

III. METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik yang menggunakan metode rancangan acak terkontrol dengan pola *post test-only control group design*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Balai Penelitian dan Pengujian Veteriner (BPPV) untuk pemeliharaan tikus putih, pemberian perlakuan, dan pengamatan terhadap perlakuan selama 14 hari. Pemeriksaan aktivitas enzim serum dilakukan di Laboratorium Serologi Rumah Sakit Umum Daerah Abdul Moeloek (RSUDAM). Pembuatan ekstrak etanol kulit buah manggis di Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung. Penelitian berlangsung pada bulan September - Desember 2013.

C. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* berumur 10-16 minggu dengan berat badan antara 100-150 gram yang diperoleh dari Laboratorium Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Bogor. Sampel penelitian dipilih secara acak yang dibagi dalam 5 kelompok. Banyaknya jumlah sampel ditentukan dengan menggunakan rumus Frederer (dalam Birawati, 2012).

Rumus Frederer:

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

Keterangan:

n = besar sampel dalam tiap kelompok

t = banyaknya kelompok

Perhitungan jumlah minimal tikus yang digunakan dalam tiap kelompok:

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

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

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

Berdasarkan perhitungan tersebut, dalam percobaan ini digunakan sampel sebesar 5 ekor tikus putih untuk tiap kelompok, sehingga jumlah total sampel yang digunakan adalah 25 ekor. Satu kelompok berjumlah 5 ekor yang ditempatkan dalam satu kandang.

Kriteria inklusi:

- 1) Sehat (tidak tampak penampakan rambut kusam, rontok, atau botak, dan bergerak aktif)
- 2) Memiliki berat badan sekitar 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)
- 2) Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% selama masa adaptasi di BPPV
- 3) Mati selama masa pemberian perlakuan.

D. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan ada dua yaitu rifampisin dengan dosis 100 mg/100gBB dan ekstrak etanol 40% kulit manggis (*Garcinia*

mangostana Linn.) dengan dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB.

2. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut:

- a) Kandang tikus putih
- b) Neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01 gr, untuk menimbang berat tikus
- c) Sonde lambung
- d) Sduit 1 cc dan 3 cc
- e) *Handschoen*
- f) Tabung vacutainer non EDTA (*Gel and Clot Activator*) 3 ml
- g) Rak tabung vacutainer
- h) Label dan pena
- i) Sentrifuse 4000 rpm
- j) Mikropipet 200 μ L
- k) Tipp biru
- l) Alat pemeriksaan aktivitas enzim ALT yaitu *Chemistry Autoanalyzer Diagnostic COBAS INTEGRA 400 plus*.

E. Prosedur Penelitian

1. Adaptasi Tikus

Tikus putih sebanyak 25 ekor dilakukan pengelompokan dalam 5 kandang dimana masing-masing kandang terdiri dari 5 tikus. Sampel diadaptasikan di BPPV selama 7 hari. Kemudian dilakukan penimbangan dan penandaan untuk menentukan dosis. Selama masa adaptasi tikus diberi makan dan minum berupa pelet dan akuades.

2. Prosedur Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Manggis

a) Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Manggis

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

Menurut Sulistianto tahun 2004, ekstraksi dimulai dari penimbangan buah manggis (*Garcinia mangostana* Linn.). Kulit buah manggis dipotong kecil-kecil selanjutnya dikeringkan dalam almari pengering, dibuat serbuk dengan menggunakan *blender* atau mesin penyerbuk. Etanol dengan kadar 40% ditambahkan untuk melakukan ekstraksi dari serbuk ini selama kurang lebih 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 kental.

b) Cara Perhitungan Dosis Ekstrak Kulit Manggis

Dosis kulit manggis pada eksperimen ini adalah 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB, dimana dosis tersebut mempengaruhi sel yang rusak (Nugroho, 2009).

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

Dosis untuk 100 gram tikus adalah 20 mg. Dalam penelitian ini kelompok kontrol normal dan kontrol negatif 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 2× dosis pertama dan dosis ketiga diambil dari hasil pengalihan 4× dari dosis pertama atau 2× dari dosis kedua (Bahri *et al.*, 2012).

1. Dosis untuk tiap tikus kelompok III

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

2. Dosis untuk tiap tikus kelompok IV

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

3. Dosis untuk tiap tikus kelompok V

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

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 telah dilakukan Dhulley & Naik pada tahun 1998 tentang modulasi toksisitas rifampisin pada tikus putih *Sprague Dawley* dengan induksi interferon yang diperoleh dari *Aspergillus ochraceus* didapatkan dosis 1 g/kgBB tikus per hari sudah dapat menginduksi peningkatan enzim sitokrom P-450, peroksidase lipid, aktivitas *Super Oxide 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 tikus rerata sekitar 100 g atau 0,1 kg maka dosis perekor tikus sebesar :

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

Dosis rifampisin yang dipilih adalah rifampisin tablet sediaan 600 mg, hal ini dikarenakan pemberian peroral. Rifampisin tablet digerus dan dilarutkan dalam 6 ml aquadest.

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

Jadi, dalam 1 ml aquades terdapat 100 mg rifampisin. Volume yang diberikan pada setiap tikus adalah 1 ml.

4. Prosedur Penelitian

- a) Pada penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus putih jantan 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 normal, hanya yang diberi aquades. Kelompok II sebagai kontrol patologis atau kontrol negatif diberikan rifampisin dengan dosis 100 mg/100gBB per tikus. Kelompok III, IV dan V diberikan induksi rifampisin sebesar

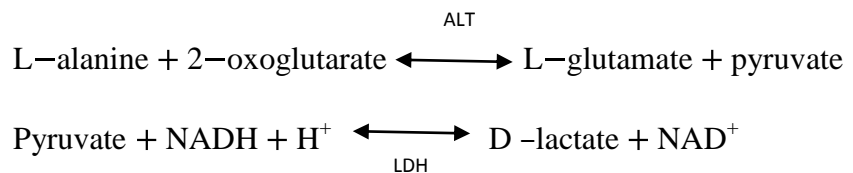
100 mg/100gBB per tikus. Kemudian selang 2 jam, kelompok III adalah kelompok perlakuan coba dengan pemberian dosis ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 20 mg/100gBB, kelompok IV dengan dosis ekstrak etanol kulit manggis sebanyak 40 mg/100gBB dan kelompok V dengan dosis ekstrak etanol kulit manggis sebanyak 80 mg/100gBB. Masing-masing diberikan secara peroral dengan spuit 1 cc bersonde tumpul selama 14 hari.

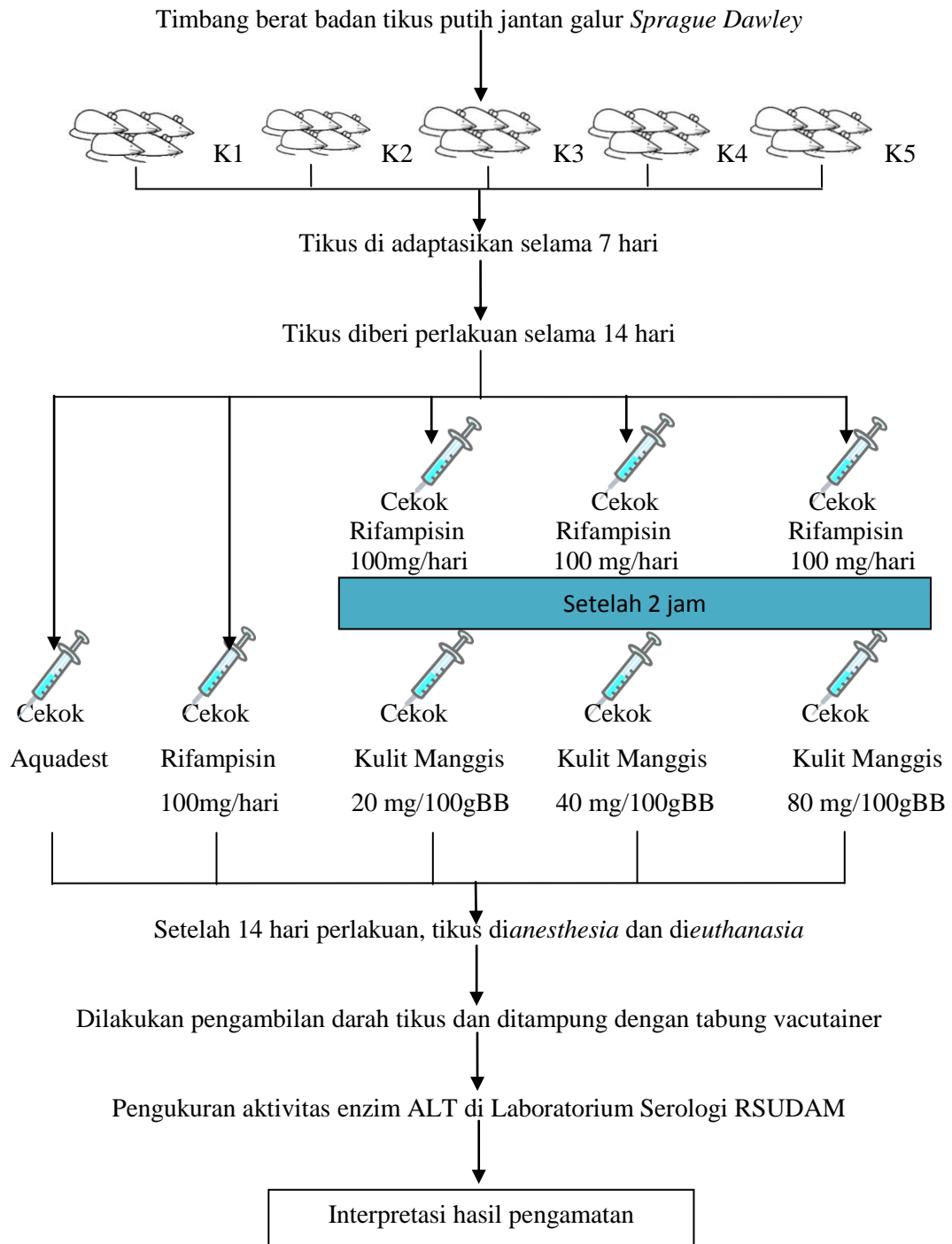
- d) Setelah 14 hari, perlakuan dihentikan. Tikus dikeluarkan dari kandang dan diletakkan terpisah dengan tikus lainnya kemudian ditunggu beberapa saat untuk mengurangi penderitaan pada tikus akibat aktivitas antara lain: pemindahan, penanganan, gangguan antar kelompok, dan penghapusan berbagai tanda yang pernah diberikan. 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 di kedua 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 diambil 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*.

- e) Darah yang sudah berhasil didapatkan, dipusingkan selama 10-20 menit pada kecepatan 4000 rpm. Serum yang terbentuk dipisahkan dari endapan sel-sel darah dengan menggunakan mikropipet sebanyak 200 μ L. Kemudian ditampung dalam capp sampel dan diletakkan pada rak untuk dilakukan pemeriksaan dengan alat *Chemistry Autoanalyzer Diagnostic COBAS INTEGRA 400 plus*.
- f) Pengukuran aktivitas enzim ALT diperiksa menggunakan spektrofotometri λ 340 nm dengan metode kinetik-*International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)* dan pembacaan hasil secara otomatis oleh alat ini. Pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Serologi RSUD Abdul Moeloek.

Prinsip kerja:





Gambar 4. Diagram alur penelitian

F. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel

- a) Variabel independen : Ekstrak etanol kulit manggis
- b) Variabel dependen : Aktivitas enzim ALT tikus putih jantan galur *Sprague Dawley* yang diinduksi rifampisin.

2. Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. Definisi operasional variabel

| Variabel | Definisi | Skala |
|---|--|---------|
| Dosis ekstrak etanol kulit manggis (<i>Garcinia mangostana</i> Linn.) | Ekstrak etanol kulit manggis yang diberikan pada perlakuan berupa cairan yang diberikan per oral dengan menggunakan spuit 1 cc dan sonde tumpul dengan berbagai macam dosis yang berbeda pada tiap kelompok percobaan. Dosis ekstrak etanol kulit manggis terdiri dari 20 mg/100gBB, 40 mg/100gBB, dan 80 mg/100gBB. | Numerik |
| Aktivitas enzim ALT pada tikus putih jantan galur <i>Sprague Dawley</i> yang diinduksi rifampisin | Pengamatan terhadap aktivitas enzim ALT melalui serum pada tikus putih jantan galur <i>Sprague Dawley</i> yang diinduksi rifampisin 100 mg per oral berupa ada tidaknya perbedaan aktivitas enzim ALT pada tikus putih jantan dengan kelompok kontrol normal yang tidak diberi perlakuan hanya diberi pelet dan air maupun kelompok kontrol negatif 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

Seluruh data yang diperoleh dari kegiatan penelitian dicatat secara rinci dan sistematis, kemudian dianalisis dengan program komputer. Hasil penelitian dianalisis apakah memiliki distribusi normal atau tidak secara statistik dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* ($p > 0,05$) karena jumlah sampel ≤ 50 . Kemudian, dilakukan uji *Levene* untuk mengetahui apakah dua atau lebih kelompok data memiliki varians yang sama atau tidak. Jika varians data berdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan dengan metode uji parametrik *one way analysis of varian* (ANOVA). Bila tidak memenuhi syarat uji parametrik, digunakan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*. Hipotesis dianggap bermakna bila $p < 0,05$. Jika pada uji *one way ANOVA* atau *Kruskal-Wallis* menghasilkan nilai $p < 0,05$, maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post-Hoc Least Significant Difference* (LSD) atau *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.

H. ETIKA PENELITIAN

Penelitian ini telah diajukan kepada Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk mendapatkan *ethical clearance*, dengan menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu:

- 1) *Replacement*, 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*, adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus Frederer yaitu $(n-1)(t-1) \geq 15$, dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan.
- 3) *Refinement*, adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi:
 - a. Bebas dari rasa lapar dan haus, pada penelitian ini hewan coba diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitum*.
 - b. Bebas dari ketidak-nyamanan, pada penelitian hewan coba ditempatkan di *animal house* dengan suhu terjaga 20-25°C, kemudian hewan coba terbagi menjadi 3-4 ekor tiap kandang. *Animal house* berada jauh dari gangguan bising dan aktivitas manusia serta kandang dijaga kebersihannya sehingga, mengurangi stress pada hewan coba.
 - c. Bebas dari nyeri dan penyakit dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan percobaan jika diperlukan, pada penelitian hewan coba diberikan perlakuan dengan

menggunakan *nasogastric tube* dilakukan dengan mengurangi rasa nyeri sesedikit mungkin, dosis perlakuan diberikan berdasarkan pengalaman terdahulu maupun literatur yang telah ada.

Prosedur pengambilan sampel pada akhir penelitian telah dijelaskan dengan mempertimbangkan tindakan manusiawi dan *anesthesia* serta *euthanasia* dengan metode yang manusiawi oleh orang yang terlatih untuk meminimalisasi atau bahkan meniadakan penderitaan hewan coba sesuai dengan IACUC (Ridwan, 2013).