

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Bahan dan Hewan Coba

4.1.1. Bahan

Bahan yang di gunakan untuk penelitian adalah kombinasi ekstrak kering perikarpium manggis (*G. mangostana* L.) dan umbi bawang putih (*A. sativum* L.) yang diperoleh dari produksi dalam skala industri dengan menggunakan pengering *compresscell* + *corn starch* (tepung jagung) dan telah di standarisasi. Kedua ekstrak tanaman tersebut didapatkan dari Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

4.1.2. Bahan Kimia dan Bahan Lain

Bahan kimia yang di gunakan pada penelitian ini adalah :

- a. Untuk pembentukan kontrol negatif
 - Etanol 70%
 - *Corn Starch*
 - *Compresscell*
- b. Untuk pembuatan pelarut
 - CMC-Na
 - Aquadest

4.1.3. Hewan Percobaan

Dalam penelitian ini di gunakan hewan coba mencit putih (*Mus musculus*) galur balb-c, berumur \pm 8 minggu dengan berat badan 20-40 gram, berjenis kelamin jantan. Hewan coba di peroleh

dari Laboratorium Hewan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.

Banyaknya mencit yang digunakan dalam satu kelompok uji ditentukan dengan rumus *sample size* Lwanga dan Lameshow (1998) sebagai berikut :

$$n = \frac{2\sigma^2 \left(Z_{1-\frac{\alpha}{2}} + Z_{1-\beta} \right)^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

Dengan memasukkan data yang berasal dari penelitian Dr. Rathnakar U.P *et al*, 2010 diperoleh data :

- Level of significance (%) $\alpha = 5\%$
- Power of the test (%) $1 - \beta = 80\%$
- Population SD (SD kelompok kontrol negatif)
 $\sigma = 4,82$
- Population variance $\sigma^2 = 23,2324$
- Test value of the population mean $\mu_1 = 72.16$
(rata – rata pada kelompok kontrol negatif)
- Anticipate population mean $\mu_2 = 63.915$
(rata – rata pada kelompok uji)

Diperoleh *sample size* (n) sebesar 5 ekor. Setelah itu digunakan faktor koreksi (f) $= \frac{1}{1-f} \times n$, dengan f sebesar 20%.

Dari hasil faktor koreksi, maka digunakan 6 ekor mencit tiap kelompok.

4.2. Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang di gunakan pada penelitian ini adalah timbangan hewan coba (Barkel type EH No. 106.601), Neraca analitik (Adventurer Ohaus AR2140), mortir dan stamper, alat gelas, penggaris, kandang mencit, alat sonde, pot plastik, kolesterolmeter (EasyTouch® GCU Meter), *check strip* dan software analisis data.

4.3. Metode Penelitian

4.3.1. Rancangan Percobaan

Dalam uji kolesterol, ekstrak kering perikarpium manggis (*G. manggostana* L) dan ekstrak umbi bawang putih (*A. sativum*, L.) diawali dengan menginduksi mencit dengan aloksan, kemudian diberikan diet tinggi kolesterol (campuran telur puyuh dengan PTU 0,02%, kolesterol murni 2%) hingga mencit mengalami hiperkolesterol. Setelah mencit mengalami hiperkolesterol, kemudian diberikan kombinasi ekstrak kering perikarpium manggis (*G. manggostana* L) dan ekstrak umbi bawang putih (*A. sativum*, L.) secara peroral berulang satu kali sehari selama 7 hari. Dimana akan terdapat 5 kelompok dalam perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif (CMC-Na 0,5% + *Corn Starch* + *compresscell*), kelompok kontrol positif (pemberian obat atorvastatin), dosis 1 (23,3 mg/kgBB dengan perbandingan 1:1), dosis 2 (23,3 mg/kgBB dengan perbandingan 1:2), dan dosis 3 (23,3 mg/kgBB dengan perbandingan 2:1).

Tabel IV.1 : Rancangan percobaan

Kelompok	Perlakuan
I	Diberikan atorvastatin dengan dosis 0,026 mg/20 g BB mencit
II	Diberikan pembawa musilago CMC-Na 0,5%, <i>Corn Starch</i> , dan <i>Compresscell</i>
III	Diberikan kombinasi ekstrak kering perikarpium manggis dan umbi bawang putih dengan perbandingan 1:1 dalam CMC-Na 0,5% dengan dosis 23,3 mg/kgBB mencit
IV	Diberikan kombinasi ekstrak kering perikarpium manggis dan umbi bawang putih dengan perbandingan 1:2 dalam CMC-Na 0,5% dengan dosis 23,3 mg/kgBB mencit
V	Diberikan kombinasi ekstrak kering perikarpium manggis dan umbi bawang putih dengan perbandingan 2:1 dalam CMC-Na 0,5% dengan dosis 23,3 mg/kgBB mencit

4.3.2. Penyiapan Hewan Coba

Pertama-tama hewan coba diadaptasikan dengan lingkungan selama seminggu. Semua mencit putih dipelihara dengan cara yang sama dan dapat mendapat diet yang sama pula. Sebelum dilakukan perlakuan, semua mencit ditimbang untuk menghitung pengaturan dosis.

4.3.2.1. Penginduksian Kolesterol

Perlakuan pada hewan coba mencit kolesterol yaitu menginduksi aloksan dengan dosis 150mg/kg BB tikus dengan rute intraperitoneal (Etuk, 2010). Tetapi, sebelum penyuntikan aloksan, mencit dipuaskan terlebih dahulu selama 18 jam (hanya disediakan air). Setelah di induksi aloksan, mencit kemudian diberi diet kolesterol tinggi (campuran PTU 0,02%, kolesterol murni 2% dalam telur puyuh) hingga mengalami kolesterol. Tiga sampai empat hari setelah penyuntikan aloksan dan pemberian diet tinggi kolesterol (campuran PTU 0,02%, kolesterol murni 2% dalam telur puyuh), kadar kolesterol darah mencit diamati. Mencit yang digunakan adalah mencit dengan keadaan hiperkolesterol, yaitu kadar kolesterol LDL plasma diatas 130 mg/dL atau kadar trigliserida >100mg/dl dan kadar kolesterol 275-500 mg/dl (Kemenkes, 2013).

4.3.3. Pemilihan Dosis

4.3.3.1. Dosis Atorvastatin

Dosis awal atorvastatin oral bagi pasien dewasa adalah 10-20 mg sekali dalam sehari. Untuk pasien dengan PJK atau resiko PJK, pemakaian awal digunakan 1x40 mg, sehari (AHFS, 2011). Untuk konversi dari manusia (70 kg) ke mencit (20g) adalah sebesar 0,0026 (Laurence and Bacharach, 1964). Sehingga dosis atorvastatin untuk mencit adalah $0,0026 \times 10 \text{ mg} = 0,026 \text{ mg}/20 \text{ g}$ BB mencit.

4.3.3.2. Dosis uji campuran ekstrak kering perikarpium manggis dan umbi bawang putih

Dari penelitian yang dilakukan, ekstrak kulit manggis menunjukkan adanya aktivitas penurunan kadar kolesterol darah dalam tikus hiperkolesterolemia dengan konsentrasi 500mg/kg BB (Dyahnugra *et al.*, 2015) dan pada bawang putih 500mg/kg BB (Eidi, *et al.*, 2006). Maka untuk campuran dari kedua ekstrak tersebut diambil separuh dari dosis tunggal yang telah disebutkan, yaitu untuk manggis sebesar 250mg/kg BB tikus dan untuk bawang putih sebesar 250mg/kg BB tikus.

Dengan nilai konversi dari tikus (200 g) untuk mencit (20 g) adalah 0,14 (Laurence and Bacharach, 1964). Sebelum dikonversikan kedalam dosis mencit terlebih dahulu ketiga dosis tersebut dibuat dalam dosis tikus (200 g).

$$\text{Sehingga dosis manggis } \frac{200g}{1000g} \times 0,5g = \frac{100mg}{200g} \text{ BB tikus .}$$

Untuk mencit dengan berat badan 20 g dosis yang diberikan adalah dosis 100 mg x 0,14 = 14 mg/20g BB mencit. Setelah dikonversikan dalam ekstrak kering menjadi 23,3mg/20g BB mencit. Sedangkan untuk bawang putih adalah $\frac{200g}{1000g} \times 0,5g = \frac{100mg}{200g}$ BB tikus, untuk mencit dengan berat badan 20 g dosis yang diberikan adalah 100 mg x 0,14 = 14 mg/20g BB mencit. Setelah dikonversikan dalam ekstrak kering menjadi 23,3 mg/20g BB mencit.

4.3.4. Penyiapan Bahan Uji

4.3.4.1. Pembuatan Suspensi Atorvastatin

Dosis atorvastatin untuk tiap hewan coba mencit adalah $0,026 \text{ mg}/20 \text{ g}$ BB mencit. Untuk 25 ml suspensi atorvastatin dengan kadar $0,052 \text{ mg}/\text{ml}$ dibutuhkan atorvastatin sebanyak $25 \times 0,026 = 0,65 \text{ mg}$. Suspensi dibuat dalam CMC-Na $0,5\%$.

Cara pembuatan suspensi atorvastatin dalam CMC-Na $0,5\%$ adalah sebagai berikut :

1. Ambil 1 tablet atorvastatin 40 mg , digerus ad halus lalu ditimbang (misal= $A \text{ mg}$).
2. Timbang serbuk atorvastatin sebanyak $(1,3 \text{ mg}/40 \text{ mg}) \times A \text{ mg} = B \text{ mg}$ serbuk atorvastatin.
3. Timbang CMC-Na sebanyak $25 \times 0,5\% = 0,125 \text{ gram} \rightarrow 125 \text{ mg}$.
4. Dispersikan CMC-Na dalam air sebanyak 20 kali $\rightarrow 0,125 \text{ g} \times 20 = 2,5 \text{ ml}$.
5. Diamkan CMC-Na selama ± 15 menit, lalu aduk ad terbentuk musilago dan homogen.
6. Tambahkan $B \text{ mg}$ serbuk atorvastatin ke dalam musilago CMC-Na lalu aduk ad homogen.
7. Tambahkan aquades sedikit demi sedikit ke dalam campuran atorvastatin dan musilago, sambil diaduk.
8. Pindahkan campuran ke dalam labu ukur $25,0 \text{ ml}$ lalu tambahkan aquades ad tanda dan kocok ad homogen.

4.3.4.2. Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Pada kelompok kontrol negatif diberi campuran larutan CMC-Na 0,5% + *Corn Starch* + *compresscell* sebanyak 0,2 ml/20 g mencit.

4.3.4.3. Pembuatan Larutan Uji Dosis 1 (Perbandingan 1:1)

Sebanyak 11,65 mg ekstrak manggis (*G. mangostana* L.) dan 11,65 mg bawang putih (*A. sativum* L.) ditambahkan 1 mL larutan CMC-Na 0,5% sedikit demi sedikit sambil digerus. Untuk 25 mL larutan yaitu $11,65 \text{ mg} \times 25 \text{ mL} = 291,25 \text{ mg}/25\text{ml}$ ekstrak kering manggis (*G. mangostana* L.) dan $11,65 \text{ mg} \times 25 \text{ mL} = 291,25 \text{ mg}/25\text{ml}$ ekstrak kering bawang putih (*A. sativum* L.).

4.3.4.4. Pembuatan Larutan Uji Dosis 2 (Perbandingan 1:2)

Sebanyak 7,77 mg ekstrak manggis (*G. mangostana* L.) dan 15,53 mg bawang putih (*A. sativum* L.) ditambahkan 1 ml larutan CMC-Na 0,5% sedikit demi sedikit sambil digerus. Untuk 25 mL larutan yaitu, $7,77 \text{ mg} \times 25\text{ml} = 194,25 \text{ mg}/25\text{ml}$ ekstrak kering manggis (*G. mangostana* L.) dan $15,53 \text{ mg} \times 25\text{ml} = 388,25 \text{ mg}/25\text{mL}$ ekstrak kering bawang putih (*A. sativum* L.).

4.3.4.5. Pembuatan Larutan Uji Dosis 3 (Perbandingan 2:1)

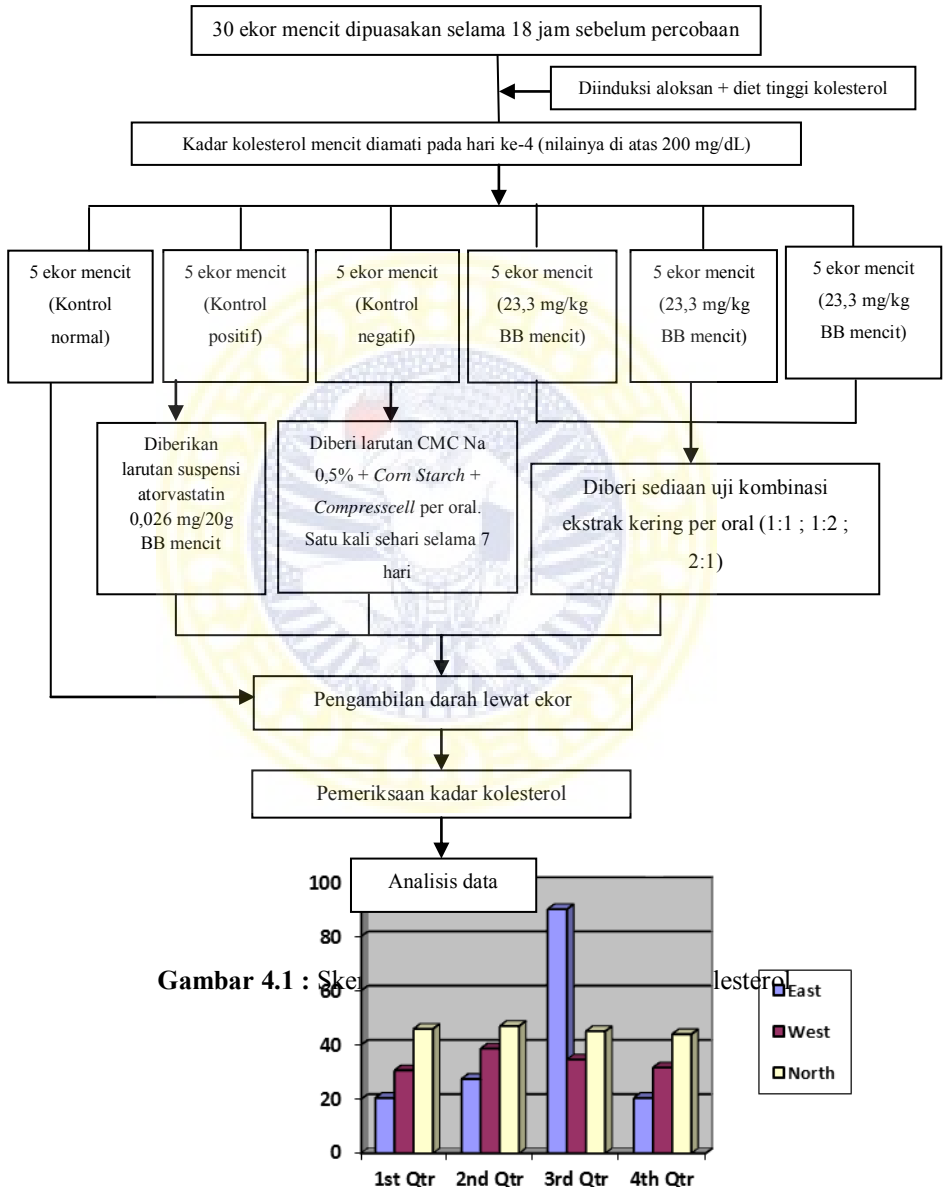
Sebanyak 15,53 mg ekstrak manggis (*G. mangostana* L.) dan 7,77 mg bawang putih (*A. sativum* L.) ditambahkan 1 ml larutan CMC-Na 0,5% sedikit demi sedikit sambil digerus. Untuk 25 ml larutan yaitu, $15,53 \text{ mg} \times 25\text{ml} = 388,25 \text{ mg}/25\text{ml}$ ekstrak kering

manggis (*G. mangostana* L.) dan $7,77 \text{ mg} \times 25\text{ml} = 194,25 \text{ mg}/25\text{ml}$ ekstrak kering bawang putih (*A. sativum*, L.).

4.3.5. Pengumpulan Data Uji

Disiapkan 6 kelompok mencit untuk dosis terpilih. Setiap kelompok terdiri dari 5 ekor mencit. Untuk semua kelompok kecuali kelompok kontrol, tiap hewan coba yang diberi kombinasi ekstrak kering manggis dan bawang putih dalam CMC-Na 0,5% dengan dosis masing-masing dengan pemberian dosis peroral berulang satu kali sehari selama 7 hari, masing –masing mencit tiap kelompok diambil darahnya dengan cara melukai ujung ekor mencit dengan jarum kemudian di cek dengan alat cek kolesterol dan diukur kadar kolesterol setelah pemberian *treatment* pada hari ke-0, ke-3, ke-5 dan ke-7.

4.3.6. Skema Kerja Pengujian Sampel Uji



Gambar 4.1 : Skema Kerja Pengujian Sampel Uji

4.3.7. Analisis Statistik

Aktivitas penurunan kolesterol plasma oleh kombinasi ekstrak kering manggis dan bawang putih dianalisis menggunakan metode *Anava One Way*. Hipotesis yang diajukan adalah :

H_0 = tidak ada sepasang kelompok yang berbeda secara signifikan.

H_a = minimal ada satu pasang kelompok yang berbeda secara signifikan.

Untuk menilai hipotesis statistik, ditentukan harga p hitung yang akan dibandingkan dengan harga tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0.05$). Untuk penelitian uji aktivitas penurun kolesterol ini, bila p hitung < harga $\alpha = 0.05$, maka H_0 ditolak dan H_a diterima.