

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 BPPV, sedangkan pemeriksaan dan pengamatan sampel dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Umum Daerah Dr. H. Abdoel Moeloek Lampung. Penelitian dilaksanakan selama 22 hari dari Oktober-November 2013.

C. Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Variabel bebas (*independent variable*) adalah ekstrak etanol 40% kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) yang diberikan kepada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague Dawley.

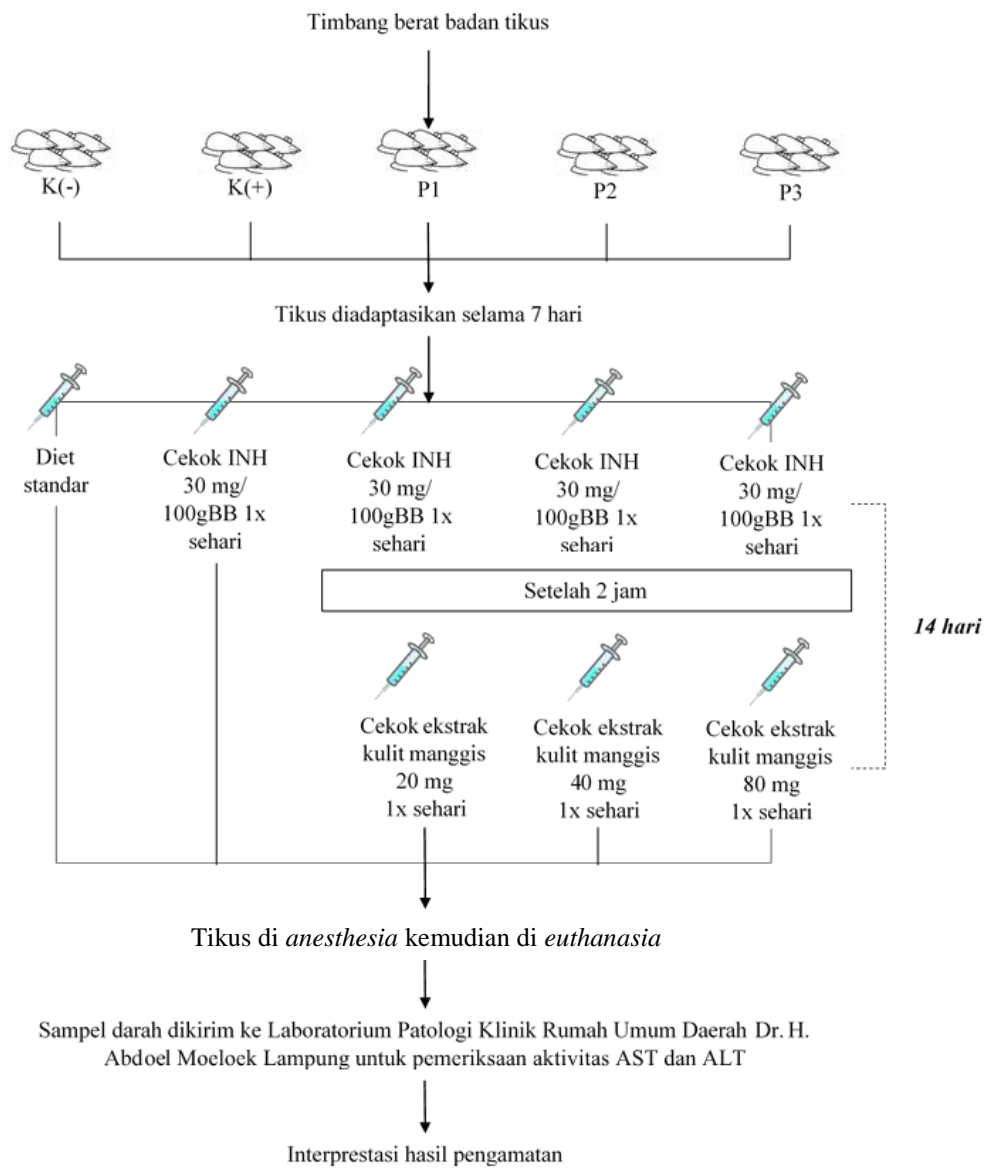
2. Variabel terikat (*dependent variable*) adalah tingkat aktivitas AST dan ALT tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague Dawley.

D. Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Hasil Ukur	Skala
1.	Kulit manggis (<i>Garcinia mangostana</i> L.) yang diekstraksi etanol 40%	Pemberian kulit manggis (<i>Garcinia mangostana</i> L.) yang diekstraksi etanol 40% sebanyak 20 mg, 40 mg, 80 mg per hari	mg/ml	Numerik
2.	Aktivitas AST dan ALT	Tingkat aktivitas AST dan ALT tikus putih jantan (<i>Rattus norvegicus</i>) galur Sprague Dawley	U/ L	Numerik

Tabel 1. Definisi operasional

E. Prosedur Penelitian



Gambar 6. Prosedur penelitian

1. Lama Penelitian

Berdasarkan penelitian Sodhi *et al.* dalam Ergul *et al.* (2010), lama penelitian yang dilakukan adalah selama 14 hari.

2. Prosedur Pemberian Dosis Isoniazid (INH)

Berdasarkan penelitian Sodhi *et al.* dalam Ergul *et al.* (2010) Dosis INH yang digunakan untuk menimbulkan efek toksik sebesar 50 mg/kgBB per hari. Jika dilakukan konversi untuk dosis tikus dewasa menurut Laurence dan Bacharach (1964) adalah sebagai berikut :

Berat manusia dewasa umumnya 70 kg jika dosis toksik 50 mg/Kg BB/hari maka dosis toksik total 3500 mg. Angka konversi dosis dari manusia 70 kg ke tikus 200 gr adalah 0,018. Sehingga dosis toksik isoniazid untuk tikus 200 gr adalah $0,018 \times 3500 \text{ mg} = 63 \text{ mg}$.

Rata-rata berat tikus yang digunakan pada penelitian ini adalah 100 g. Dosis toksik untuk tikus dengan berat 100 g adalah 31,5 mg untuk mempermudah, pembagian dosis dibulatkan menjadi 30 mg.

Dosis isoniazid yang dipilih adalah isoniazid tablet sediaan 300 mg, hal ini dikarenakan pemberian secara peroral dimana kadar puncak dicapai dalam waktu 1-2 jam setelah pemberian oral (Istiantoro & Setiabudy, 2012). Isoniazid tablet digerus dan dilarutkan dalam 10 ml aquadest. Sehingga, dalam 1 ml larutan isoniazid terdapat 30 mg.

3. Ekstrak Etanol 40% Kulit Manggis

a. Cara pembuatan ekstrak:

Proses pembuatan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) dalam penelitian ini menggunakan etanol sebagai pelarut. Berdasarkan, penelitian sebelumnya ke arah mekanisme ekstrak kulit buah manggis. Pada penelitian tersebut digunakan ekstrak kulit manggis yaitu: etanol 100%, 70 %, 40% dan air. Ternyata hasil dari penelitian yang dilakukan menyatakan ekstrak etanol 40% menunjukkan efek paling poten (Nakatani *et al.*, 2002).

Menurut Sulistianto dkk (2004), ekstraksi dimulai dari penimbangan buah manggis (*Garcinia mangostana* L.). 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 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 40⁰C sehingga akhirnya diperoleh ekstrak kering.

b. Cara perhitungan dosis ekstrak kulit manggis

Dosis kulit manggis pada eksperimen ini adalah 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB tikus yang didapat dari dosis penelitian yang sudah sering dilakukan sebelumnya, dimana dosis tersebut mempengaruhi sel yang rusak (Adiputro dkk, 2013).

Dalam penelitian ini kelompok kontrol negatif dan kontrol positif tidak diberikan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) sehingga dosis tikus pada setiap kelompok adalah:

1) Dosis untuk tiap tikus kelompok III

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

2) Dosis untuk tiap tikus kelompok IV

$$\begin{aligned}\text{Dosis tikus (100g)} &= 400\text{mg/kgBB}/100 \\ &= 0,4 \text{ mg} \times 100 \\ &= 40 \text{ mg}/100\text{gBB}\end{aligned}$$

3) Dosis untuk tiap tikus kelompok V

$$\begin{aligned}\text{Dosis tikus (100g)} &= 800\text{mg/kgBB}/100 \\ &= 0,8 \text{ mg} \times 100 \\ &= 80 \text{ mg}/100\text{gBB}\end{aligned}$$

Volume ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) 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).

4. Pengambilan Sampel Darah Tikus

Pengambilan sampel darah dilakukan pada akhir penelitian. 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. Setelah itu, tikus dianestesi dengan Ketamine-xylazine 75-100 mg/kg + 5-10 mg/kg secara IP kemudian tikus di *euthanasia* berdasarkan 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*.

5. Cara Pembuatan Serum

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 pipet sebanyak 200 μ L.

6. Prosedur Pemeriksaan Aktivitas AST dan ALT

Pemeriksaan menggunakan alat *Chemistry Autoanalyzer Diagnostic COBAS Integra 400 Plus*. Serum di analisis secara *spektrofotometri* absorbansi 340 nm dengan metode kinetik IFCC dan pembacaan hasil secara otomatis oleh alat ini.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang hewan, tempat pakan hewan, tempat minum hewan, neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01 g, untuk menimbang berat tikus, *Beaker glass*, sonde lambung, *disposable spuit 1cc*, *handschoen*, alat *centrifuge*, *Vacutainer SST (Yellow Top)*, mikropipet, tabung mikro, kapas, alkohol dan kamera digital.

2. Bahan

- a. Hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague Dawley berasal dari IPB Bogor dan memenuhi kriteria inklusi. Mendapat pakan standar dan minum secara *ad libitum*.

- b. Bahan perlakuan berupa :
 - 1) Pemberian induksi isoniazid.
 - 2) Ekstrak etanol 40% kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.).

G. Populasi dan Sampel

1. Populasi Penelitian

Populasi yang digunakan di dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague Dawley.

2. Sampel Penelitian

a. 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 (dewasa).

b. 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, genital);
- 2) Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi dilaboratorium;
- 3) Tikus mati sebelum penelitian selesai.

c. Besar Sampel

Sampel penelitian yang digunakan sebanyak 25 ekor tikus yang dipilih secara acak dan dibagi dalam 5 kelompok dengan pengulangan sebanyak 5 kali, sesuai dengan rumus Frederer (Supranto, 2007).

Rumus Frederer:

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

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

Keterangan:

n = besar sampel tiap perlakuan

t = banyaknya perlakuan

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampel menjadi:

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

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

$$n \geq 1+15/4$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \approx 5$$

Untuk mengantisipasi hilangnya unit eksperimen maka dilakukan koreksi dengan:

$$N = n/(1-f)$$

Keterangan:

N = Besar sampel koreksi

n = Besar sampel awal

f = Perkiraan proporsi *drop out* sebesar 10%

Sehingga,

$$N = n/(1-f)$$

$$N = 5/(1-10\%)$$

$$N = 5/(1-0,1)$$

$$N = 5/0,9$$

$$N = 5,55$$

$$N \approx 6$$

Jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 5 ekor ditambah 1 ekor antisipasi kehilangan unit. Oleh karena itu, penelitian kali ini menggunakan 25 ekor tikus yang dibagi ke dalam 5 kelompok ditambah 1 ekor sebagai antisipasi kehilangan unit eksperimen disetiap kelompok. Kelompok yang pertama adalah kelompok kontrol negatif. Pada kelompok ini tikus hanya diberikan pakan standar (normal) selama empat belas hari. Kelompok yang kedua adalah kelompok kontrol positif. Pada kelompok ini tikus diberikan pakan standar ditambah dengan induksi obat isoniazid. Kelompok yang ketiga, keempat dan kelima adalah kelompok perlakuan. Pada kelompok ini tikus diberikan pakan standar ditambah dengan induksi obat isoniazid dan ekstrak etanol 40% kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) masing-masing dengan dosis 20 mg, 40 mg dan 80 mg.

Rincian besar sampel yang dibutuhkan adalah sebagai berikut:

Kelompok	Besar Sampel
Kontrol negatif	5 ekor
Kontrol positif	5 ekor
Perlakuan 1	5 ekor
Perlakuan 2	5 ekor
Perlakuan 3	5 ekor
Antisipasi	5 ekor
Total Sampel	30 ekor

Tabel 2. Besar sampel penelitian

H. Pengumpulan Data

Data diperoleh dari pemeriksaan aktivitas AST dan ALT tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague Dawley pada akhir penelitian.

I. Pengolahan Data

Analisis data penelitian diproses dengan program pengolahan data dengan tingkat signifikansi $p=0.05$. Langkah pertama adalah dengan melakukan uji normalitas data yaitu dengan menggunakan uji *Saphiro-Wilk* dan homogenitas dengan *Levene*. Selanjutnya, jika didapatkan hasil $p>0.05$ maka distribusi data normal. Setelah itu dapat digunakan uji parametrik *one-way ANOVA*. Tetapi, jika distribusi data tidak normal (hasilnya $p<0.05$) maka digunakan uji alternatif yaitu uji *Kruskal-Wallis*. Jika didapatkan perbedaan signifikan pada *one-way ANOVA* ($p<0.05$), maka dapat dilanjutkan uji lanjutan *Post Hoc Test* dengan *Least Signifikan Difference* (LSD) antar kelompok untuk mengetahui

secara spesifik perbedaan antara kelompok perlakuan dan kontrol serta antar kelompok perlakuan. Sehingga didapatkan kelompok perlakuan mana yang mempunyai efek menurunkan aktivitas AST dan ALT paling baik. Untuk alternatif digunakan uji *Mann-Whitney*.

J. Ethical Clearance

Penelitian ini telah diajukan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, 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).