

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang melibatkan senyawa AEW1 dalam menentukan ED<sub>50</sub> sebagai antiinflamasi.

#### **B. Tempat dan Waktu**

Penentuan ED<sub>50</sub>AEW1 dilakukan pada bulan September 2016 sampai dengan Mei 2017 di laboratorium teknologi farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

#### **C. Identifikasi Variabel Penelitian**

1. Variabel Dependen

Volume edema kaki hewan uji

2. Variabel Independen

Varian dosis pemberian senyawa AEW1

3. Variabel terkontrol

Pemberian pakan, kandang pemeliharaan, berat badan dan umur hewan uji

#### **D. Definisi operasional**

- a. Metode *induced paw edema*: penginduksian inflamatorik terhadap hewan uji dan diukur edema pada kaki hewan uji menggunakan alat pletismometer.
- b. Edema kaki tikus: penambahan volume telapak kaki tikus yang diukur menggunakan pletismometer setiap 30 menit selama 4 jam.

#### **E. Instrumen Penelitian**

##### 1. Alatuji aktivitas antiinflamasi

Alat yang digunakan dalam penentuan  $ED_{50}$  sebagai antiinflamasi adalah alat-alat gelas (*Pyrex-Germany*), penangas air, alat suntik dengan jarum yang dimodifikasi untuk pemberian oral (*One Med®*), *disposable syringe* 1 ml subplantar (*One Med®*), pletismometer (*Ugo Basile*), stopwatch, dan timbangan analitik (*Mettler Toledo*).

##### 2. Bahan dan Hewan Uji

Bahan yang disiapkan pada penentuan  $ED_{50}$  adalah senyawa AEW1 yang sintesis oleh Kurniawan dan telah diuji kemurniannya dengan uji KLT terlampir. Sintesis senyawa dilakukan di laboratorium teknologi farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta sesuai dengan penelitian sebelumnya. Natrium diklofenak 50 mg (*Novell®*), Suspensi yang digunakan adalah CMC

0,5% (*Brataco*®). Karagenin 1% (*Brataco*®) adalah agen inflamator yang digunakan dan suspensi karagenin adalah NaCl 0,9 % (*Otsuka*®).

Hewan uji yang digunakan adalah tikus jantan galur wistar berumur kurang lebih 2 bulandengan berat badan 100-200gram yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok perlakuan berisi 4 ekor tikus.

## **F. Cara Kerja**

### **1. Pembuatan suspensi Na CMC 0,5%**

Sebanyak 500 mg Na CMC ditaburkan merata ke dalam mortir yang telah berisi air suling panas sebanyak 35 ml. Campuran didiamkan selama 15 menit hingga diperoleh massa yang transparan, kemudian diaduk sampai terbentuk gel dan diencerkan dengan sedikit air panas. Suspensi dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml, lalu ditambah air suling sampai garis tanda.

### **2. Pembuatan suspensi senyawa AEW1 40 mg/200gBB, 20 mg/200gBB, dan 10 mg/200gBB dengan suspensi CMC 0,5%.**

Pembuatan suspensi senyawa mengikuti penelitian Wibowo (2013). Senyawa AEW1 ditimbang sebanyak 40 mg, 20 mg, dan 10 mg, kemudian diaduk dengan penambahan suspensi CMC 0,5% sebanyak 3 ml pada setiap dosis sampai homogen. Sehingga didapatkan konsentrasi 40 mg/3 ml, 20 mg/3 ml, dan 10 mg/3 ml.

### **3. Pembuatan larutan natrium diklofenak 2,7 mg/200gBB dalam 3 ml suspensi Na CMC 0,5%.**

Natrium diklofenak yang digunakan adalah tablet natrium diklofenak generik (*Novell*®). Sebanyak 2.7 mg natrium diklofenak yang sudah digerus kemudian ditambahkan suspensi Na CMC 0,5% sebanyak 3 ml sehingga didapatkanlah natrium diklofenak dengan konsentrasi 0.9 mg/ml. Suspensi kemudian diaduk hingga homogen.

4. Pembuatan inflamator karagenin 1% dengan suspensi NaCl 0,9 %.

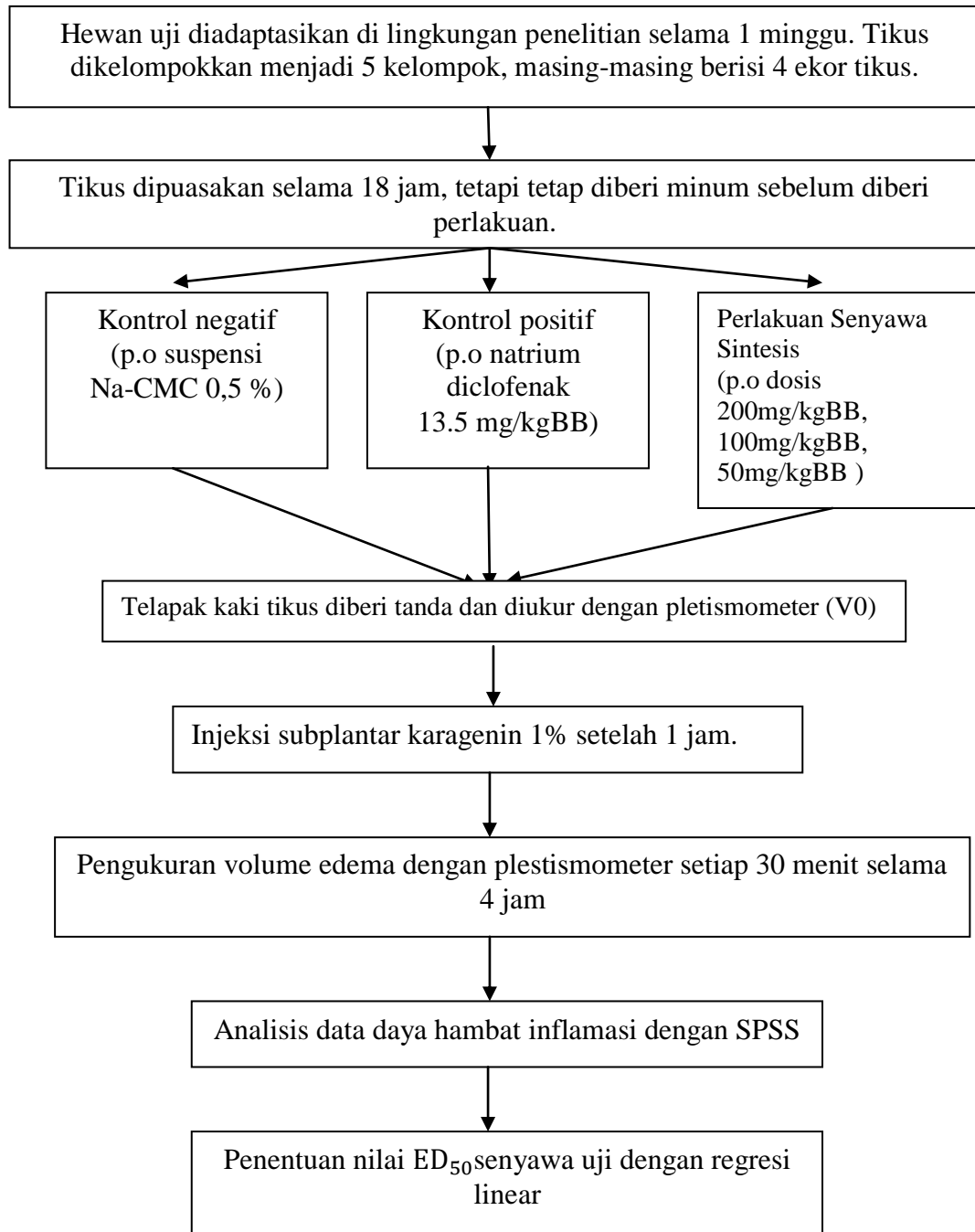
Seratus miligram karagenin ditimbang sebanyak 0,1 g, selanjutnya dihomogenkan dengan larutan NaCl 0,9 % sebanyak 10 ml. Kemudian diaduk diatas *waterbath* dengan suhu 37°C sampai larut.

5. Uji antiinflamasi

Sebelum dilakukan pengujian, hewan uji dipuasakan selama 18 jam. Penelitian ini mengamati respon inflamasi terhadap edema kaki tikus. tikus yang digunakan adalah galur Wistar, kurang lebih 2 bulandengan berat badan antara 100-200 gram sebanyak 20 ekor. Dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yang masing-masing kelompok berjumlah 4 ekor, yakni sebagai berikut: Kelompok I (kontrol negatif yaitu Na-CMC 0.5%), Kelompok II (kontrol positif yaitu Natrium diclofenak 13,5mg/KgBB), Kelompok III (kelompok perlakuan yaitu senyawa AEW1 dengan dosis 50mg/kgBB)., Kelompok IV (kelompok perlakuan yaitu senyawa AEW1 dengan dosis 100mg/KgBB), Kelompok V (kelompok perlakuan yaitu senyawa AEW1 dengan dosis 200mg/kgBB).

Selanjutnya diukur volume telapak kaki tikus pada alat plethysmometer yang kemudian ditetapkan sebagai volume awal kaki tikus atau disebut juga volume dasar ( $V_0$ ). Setelah 1 jam dari pemberian pembanding dan variasi dosis senyawa uji secara peroral kemudian dilakukan injeksi karagenin 1% sebanyak 0.1ml secara subplantar pada telapak kaki kanan tikus. pemberian karagenin 1% ini adalah sebagai penginduksi inflamasi pada telapak kaki tikus. telapak kaki tikus yang telah diinduksi oleh karagenin lalu diukur dari mulai jam ke 0 sampai dengan jam ke 4 yang diukur setiap 30 menit. Pengukuran dilakukan dengan cara mencelupkan telapak kaki tikus ke dalam alat plethysmometer, dan didapatkan volume telapak kaki tikus yang mengalami inflamasi ( $V_t$ ).

### G. Skema Langkah kerja



## H. Analisis Data

Rerata volume edema yang telah di buat dalam grafik kemudian dihitung nilai AUC atau luas area dibawah kurva dengan persamaan sebagai berikut:

$$AUC = \left( \frac{y_1 + y_2}{2} \right) \times x_2 - x_1 \quad \text{(Persamaan 1)}$$

Keterangan:

AUC = luas area dibawah kurva

$y_1$  = Volume edema telapak kaki tikus pada waktu t-1

$y_2$  = Volume edema telapak kaki tikus pada waktu t

$x_2$  = Waktu pengukuran volume edema (t)

$x_1$  = Waktu pengukuran volume edema (t-1)

Nilai AUC juga kemudian digunakan untuk menentukan % Daya Antiinflamasi disingkat dengan %DAI yang mendefinisikan kekuatan daya hambat senyawa sebagai antiinflamasi. Persen daya hambat inflamasi dihitung dengan perbandingan volume edema atau peradangan pada hewan uji terhadap volume radang pada kelompok negatif (Sari, 2012). Nilai %DAI didapatkan dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\% \text{Daya Antiinflamasi} = \frac{(AUC_k - AUC_p)}{AUC_k} \times 100\% \quad \text{(Persamaan 2)}$$

Keterangan

AUC<sub>k</sub> = Luas daerah dibawah kurva kelompok kontrol negatif

AUC<sub>p</sub> = Luas daerah dibawah kurva kelompok perlakuan

Analisis data penentuan efek anti inflamasi menggunakan program SPSS. sedangkan untuk menentukan ED<sub>50</sub> yaitu dengan membandingkan

antara dosis dan efektifitas antiinflamasi (% daya hambat) dengan regresi linear (Ratusintano, 2010). sehingga didapatkan persamaan dan dapat ditentukan  $ED_{50}$  senyawa AEW1.

Nilai AUC yang telah diperoleh dihitung dengan persamaan diatas untuk menentukan persentase daya hambat inflamasi (%DAI) selanjutnya digunakan untuk menadapatkan nilai  $ED_{50}$ . Nilai  $ED_{50}$  ini digunakan untuk menentukan besarnya indek terapi. Indeks terapi ditentukan dari perbandingan antara  $LD_{50}$  dan  $ED_{50}$  (Soemardji *et al.*, 2009).