrofotometer), ketepatan cara pengukuran dan dosis bahan coba serta obat yang tepat.