

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun mangga kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm.) yang diperoleh dari Rantau, kabupaten Tapin, Kalimantan Selatan.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun mangga kasturi diambil secara acak berwarna hijau, tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda dan tidak rusak yang diperoleh dari Rantau, kabupaten Tapin, Kalimantan Selatan, pada bulan november tahun 2018.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak daun mangga kasturi yang diperoleh dari simplisia kering yang diserbuk.

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah pemeriksaan kadar trigliserida hasilnya dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Variabel utama yang ketiga adalah pemberian dosis tunggal ekstrak daun mangga kasturi 100mg/KgBB, 200mg/KgBB dan 400mg/KgBB.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama memuat identifikasi dari semua yang diteliti langsung. Variabel utama yang telah diidentifikasi ke dalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk mempelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak daun mangga kasturi dalam berbagai dosis.

Variabel tergantung merupakan variabel akibat dari variabel utama. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah penurunan kadar trigliserida dan penurunan berat badan terhadap tikus jantan putih.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel bebas. Variabel terkontrol dalam adalah kondisi fisik dari hewan uji meliputi berat badan, lingkungan tempat hidup, jenis kelamin, galur, kondisi percobaan, laboratorium, dan penelitian.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, tanaman mangga kasturi yang dipakai adalah daun yang didapat dari petani daerah yang diperoleh dari Rantau, kabupaten Tapin, Kalimantan Selatan.

Kedua, serbuk adalah simplisia kering daun mangga kasturi yang dihaluskan dengan penggiling dan diayak dengan pengayak ukuran mesh 40.

Ketiga, ekstrak daun mangga kasturi adalah ekstrak yang dihasilkan dari penyarian dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% kemudian dipekatkan di atas *rotary evaporator* pada suhu 40 °C.

Keempat, hewan uji yang dipakai adalah tikus jantan galur wistar dengan berat badan 150-200 g yang berumur 2-3 bulan.

Kelima, kadar trigliserida adalah trigliserida darah hewan uji yang diukur dengan alat microlab 300 sebelum dan sesudah pemberian ekstrak daun mangga kasturi setelah dipuasakan selama 12 jam. Penurunan kadar trigliserida hewan uji dilakukan dengan membandingkan kadar trigliserida yang terdapat pada hewan kontrol yang tidak diberi perlakuan.

C. Alat, Bahan dan Hewan Uji

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : alat untuk pembuatan ekstrak etanol daun mangga kasturi yaitu alat-alat gelas, kain flanel, kaca arloji, vacuum, oven, *rotary evaporator*, ayakan no. 40. Alat untuk mengukur kadar air adalah *Sterling-Bidwell*. Alat untuk perlakuan hewan uji yaitu timbangan analitik, spuit injeksi, jarum suntik oral, mikrohematokrit, dan alat sentrifuge, tabung sentrifuge, mikro pipet, dan microlab yang terdapat pada Laboratorium Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun mangga kasturi yang di dapat dari Rantau, kabupaten Tapin, Kalimantan Selatan. Dan digunakan Telur puyuh, pakan tikus (BR2), dan lemak babi, aquadest, reagen yang digunakan untuk identifikasi kandungan senyawa yaitu : serbuk Mg, larutan alkohol : HCl (1:1) dan pelarut amil alcohol, pereaksi larutan besi (III) klorida 1%, HCl 2N, reagen Dragendroff, reagen Liebermann Bourchard, reagen siap pakai tanpa pengenceran yang digunakan untuk mengukur kadar trigliserida yang berupa reagen dyasis trigliserida FS, etanol 70%, CMC 0,5 %, gemfibrozil sebagai kontrol positif.

3. Hewan uji

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih galur wistar usia 2-3 bulan dengan berat badan sekitar 150-200 g sebanyak 30 ekor. Pengelompokan dilakukan secara acak 5 ekor perkelompok. Semua tikus dipelihara dan dirawat dengan cara yang sama, mendapat perlakuan yang sama, ukuran kandang yang sesuai dengan temperatur ± 10 °C. Penerangan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap, selama penelitian kebutuhan makanan dan minuman harus selalu terkontrol agar kondisi tikus tetap sehat.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman kasturi

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan makroskopis dan mikroskopisnya. Hal ini dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri morfologis tanaman pada pustaka yang dibuktikan dengan determinasi yang dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Pengumpulan, pengeringan dan pembuatan serbuk

Sampel yang digunakan adalah daun mangga kasturi yang diperoleh dari Rantau, kabupaten Tapin, Kalimantan Selatan. Daun kasturi kemudian dicuci dengan air untuk membersihkan kotoran dan debu yang menempel pada daun lalu

ditiriskan dan dikeringkan dengan oven pada suhu 40 °C. Setelah itu dilakukan sortasi kering dan diserbuk dengan menggunakan mesin serbuk serta diayak dengan menggunakan pengayak no.40 sampai didapatkan serbuk daun mangga kasturi yang diinginkan.

3. Penetapan kadar air serbuk daun mangga kasturi

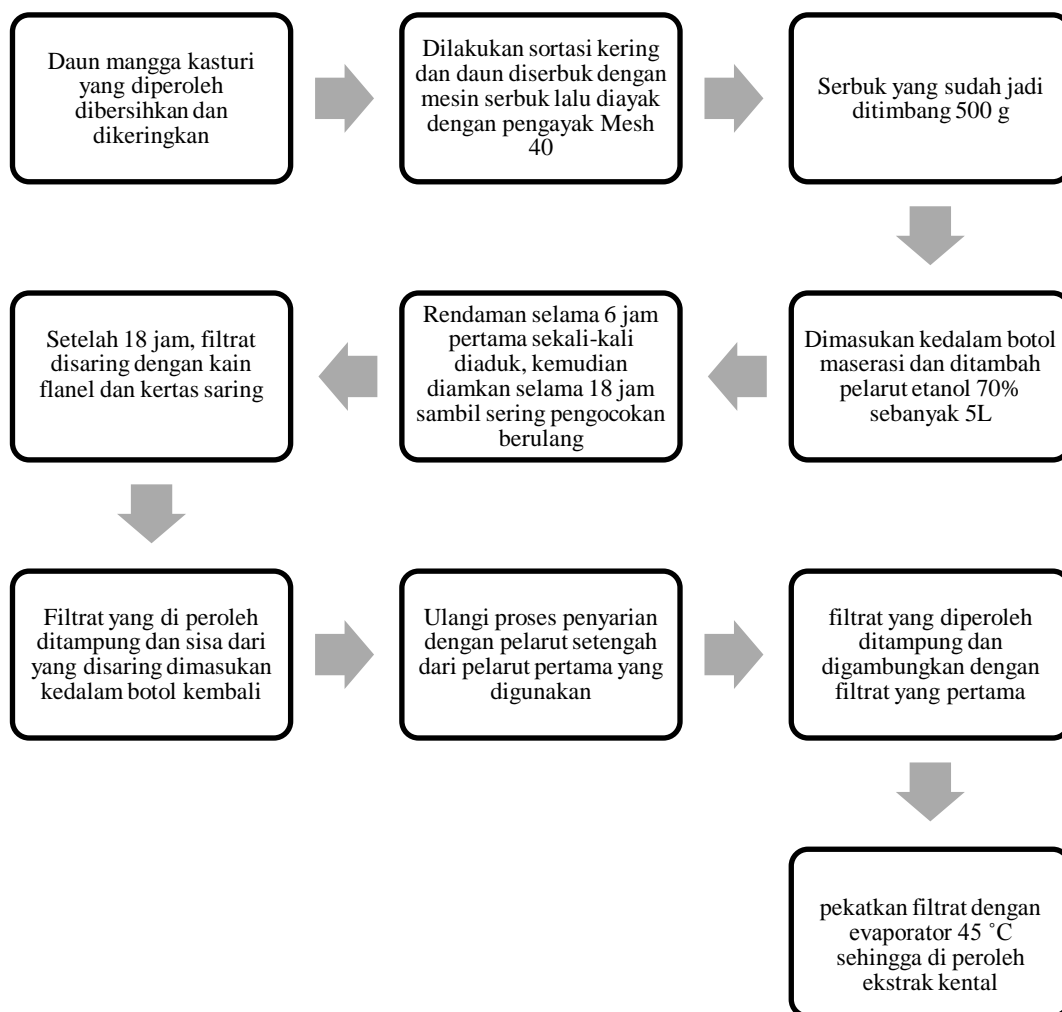
Penetapan kadar air daun mangga kasturi dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Caranya dengan menimbang serbuk daun mangga kasturi sebanyak 20 gram dimasukkan kedalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut sampai serbuk terendam, kemudian memasang alat *Sterling-Bidwell*, tahap selanjutnya dipanaskan. Cairan pembawa yang digunakan adalah xylene karena xylene memiliki titik didih lebih tinggi dari pada air dan tidak bercampur dengan air sehingga memudahkan dalam penetapan kadar air. Pemanasan dihentikan bila air pada penampung tidak menetes lagi (kurang lebih 1 jam), kemudian diukur kadar airnya dengan melihat volume pada skala alat tersebut dan dihitung % air dari berat sampel (Sudarmadji *et al.* 1997). Selanjutnya dihitung kadar air dalam satuan persen dengan rumus:

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume terbaca}}{\text{Berat bahan}} \times 100\%$$

4. Pembuatan ekstrak daun mangga kasturi

Pembuatan ekstrak etanol daun mangga kasturi dilakukan dengan cara mengambil daun yang telah diserbuk, kemudian ditimbang sebanyak 500 gram. Serbuk dimasukan ke dalam botol maserasi berwarna gelap dan ditambahkan etanol 70% sebanyak 5000 ml. Rendam selama 6 jam pertama sekali-kali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam sambil sering diaduk dan pengocokan berulang. Setelah 18 jam, filtrat disaring dengan kain flanel dan kertas saring. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama.

Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan penguap vakum atau penguap dengan tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental. Persen rendemen dihitung berdasarkan persentase bobot per bobot (b/b) antara rendemen yang didapatkan dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan (Depkes 2008).



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanol serbuk daun mangga kasturi

5. Penetapan kadar air ekstrak daun mangga kasturi

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi toluen. Toluene yang digunakan dijenuhkan dengan air terlebih dahulu. Ditimbang seksama ekstrak sebanyak 2 g dan dimasukkan kedalam labu alas bulat dan ditambahkan toluene yang telah dijenuhkan. Labu dipanaskan hati-hati selama 15 menit, setelah toluene mulai mendidih, penyulingan diatur 2 tetes/detik, lalu 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling dilanjutkan pemanasan selama 5 menit. Dibiarkan tabung penerima dingin hingga suhu kamar. Volume air dibaca sesudah toluene dan air memisah sempurna. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali kemudian dihitung persentasenya (Saifudin, Rahayu, & Teruna 2011).

6. Identifikasi kandungan senyawa

6.1 Identifikasi flavonoid. Ekstrak etanol daun mangga kasturi dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0,1 g serbuk Mg, ditambah 2 ml larutan alkohol : HCl (1:1) dan pelarut amil alkohol, lalu dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau kuning atau jingga pada amil alkohol (Harborne 1987).

6.2 Identifikasi tanin. Sejumlah ekstrak daun mangga kasturi ditambah 20 ml air panas kemudian dididihkan selama 15 menit, setelah dingin disaring. Sebanyak 5 ml filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi larutan besi (III) klorida 1%. Jika tanin positif maka akan terbentuk warna hijau violet setelah direaksikan dengan larutan besi (III) klorida (Harborne 1987).

6.3 Identifikasi saponin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun mangga kasturi dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah air panas 10 ml dan dikocok kuat-kuat. Tambahkan 1 tetes HCl 2N dan amati jika terjadi reaksi positif yang ditunjukkan dengan buih yang terbentuk setinggi 1-10 cm dan tidak hilang (Harborne 1987).

6.4 Identifikasi alkaloid. Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan cara ekstrak simplisia sebanyak 0,5 g dilarutkan dalam 100 ml air panas, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrate sebanyak 5 ml dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan dengan 1,5 ml HCl 2% kemudian dilanjutkan dengan penambahan 2 sampai 4 tetes reagen Dragendroff. Alkaloid positif terjadi kekeruhan atau endapan coklat (Harborne 1987).

6.5 Identifikasi steroid & terpenoid. Sejumlah tertentu ekstrak ditambahkan dengan satu tetes Liebermann Bouchard yang terdiri dari 1 ml asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat 1 tetes. Terbentuk warna merah berubah menjadi hijau, ungu dan terakhir biru, menunjukkan positif steroid dan triterpenoid (Harborne 1987).

7. Pembuatan larutan CMC 0,5 %

Larutan CMC 0,5% adalah larutan yang digunakan sebagai kontrol negatif. Cara pembuatan suspensi larutan CMC 0,5% dibuat dengan cara

melarutkan 500 mg CMC, dikembangkan dengan 10 ml aquadest panas. Setelah mengembang cukupkan volumenya dengan aquadest sampai 100 ml, aduk hingga homogen.

8. Penentuan dosis gemfibrozil

Dosis Gemfibrozil ditentukan berdasarkan dosis manusia dengan berat badan 70 kg. Konversi dosis yang digunakan adalah konversi yaitu 0,018. Dosis Gemfibrozil untuk manusia adalah 600mg, sehingga jika dikonversikan ke tikus menjadi 10,8 mg/200 gram BB tikus.

9. Pembuatan pakan diet lemak tinggi

Diet tinggi lemak yang diberikan pada tikus berupa lemak babi dan kuning telur diberikan secara per oral bertujuan untuk menginduksi kenaikan kadar trigliserida. Komposisinya terdiri dari 40 ml lemak babi dan 10 gram kuning telur puyuh. Cara pembuatannya memanaskan lemak berupa padatan sehingga diperoleh minyak lemak babi. Kemudian minyak lemak babi tersebut dicampur dengan kuning telur sehingga didapatkan suatu campuran berbentuk cairan. Pakan diet lemak tinggi dibuat baru setiap hari sebelum diberikan per oral pada tikus yang dilakukan dua kali sehari dengan masing – masing 2,5 ml (Widyaningsih 2011). Induksi secara endogen dilakukan dengan pemberian PTU 2 mg/KgBB/hari dengan sonde per oral selama 2 minggu (Anjani *et al.* 2015).

10. Uji hiperlipidemia

10.1 Persiapan hewan. Tikus diaklimatisasi selama 7 hari. Sebelum ditempatkan pada kandang dilakukan penimbangan bobot badan tikus. Selama aklimatisasi tikus diberi makan dan minum, hewan yang berat badanya turun dari 5% dari berat badan semula tidak digunakan.

10.2 Pengelompokan hewan uji. Hewan uji dibagi menjadi 6 kelompok, pengelompokan hewan uji dilakukan secara acak lengkap dengan jumlah minimal per kelompok mengikuti rumus Federer (Syam *et al.* 2011) yaitu :

$$(n-1)(t-1) > 15$$

Keterangan :

t : jumlah perlakuan

n : jumlah pengulangan untuk tiap perlakuan

$$\begin{array}{rcl}
 \text{maka: } (n-1)(t-1) & \geq & 15 \\
 (n-1)(6-1) & \geq & 15 \\
 (n-1)(5) & \geq & 15 \\
 5n-5 & \geq & 15 \\
 5n & \geq & 20 \\
 n & \geq & 4
 \end{array}$$

10.3 Penanganan hewan uji. Pada penelitian ini dilakukan pengukuran terhadap kadar trigliserida tikus putih jantan jumlah tikus yang digunakan adalah 30 ekor tikus putih jantan yang terbagi dalam 6 kelompok. Masing-masing kelompok perlakuan berjumlah 5 ekor tikus putih jantan. Perlakuan hewan pada pengukuran kadar trigliserida dilakukan berdasarkan masing-masing kelompok perlakuan yang telah dibagi secara acak sebagai berikut:

- Kelompok I : sebagai kelompok normal yang diberi pakan standar BR II dan air minum.
- Kelompok II : sebagai kelompok negatif diberi pakan standar BR II, dan diet lemak tinggi, CMC.
- Kelompok III : Sebagai kelompok positif diberikan pakan standar BR II ditambah diet lemak tinggi, ditambah suspensi gemfibrozil 10,8mg/200 gram BB tikus.
- Kelompok IV : Kelompok perlakuan diberi makan BR II dan diet lemak tinggi dan pemberian dosis tunggal ekstrak daun mangga kasturi 100 mg/kgBB tikus.
- Kelompok V : Kelompok perlakuan diberi makan BR II dan diet lemak tinggi dan pemberian dosis tunggal ekstrak daun mangga kasturi 200 mg/kgBB tikus.
- Kelompok VI : Kelompok perlakuan diberi makan BR II dan diet lemak tinggi dan pemberian dosis tunggal ekstrak daun mangga kasturi 400 mg/kgBB tikus.

11. Pengukuran kenaikan bobot badan

Sebelum di karantina 30 ekor hewan uji ditimbang bobot badannya pada setiap kelompok perlakuan setiap minggu atau selama 21 hari. Penimbangan selanjutnya dilakukan pada hari ke-0, hari ke-14, dan hari ke-21. Setiap perubahan kenaikan bobot badan akan dimasukkan ke dalam tabel.

12. Pengujian kadar trigliserida serum darah tikus

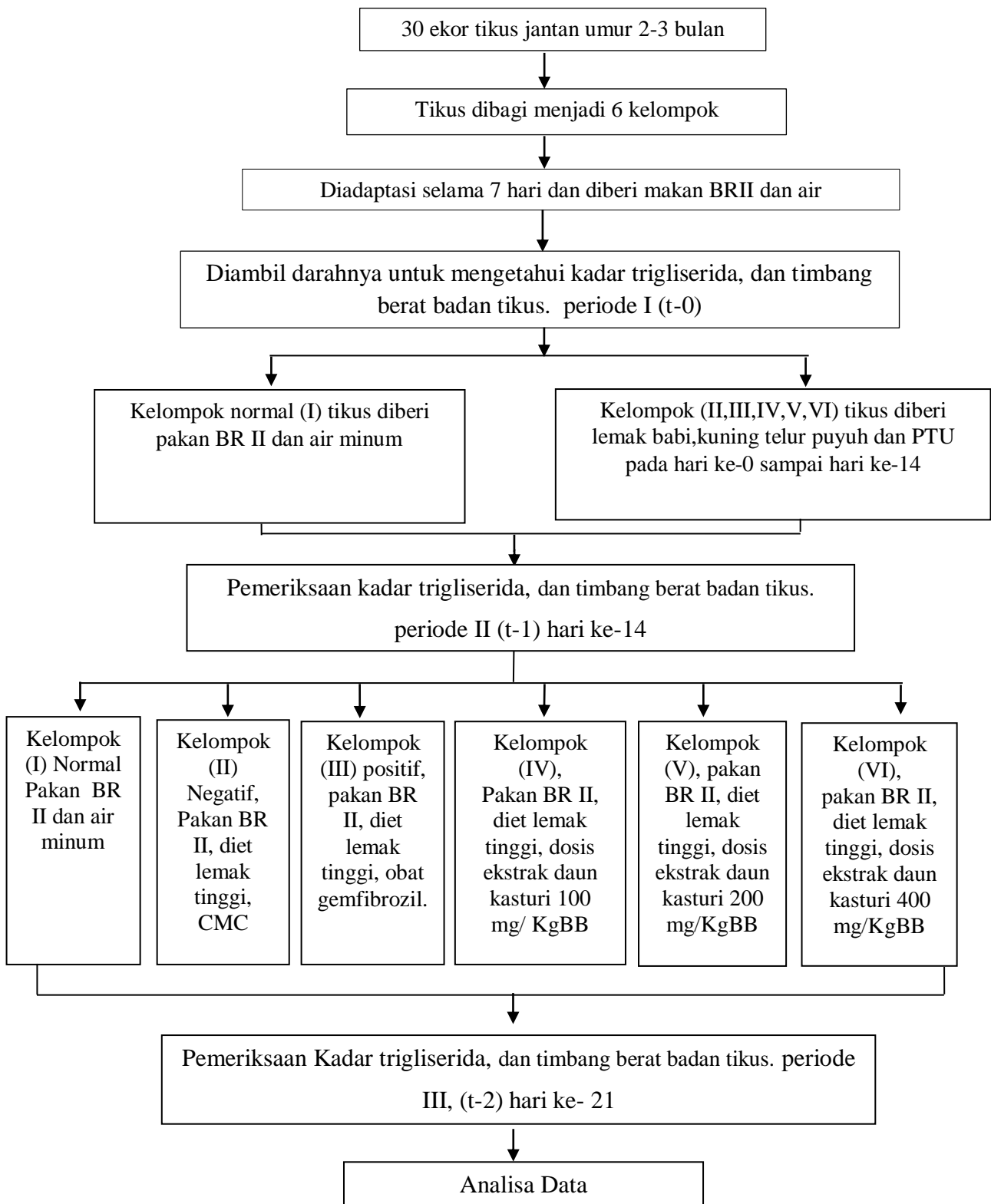
Pengukuran kadar trigliserida pada serum darah tikus putih dilakukan dalam tiga periode. Periode I (menentukan kadar awal pada hari ke-0) dilakukan dengan mengukur kadar trigliserida awal masing-masing hewan tikus. Periode II (kadar pada hari ke-14) dilakukan pengukuran kadar trigliserida hewan uji setelah perlakuan diet lemak tinggi untuk melihat kondisi hiperlipidemia pada hewan uji. Periode III (kadar pada hari ke 21) merupakan pengukuran kadar trigliserida setelah pemberian perlakuan ekstrak daun mangga kasturi selama 14 hari (Hardisari 2016).

Cara menentukan kadar trigliserida pada penelitian ini memakai cara langsung dengan metode GPO-PAP yang berlangsung pada satu tahap yaitu darah diambil dari *vena orbitalis plexus* pada hari ke-0, hari ke-14, dan hari ke-21 menggunakan pipa kapiler sebanyak 1ml ditambahkan EDTA. Serum darah yang diambil melalui vena mata dari hewan uji disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit kemudian serumnya dipisahkan untuk 10 µl serum ditambah 1000 µl pereaksi trigliserida yang kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 20-25⁰C atau diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37⁰C, lalu diamati serapannya menggunakan alat microlab 300 sehingga didapat kadar trigliserida serum darah tikus (Hardisari 2016).

13. Analisis hasil

Data yang diperoleh pada penelitian ini adalah data penambahan berat badan, penurunan kadar trigliserida serum darah tikus dan penimbangan berat lemak abdomen. Analisis data terlebih dahulu dilihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji Saphiro Wilk (data berjumlah < 50). Jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji parametik (ANOVA). Jika terdapat perbedaan ($p < 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji Post Hoc Test, dilanjutkan dengan uji Tukey nilai p-value ($p < 0,05$), menggunakan SPSS 20.0 For Windows.

14. Skema penelitian



Gambar 4. Skema Jalannya Penelitian