

III. METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan metode rancangan acak terkontrol dengan pola *post test only control group design*. Pada penelitian digunakan 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 10-16 minggu, dibagi menjadi 5 kelompok besar dengan perkelompok minimal 5 ekor tikus. Tikus dipilih sebagai objek penelitian karena memiliki kesamaan metabolik, organ dan fisiologi sistemik serta gen yang mirip dengan manusia (WHO, 2012).

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Balai Pengujian dan Penelitian Veteriner (BPPV) untuk pemeliharaan, pemberian perlakuan dan pengamatan terhadap tikus putih. Serta di Laboratorium Kimia Klinik Rumah Sakit Abdul Moeloek (RSAM) Bandar Lampung. Pembuatan ekstrak etanol kulit manggis dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung. Penelitian dilakukan pada 2 September – 24 September 2013.

C. Populasi dan Sempel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 10-16 minggu yang diperoleh dari Laboratorium Balai Penelitian Veterine (BALITVET) Bogor.

Sampel penelitian sebanyak 25 ekor yang dipilih secara acak yang dibagi dalam 5 kelompok. Banyaknya jumlah sampel ditentukan dengan menggunakan rumus Frederer (Birawati, 2012).

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

Keterangan:

n = besar sampel tiap kelompok

t = banyak kelompok

Besar sampel yang dibutuhkan untuk tiap kelompok:

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \approx 5$$

Kriteria Inklusi:

1. Sehat (tidak tampak rambut kusam, rontok, atau botak, dan bergerak aktif).
2. Memiliki berat badan \pm 100-150 gram.
3. Berjenis kelamin jantan.
4. Berusia sekitar \pm 10-16 minggu.

Kriteria Eksklusi:

1. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus serta genital).
2. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi.
3. Mati selama masa pemberian perlakuan.

D. Bahan dan Alat Penelitian**1. Bahan Penelitian**

Bahan penelitian terdiri dari ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia mangostana* Linn.) dengan dosis 20 mg/kgBB, 40 mg/kgBB dan 80 mg/kgBB serta rifamisin dengan dosis 100mg /100g. Bahan tambahan makanan hewan, aquades dan ketamine-xylazine.

2. Alat Penelitian

- a. Kandang hewan.
- b. Neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01 g. Untuk menimbang berat tikus.
- c. Sonde lambung dan spuit 1-3cc.
- d. *Handschoen* latex non steril dan sarung tangan wol.
- e. Mikro pipet.
- f. Gelas ukur.
- g. Tabung *vacuntener* non EDTA (*gel and clot activator*) & rak tabung.
- h. Label dan pulpen.

E. Prosedur Penelitian

1. Adaptasi Tikus

Tikus sebanyak 25 ekor dibagi atas 5 kelompok diadaptasi selama 1 minggu di BPPV, dan dilakukan penimbangan dan penandaan untuk menentukan perlakuan perkelompok (Ngatigjan, 2006).

2. Prosedur Pemberian ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* Linn.)

- a. Cara pembuatan ekstrak:

Proses pembuatan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* Linn.) dalam penelitian ini menggunakan etanol sebagai pelarut. Penelitian ini menggunakan pelarut etanol 40 %.

Menurut Sulistianto dkk (2004), ekstraksi dimulai dari penimbangan buah manggis (*Garcinia mangostana* Linn.). Kulit buah manggis dipotong kecil-kecil selanjutnya dikeringkan dalam lemari pengering, dibuat serbuk dengan menggunakan *blender* atau mesin penyerbuk. Etanol dengan kadar 40% ditambahkan untuk melakukan ekstraksi dari serbuk ini selama kurang lebih 2 (dua) jam kemudian dilanjutkan maserasi selama 24 jam. Setelah masuk ke tahap filtrasi, akan diperoleh filtrat dan residu. Filtrat yang didapatkan akan diteruskan ke tahap evaporasi dengan *Rotary evaporator* pada suhu 40 °C sehingga akhirnya diperoleh ekstrak. Proses pembuatan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* Linn.) dalam penelitian ini menggunakan etanol 40% sebagai pelarut.

b. Cara perhitungan dosis ekstrak kulit manggis

Dosis kulit manggis pada eksperimen ini adalah 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, 800 mg/kgBB, dimana dosis tersebut mempengaruhi sel yang rusak (Nugroho, 2011).

$$\begin{aligned} \text{Dosis tikus (100g)} &= 200\text{mg/kgBB}/100 \\ &= 0,2 \text{ Mg} \times 100 = 20 \text{ mg}/100\text{gBB} \end{aligned}$$

Dosis untuk 100 gram tikus adalah 20 mg/100gBB. Dalam penelitian ini kelompok kontrol negatif dan kontrol positif tidak diberikan ekstrak

kulit manggis (*Garcinia mangostana* Linn.). Dosis pertama ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* Linn.) diambil dari dosis normal tikus, sedangkan dosis kedua diambil dari hasil pengalihan 2x dosis pertama dan dosis ketiga diambil dari hasil pengalihan 4x dari dosis pertama atau 2x dari dosis kedua.

1) Dosis untuk tiap tikus kelompok 1

$$20 \text{ mg}/100\text{gBB}$$

2) Dosis untuk tiap tikus kelompok 2

$$2 \times 20 \text{ mg}/100\text{gBB} = 40 \text{ mg}/100\text{gBB}$$

3) Dosis untuk tiap tikus kelompok 3

$$4 \times 20 \text{ mg}/100\text{gBB} = 80 \text{ mg}/100\text{gBB}$$

Volume ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* Linn.) diberikan secara oral sebanyak 1 ml yang merupakan volume yang boleh diberikan berdasarkan pada volume normal lambung tikus yaitu 3-5 ml. Jika volume ekstrak melebihi volume lambung, dapat berakibat dilatasi lambung secara akut yang dapat menyebabkan robeknya saluran cerna (Ngatidjan, 2006).

3. Prosedur Pemberian Dosis Rifampisin

Dosis rifampisin yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Pannu *et al* (2008) bahwa dosis ini merupakan dosis toksik pada tikus, dengan dosis 1 g/kgBB per hari sudah dapat menginduksi peningkatan enzim sitokrom P450, peroksidasi lipid, aktivitas *superoxide dismutase* (SOD), trombositopenia, anemia hemolitik,

leukopenia transien, dan peningkatan *nucleated cell* pada sumsum tulang belakang serta penurunan berat kelenjar thymus secara signifikan pada tikus.

Hal ini berarti berat rerata tikus sekitar 100 mg atau 0,1 kg maka dosis perekor tikus sebesar :

$$1000 \text{ mg/kgBB} \times 0,1 \text{ kg} = 0,1 \text{ g} = 100 \text{ mg/100gBB}$$

Dosis rifampisin yang dipilih adalah rifampisin tablet sediaan 600 mg, hal ini dikarenakan pemberian peroral. Rifampisin tablet digerus dan dilarutkan dalam 1 ml aquadest. Jadi dalam 1 ml larutan rifampisin terdapat 100 mg/100gBB.

$$\frac{600 \text{ mg}}{6 \text{ ml}} = \frac{100 \text{ mg}}{x \text{ ml}}$$

$$x = \frac{100 \text{ mg} \times 6 \text{ ml}}{600 \text{ mg}} \quad x = 1 \text{ ml}$$

4. Prosedur Penelitian

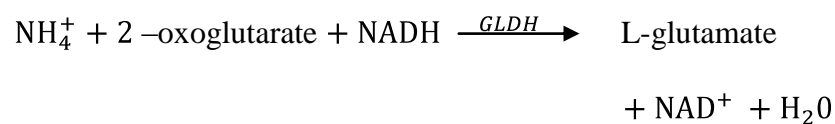
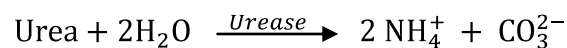
- a) Tikus sebanyak 25 ekor dalam 5 kelompok diadaptasikan di BPPV selama 7 hari sebelum diberi perlakuan.
- b) Dilakukan pengukuran berat badan masing-masing tikus dan diberi tanda sesuai kelompoknya.

- c) Kelompok I sebagai kontrol negatif, hanya yang diberi aquades. Kelompok II sebagai kontrol positif atau kontrol patologis diberikan rifampisin dengan dosis 100 mg/100gBB per tikus. Kelompok III, IV dan V diberikan induksi rifampisin sebesar 100 mg/100gBB per tikus. Kemudian selang 2 jam, kelompok III adalah kelompok perlakuan coba dengan pemberian dosis kulit manggis dengan dosis 20 mg/100 gBB, kelompok IV dengan dosis kulit manggis sebanyak 40 mg/100 gBB, dan kelompok V dengan dosis kulit manggis sebanyak 80 mg/100gBB. Masing-masing diberikan secara peroral dengan spuit 1cc bersonde tumpul selama 14 hari.
- d) Pada hari ke-15 tanpa diberi perlakuan, dilanjutkan dengan dilakukan pengambilan sampel darah. Pertama tikus dikeluarkan dari kandang dan ditempat terpisah dengan tikus lainnya kemudian ditunggu beberapa saat untuk mengurangi penderitaan pada tikus akibat aktivitas antara lain, pemindahan, penanganan, gangguan antar kelompok, dan penghapusan berbagai tanda yang pernah diberikan. Kedua Setelah itu, tikus dianestesi dengan Ketamine-xylazine 75-100 mg/kg + 5-10 mg/kg secara IP kemudian tikus di *euthanasia* berdasarkan *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) menggunakan metode *cervical dislocation* dengan cara ibu jari dan jari telunjuk ditempatkan dikedua sisi leher di dasar tengkorak atau batang ditekan ke dasar tengkorak. Dengan tangan lainnya, pada pangkal ekor atau kaki belakang dengan cepat ditarik sehingga menyebabkan pemisahan antara

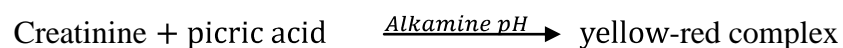
tulang leher dan tengkorak (AVMA, 2013). Setelah tikus dipastikan mati, darah di ambil melalui jantung dengan menggunakan alat suntik sebanyak ± 2 cc, kemudian langsung dimasukkan ke dalam *vacutainer SST (Yellow Top)* yang sudah berisi *Clot activator* dan *Inner separator* kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10-20 menit. Serum diambil dengan mikropipet sebanyak 200 μ L

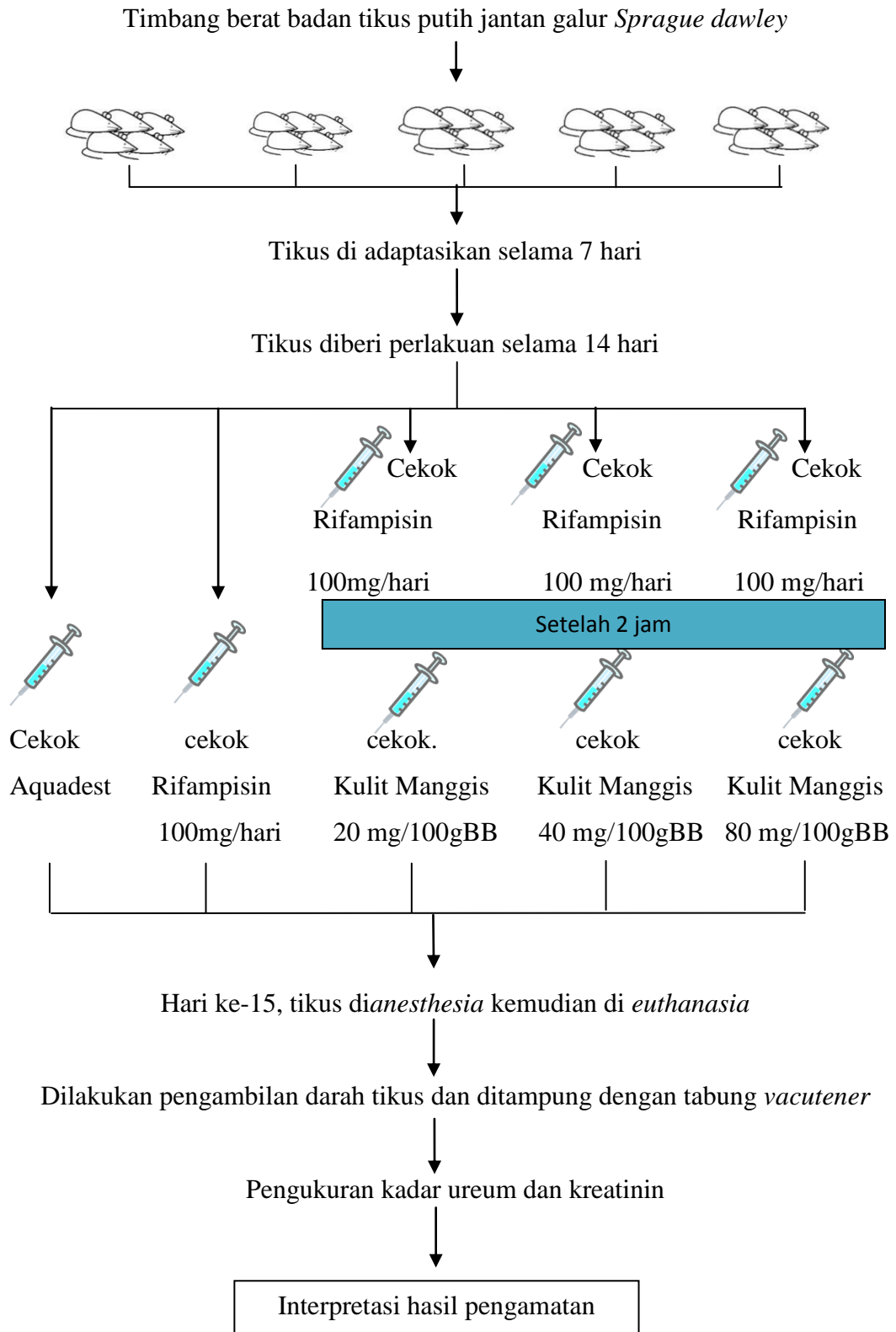
- e) Pengukuran kadar ureum dan kreatinin serum dengan menggunakan alat *Chemistry Autoanalyzer Diagnostic COBAS Integra 400 Plus*. Serum dianalisis secara *spektrofotometri* absorbansi 578 nm dan 512 nm dengan metode kinetik-*International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC) dan pembacaan hasil secara otomatis oleh alat ini, kemudian dilakukan analisis hasil penelitian. Pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Kimia Klinik RSUD Abdul Moeloek. Prinsip kerja:

- i. Prinsip Kerja Ureum (urea/BUN)



- ii. Prinsip Kerja Kreatinin





Gambar 5. Diagram alur penelitian

F. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel

- a. Variabel independen (variabel bebas) adalah dosis ekstrak etanol 40% kulit manggis (*Garcinia mangostana L.*).
- b. Variabel dependen (variabel terikat) adalah kadar serum ureum kreatinin.

2. Definisi Operasional Variabel

Tabel 2. Definisi operasional variable

Variabel	Definisi	Skala
Dosis ekstrak etanol kulit manggis	Ekstrak etanol kulit manggis yang diberikan pada perlakuan berupa cairan yang diberikan peroral dengan menggunakan spuit 1cc dengan berbagai macam dosis yang berbeda pada tiap kelompok percobaan. Dosis ekstrak etanol kulit manggis terdiri dari 20 mg/100 gBB, 40 mg/100 gBB dan 80 mg/100 gBB.	Numerik
Kadar ureum kreatinin serum	Pengamatan terhadap kadar ureum dan kreatinin melalui serum pada tikus putih jantan galur <i>Sprague dawley</i> yang diinduksi rifampisin 100 mg per oral berupa ada tidaknya pebedaan kadar ureum dan kreatinin pada tikus putih jantan dengan kelompok kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan hanya diberi pelet dan air maupun kelompok kontrol positif yang diberi rifampisin tanpa ekstrak etanol kulit manggis maupun kelompok perlakuan I, II, III yang diberi rifampisin dan ekstrak etanol kulit manggis selama 14 hari	Numerik

G. Analisis Data

Analisis data penelitian diproses dengan tingkat signifikansi $p=0,05$ dengan langkah-langkahnya sebagai berikut:

1. Uji Normalitas Data ($p>0,05$)

Pengujian normalitas data menggunakan Shapiro-Wilk *test* untuk mengetahui data berdistribusi normal atau tidak normal. Hasil uji normalitas ini untuk menentukan analisis berikutnya, yaitu analisis parametrik bila data berdistribusi normal atau non parametrik bila data tidak berdistribusi normal.

2. Uji Homogenitas data ($p > 0,05$)

Pengujian homogenitas data menggunakan uji Levene untuk mengetahui data homogen atau tidak homogen. Hasil uji homogenitas ini untuk menentukan analisis berikutnya, yaitu analisis parametrik bila data homogen atau non parametrik bila data tidak homogen.

3. Uji parametrik (*One-Way ANOVA*)

Untuk menguji perbedaan pengaruh kelompok I, kelompok II, kelompok III, kelompok IV, kelompok V.

4. Uji non-parametrik (*Kruskal Wallis*)

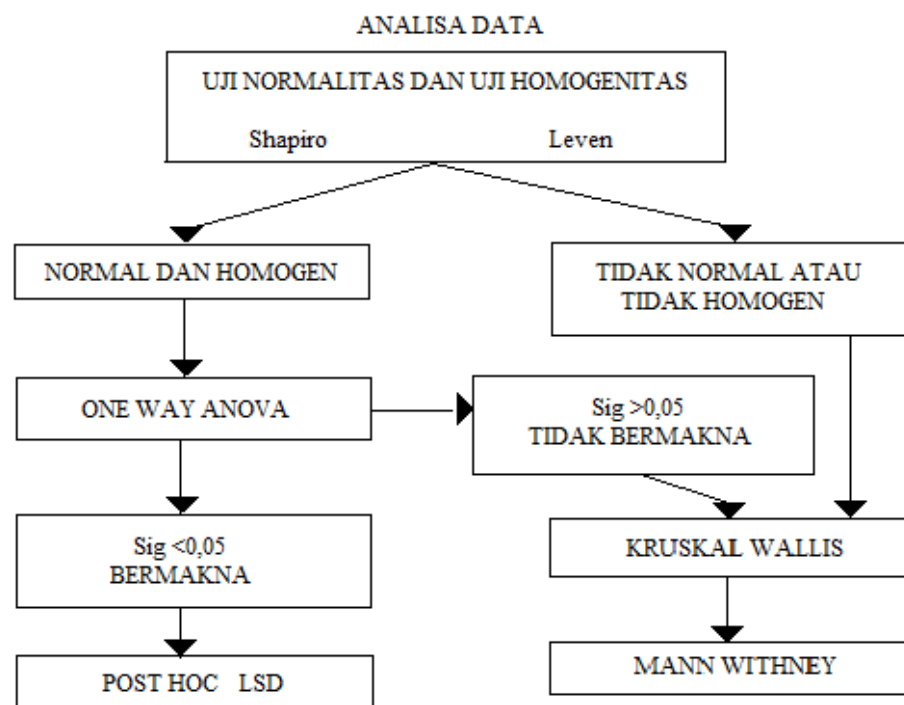
Untuk menguji perbedaan pengaruh kelompok I, kelompok II, kelompok III, kelompok IV, kelompok V dan merupakan uji alternatif dari *One-Way ANOVA*.

5. Analisis *Post Hoc*

Bila pada uji *One-Way ANOVA* menghasilkan nilai $p < 0,05$.

6. Uji *Mann-Whitney Test*

Bila pada uji *Kruskal Wallis* menghasilkan nilai $p < 0,05$ atau sebagai uji non-parametrik uji T tidak berpasangan.



Gambar 6. Diagram Analisa Data

H. ETIK PENELITIAN

Setiap penelitian yang menggunakan hewan percobaan secara etik harus menerapkan prinsip umum etika penelitian kesehatan dan prinsip 3R yaitu

replacement, *reduction* dan *refinement*. Pelakuan terhadap hewan percobaan dituangkan secara rinci dalam protokol penelitian sebagai pengganti *informed consent* pada subjek manusia.

- 1) *Replacement* (penggantian) adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.
- 2) *Reduction* (penyempitan) diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Jumlah minimum bisa dihitung dengan rumus Frederer. *Refinement* (pengurusan) adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawai (*humane*), memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakiti sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian.
- 3) Prinsip *refinement* berarti membebaskan hewan coba dari beberapa kondisi. Pertama adalah bebas dari rasa lapar dan haus dengan memberikan akses makan dan minum yang sesuai. Kedua, hewan percobaan bebas dari ketidak nyamanan, disediakan lingkungan bersih dan paling sesuai dengan biologi hewan percobaan yang dipilih. Ketiga, hewan coba harus bebas dari rasa nyeri dan penyakit dengan catatan tidak mengganggu penelitian yang sedang dijalankan. Keempat, saat euthanasia dilakukan dengan metode yang manusiawi oleh orang yang terlatih untuk meminimalisasi atau bahkan meniadakan penderitaan hewan coba.

Kelima, hewan harus bebas dari ketakutan dan stres jangka panjang. Semua prosedur dilakukan oleh tenaga yang kompeten, terlatih dan berpengalaman dalam merawat/memperlakukan hewan coba.

Uraian perlakuan pada hewan percobaan dapat dianalogikan sebagai *informed consent* bagi hewan dan menjadi penilaian dalam etika penelitian yang menggunakan hewan coba (Ridwan, 2013).