BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah studi eksperimental laboratorium dalam menguji aktivitas analgetik pada mencit putih jantan.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi dan Laboratorium Hewan Uji Prodi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini dilakukan selama ± 2 bulan (April-Mei 2017).

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian yang digunakan adalah mencit putih jantan galur *Swiss* yang sehat berusia 1-3 bulan dan memiliki berat badan antara 20-30 gram. Mencit dikatakan sehat apabila memiliki ciri-ciri, seperti warna bulu putih bersih dan tidak berdiri, mata jernih bersinar, serta berat badan bertambah atau tidak berkurang setiap harinya. Setelah mencit dinyatakan sehat, hewan tersebut dipuasakan ± 18 jam sebelum dilakukan pengujian dengan tetap diberi air minum. Jumlah total hewan uji yang akan digunakan pada penelitian ini sebanyak 20 ekor mencit jantan yang dipilih secara acak.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis senyawa AEW1.

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah geliat yang muncul pada mencit putih jantan.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini meliputi berat badan mencit, umur mencit, jenis kelamin mencit, kondisi kandang dan pemberian makan yang sama pada mencit.

E. Definisi Operasional

1. Pemeriksaan aktivitas analgesik: pengujian senyawa bahan uji pada mencit yang terinduksi nyeri dengan melihat penurunan respon nyeri.
2. Metode *Writhing test*: pemberian senyawa kimia secara intraperitonial dapat memberikan respon pada mencit berupa geliat dan dapat dihitung pergerakannya secara kuantitatif selama satu jam.
3. Geliat: adanya gerakan berupa kontraksi perut atau tarikan pada bagian perut, bagian perut menyentuh dasar kaki tempat berpijak, kedua pasang kaki ditarik ke belakang, badan meliuk, dan membengkokkan kepala ke belakang

F. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : kandang mencit, timbangan hewan, timbangan analitik (*Mettler Toledo*), alat-alat gelas (*Pyrex Iwaki glass*), kompor listrik (*Maspion*), jarum suntik 25G1/4 (*One Med*), spuit injeksi 0,5 ml, *stopwatch*, sonde lambung, mortir dan stamper.

2. Bahan Penelitian

a. Bahan Uji

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah senyawa AEW1 yang diperoleh dari sintesis oleh Saputra dan telah diuji kemurniannya menggunakan KLT (lampiran 6) di Laboratorim Teknologi Farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

b. Bahan Kimia

Bahan yang akan digunakan adalah akuades, asetosal (*Brataco*®), asam asetat (*Brataco*®), karboksimetil selulosa atau CMC (*Brataco*®), dan NaCl fisiologis (*Otsuka*®).

G. Prosedur Cara Kerja

1. Persiapan Hewan Uji

Mencit yang akan digunakan dalam penelitian ini berjumlah 20 ekor dan dibagi menjadi 5 kelompok. Masing-masing kelompok

perlakuan berjumlah 4 ekor. Pengelompokan hewan uji dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kelompok perlakuan pada uji analgesik

No	Kelompok	Perlakuan
1	Kontrol Negatif	Diberikan suspensi CMC 0,5%
2	Kontrol Positif	Diberikan larutan asetosal 65 mg/KgBB mencit
3	Dosis 1	Diberikan senyawa AEW1 dosis I (7 mg/KgBB mencit)
4	Dosis 2	Diberikan senyawa AEW1 dosis II (14 mg/KgBB mencit)
5	Dosis 3	Diberikan senyawa AEW1 dosis III (28 mg/KgBB mencit)

2. Pembuatan CMC 0,5%

Sebanyak 0,5 gram CMC ditimbang lalu dimasukkan ke dalam mortir yang berisi 10 ml air panas kemudian homogenkan. Campuran tersebut didiamkan selama 15 menit sampai mengembang. Setelah itu suspensi CMC dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml kemudian tambahkan akuades sampai garis tanda.

3. Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,6 %

Sebanyak 0,6 gram larutan asam asetat di timbang, kemudian encerkan dengan menggunakan NaCl fisiologis sebagai pelarutnya ad 100 ml. Homogenkan larutan asam asetat tersebut.

4. Pembuatan Larutan Asetosal dosis 65 mg/KgBB mencit

Asetosal murni dimasukkan ke dalam *beker glass* kemudian tambahkan suspensi CMC 0,5% sedikit demi sedikit hingga homogen.

5. Pembuatan Larutan Senyawa AEW1

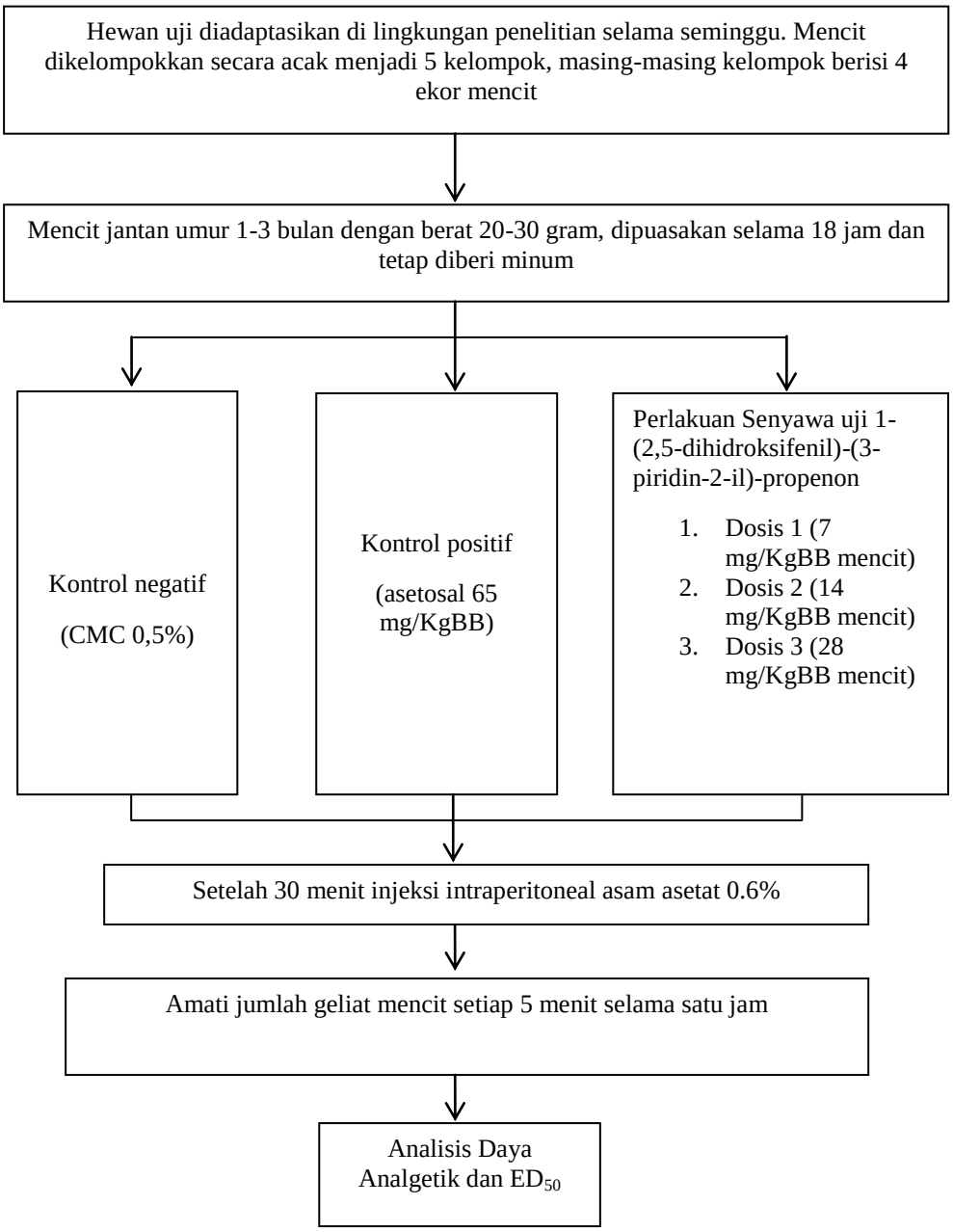
Senyawa AEW1 di masukkan dalam mortir kemudian tambahkan suspensi CMC 0,5% aduk hingga homogen.

6. Prosedur Uji Analgesik

a. Mencit dipuasakan selama ± 18 jam sebelum dilakukan uji, tetapi tetap diberikan minum.
b. Mencit ditimbang terlebih dahulu, kemudian mencit tersebut dikelompokkan menjadi 5 kelompok. Masing-masing kelompok berjumlah 4 ekor.
c. Pada kelompok kontrol negatif diberikan larutan CMC 0,5% secara peroral sebanyak 0,5 ml.
d. Pada kelompok kontrol positif diberikan larutan asetosal dengan dosis 65 mg/KgBB secara peroral.
e. Pada kelompok uji, masing-masing diberikan senyawa uji dengan dosis 7, 14, dan 28 mg/KgBB mencit.
f. Setelah 30 menit diberikan masing-masing bahan uji, mencit disuntikkan larutan asam asetat 0,6% 0,2 ml secara intraperitoneal yang berfungsi untuk penginduksi nyeri.
g. Jumlah geliat diamati setelah pemberian injeksi asam asetat. Geliat ditandai dengan terjadinya kontraksi pada perut atau tarikan pada bagian perut, kedua pasang kaki ditarik ke belakang, perut menyentuh dasar kaki tempat berpijak, badan meliuk, dan membengkokkan kepala ke belakang yang muncul dalam 5 menit selama 1 jam.

h. Setelah menghitung banyaknya geliat yang terjadi maka dilakukan perhitungan persentasi proteksi analgesik dan persentasi efektivitas analgesik pada masing-masing kelompok uji.

H. Skema Langkah Kerja



I. Analisis Data

Analisis data ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan hasil uji pada semua kelompok perlakuan. Data yang dapat diperoleh dari hasil uji aktivitas analgesik adalah data mengenai persentase proteksi senyawa uji. Persentasi (%) proteksi adalah kemampuan senyawa uji dalam memberikan atau mengurangi respon geliat mencit yang disebabkan oleh induksi asam asetat. Presentase proteksi diperoleh dengan membandingan jumlah rata-rata geliat kelompok bahan uji dengan jumlah rata-rata kelompok kontrol. Rumus menghitung persentase proteksi adalah sebagai berikut negatif (Galani dan Patel, 2011):

$$\%\ \text{Proteksi} = \frac{\sum \overline{\text{X}}\ \text{geliat}\ (\ \text{kontrol negatif} -\ \text{bahan uji}\ )}{\sum \overline{\text{X}}\ \ \text{geliat}\ \ \text{kontrol negatif}} \text{x}100\%$$

Untuk mengetahui persentase efektivitas persentase efektivitas analgesik senyawa uji dilakukan dengan membandingkan hasil % proteksi kelompok senyawa uji terhadap % proteksi kelompok kontrol positif (asetosal). Rumus menghitung % efektivitas adalah sebagai berikut (Wahyuni, *et al*., 2012):

$$\%\ \text{Efektivitas} = \frac{\%\ \text{Proteksi kelompok bahan uji}}{\%\ \text{Proteksi kelompok kontrol positif}} \text{x}100\%$$

Data yang telah diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov untuk melihat normalitas distribusi dari data tersebut dan uji Levene untuk melihat homogenitas dari data. Jika diperoleh data terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji analisis varian satu arah (ANOVA *one way*) dengan taraf kepercayaan 95% dan dilakukan uji

BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna atau tidak.

Analisis data untuk menentukan ED_{50} digunakan persamaan regresi linear yang membandingkan antara kurva logaritma dosis (log dosis) dan kurva persentase proteksi analgesik (Yunita, 2009). Setelah didapat persamaan regresi linear, maka dilanjutkan dengan mencari nilai x pada persamaan $y = Bx - A$.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Uji Aktivitas Analgesik Senyawa AEW1

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menguji adanya aktivitas analgesik dari senyawa AEW1 terhadap mencit. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode *writhing test*. Metode *writhing test* adalah metode kimia yang digunakan untuk menguji aktivitas analgesik suatu senyawa. Prinsip kerja dari metode ini adalah mengamati respon geliat yang terjadi karena pemberian rangsangan nyeri oleh suatu iritan. Pemberian iritan ini dilakukan dengan cara menginjeksikan asam asetat sebagai penginduksi nyeri secara intraperitonial pada mencit (Gawade, 2012). Pemilihan asam asetat sebagai penginduksi nyeri dipilih karena nyeri yang dihasilkan berasal dari reaksi inflamasi akut lokal. Reaksi ini menyebabkan pelepasan asam arakidonat dari jaringan fosfolipid melalui jalur siklooksigenase dan menghasilkan prostaglandin di dalam cairan intraperitonial sehingga menimbulkan respon geliat pada mencit (Marlyne, 2012). Respon geliat ditandai dengan adanya kontraksi otot perut, perut menyentuh bagian lantai, tarikan kaki kebelakang, membengkokkan kepala, dan punggung meliuk (Gawade, 2012).

Pemberian bahan uji dilakukan 30 menit sebelum mencit diberi penginduksi nyeri yaitu asam asetat 0,6% sebanyak 0,2 ml secara intraperitonial. Hal ini bertujuan untuk melihat kerja dari masing-masing