

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Model penelitian ini merupakan penelitian quasi eksperimental (eksperimental semu) dengan rancangan acak lengkap pola searah, yaitu mengamati kemungkinan pengaruh diantara variabel dengan melakukan pengamatan terhadap kelompok eksperimental pada berbagai kondisi perlakuan dan membandingkannya dengan kelompok kontrol.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih galur *Wistar (Rattus norvegicus)* yang akan diinduksi karagenin dengan kriteria: jantan, usia 2-3 bulan, dan berat badan 150-200 gram.

2. Sampel

Sampel penelitian sebanyak 25 ekor, dipilih secara acak yang dibagi dalam 5 kelompok. Menurut Frederer, rumus penentuan sampel untuk uji eksperimental adalah:

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

Dimana t merupakan jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah jumlah sampel setiap kelompok.

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampel menjadi:

$$5(n-1) > 15$$

$$5n-5 > 15$$

$$5n > 20$$

$$n > 4$$

Jadi sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 5 ekor ($n > 4$) dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 5 kelompok, sehingga total sampel yang digunakan adalah 25 ekor tikus dari populasi yang ada.

Kriteria inklusi:

- 1) Sehat (tidak tampak penampakan rambut kusam, rontok, atau botak, dan bergerak aktif).
- 2) Memiliki berat badan sekitar 150-200 gram.
- 3) Berjenis kelamin jantan.
- 4) Berusia sekitar 2-3 bulan.

Kriteria Eksklusi:

- 1) Sakit (penampakan rambut kusam, rontok, atau botak, dan aktivitas kurang atau tidak aktif).
- 2) Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% selama masa adaptasi.
- 3) Mati selama masa pemberian perlakuan.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Terapi Universitas Gajah Mada selama \pm 1 bulan (Oktober 2017 – November 2017).

D. Variabel Penelitian

Pada penelitian ini dapat digolongkan menjadi 3 variabel, yaitu :

1. Variabel bebas : Ekstrak etanol batang serai (*Cymbopogon citratus*) dosis berturut-turut 5%; 10%; dan 20%, ibuprofen 3,6 mg/gr BB tikus
2. Variabel terikat : Volume udem kaki tikus wistar jantan
3. Variabel terkontrol :
 - a. Hewan uji : kondisi, galur, jenis kelamin, berat badan, dan umur tikus
 - b. Tanaman : tempat dan waktu pengambilan tanaman batang serai

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol batang serai (*Cymbopogon citratus*) adalah sediaan kental yang diperoleh dengan cara mengekstraksi batang serai (*Cymbopogon citratus*) dengan metode maserasi dengan pelarut etanol. Sehingga didapatkan ekstrak serai dalam bentuk sediaan pekat kemudian dibuat konsentrasi 5%; 10%; dan 20%.
2. Ibuprofen adalah jenis obat anti inflamasi non-steroid. Obat ini dapat meredakan rasa sakit ringan hingga menengah serta mengurangi inflamasi atau peradangan. Pada penelitian ini ibuprofen digunakan sebagai kontrol positif.

3. Daya antiinflamasi adalah kemampuan bahan uji untuk menghambat volume udem kaki hewan uji akibat induksi zat karagenin 1% pada jaringan subkutan. Pengukuran daya antiinflamasi menggunakan alat pletismometer, sedangkan efek antiinflamasi adalah kemampuan bahan uji untuk menghambat volume udem kaki hewan uji akibat induksi zat karagenin 1% 0,1 ml dengan inhibisi edema yang ditimbulkan mencapai sekitar 50% atau lebih.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: (1) Kandang tikus putih; (2) Neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01 gr, untuk menimbang berat tikus; (3) S spuit injeksi subplantar 1 ml (terumo); (4) Pletismometer; (5) Alat – alat gelas; (6) *Water bath*; (7) Oven, (h) Vacum rotary evaporator; (8) *Blender*; (9) Kertas saring; (10) Tissue gulung; (11) Spidol permanen; (12) *stopwatch*; (13) Label; (13) Ayakan 65 *mesh*; (14) Sonde oral.

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: (1) Batang serai (*Cymbopogon citratus*); (2) Etanol 70%, (3) Ibuprofen 400 mg dilarutkan ke dalam aquades 10 ml; (4) Larutan NaCl 0.9% (otsuka); (5) Aquades 100 ml; (6) Karagenin tipe lambda 1% (sigma chemical Co); (7) Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar sebanyak 25 ekor.

G. Prosedur Penelitian

Jalannya penelitian dilakukan dengan metode Winter, dkk. (1962) yang telah dimodifikasi.

1. Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar dengan kondisi sehat, berumur 2-3 bulan dan berat badan 150-200 gram sebanyak 25 ekor diperoleh dari Laboratorium Farmakologi dan Terapi Universitas Gajah Mada. Seluruh kelompok tikus dipelihara terlebih dahulu kurang dari 1 minggu untuk penyesuaian diri dengan lingkungan laboratorium, mengontrol kesehatan dan berat badan serta menyeragamkan makanannya.

2. Persiapan Bahan Uji

Pilih dan kumpulkan batang serai yang masih muda berwarna hijau pupus, bebas dari hama, penyakit dan pengganggu lainnya. Batang serai yang akan digunakan dicuci dengan air hingga bersih, ditiriskan agar dapat bebas dari sisa cucian. Bahan basah dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 45° - 50° sampai kering. Batang yang sudah kering dihaluskan dengan menggunakan *blender* sampai menjadi serbuk, kemudian diayak menggunakan ayakan 65 *mesh*. hingga diperoleh 400 gram berat serbuk batang serai, serbuk yang diperoleh disimpan dalam wadah bersih dan tertutup rapat.

3. Pembuatan Ekstrak Etanol Batang Serai (*Cymbopogon citratus*)

Pembuatan ekstrak etanol batang serai menggunakan teknik *maserasi*. Pelarut yang digunakan adalah etanol 70%. Sebanyak 400 gram serbuk kering dari batang serai dimaserasi dengan pelarut etanol 70% dan dilakukan pengadukan secara terus menerus. Proses tersebut dilakukan selama 20 menit, lalu didiamkan selama 24 jam. Setelah itu larutan disaring sebanyak tiga kali untuk memisahkan filtrat dengan ampas batang serai. Filtrat yang didapat diuapkan atau dipekatkan dengan *rotary evaporator* yang dipanaskan dengan pemanas *water bath* pada suhu 40⁰C agar etanol 70% terpisah dari sari aktif batang serai, hingga diperoleh ekstrak kental batang serai. Ekstrak kental dituang ke dalam cawan porselin dan dipanaskan dengan pemanas *water bath* sambil terus diaduk agar kadar air yang terkandung hilang, maka didapatkan ekstrak batang serai murni. Perhitungan hasil % kadar ekstrak dengan rumus:

$$\% \text{ kadar ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang didapat (dikeringkan)}}{\text{Bobot serbuk yang diekstraksi (maserasi)}} \times 100\%$$

4. Pengenceran Ekstrak Batang Serai

Untuk mengencerkan ekstrak batang serai dilakukan pembuatan larutan stok. Lima gram ekstrak batang serai dilarutkan ke dalam aquades sebanyak 100 ml, akan didapatkan ekstrak etanol batang serai konsentrasi 5%. Sepuluh gram ekstrak batang serai dilarutkan ke dalam aquades sebanyak 100 ml, akan didapatkan ekstrak etanol batang serai konsentrasi 10%. Dua puluh gram ekstrak batang serai dilarutkan ke dalam aquades sebanyak 100 ml, akan didapatkan ekstrak etanol batang serai konsentrasi 20%.

5. Perhitungan Dosis Perlakuan

- 1) Kelompok I, merupakan kontrol negatif sehingga tidak diberikan perlakuan pada kelompok tikus
- 2) Kelompok II, diberikan obat pembanding yaitu ibuprofen sebagai kontrol positif. Dosis ibuprofen sediaan tablet salut yang digunakan pada manusia adalah 400 mg dengan anjuran minum 1 tablet 2-3 kali sehari. Untuk dosis tikus maka dosis tersebut harus dikonversi terlebih dahulu. Faktor konversi untuk penentuan dosis ibuprofen dari manusia terhadap tikus putih dengan berat badan rata-rata 200 gr adalah 0,018. Faktor konversi ini dikalikan dengan dosis pada manusia dewasa dengan berat badan 70 kg (dibandingkan dengan berat badan rata-rata manusia di Indonesia adalah 50 kg) (Ngatidjan, 1991). Dengan demikian, dosis tikus

adalah $200 \text{ mg} \times 0,018 \times 70/50$. Hasil yang diperoleh adalah 3,6 mg. Digunakan dosis 3,6 mg/200gr BB tikus.

Ibuprofen dilarutkan dalam aquades untuk mendapatkan larutan homogen sebagai kontrol positif. Larutan ibuprofen yang akan dibuat adalah sebanyak 100 ml. Sehingga jumlah ibuprofen yang akan digunakan adalah $100/3 \times 3,6 \text{ mg}$. Hasil yang diperoleh adalah 120 mg atau sekitar 0,12 gr.

- 3) Kelompok III, dengan serbuk batang serai seberat 5 gr. Berat serbuk batang serai yang diperlukan untuk tikus putih dengan berat rata-rata 200 gram adalah $0,018 \times 70/50 \times 5000 \text{ mg}$. Hasil yang diperoleh adalah 126 mg/200 gr BB tikus.

Berat 200 gr tersebut merupakan standar tiap satu ekor tikus sehingga volume yang diperlukan adalah 3 ml sesuai dengan kapasitas lambung tikus. Berat yang dibutuhkan untuk membuat larutan sebanyak 100 ml adalah dosis untuk 1 tikus (rata-rata BB 200 gr) dibagi volume dosis 1 ekor tikus dikali volume larutan yang secara matematis ditulis $126 \text{ mg} / 3 \text{ ml} \times 100 \text{ ml}$. Hasil yang diperoleh adalah 5000 mg atau 5 gr. Jadi konsentrasi ekstrak batang serai untuk kelompok III adalah 5%.

- 4) Kelompok IV, dengan serbuk batang serai seberat 10 gr. Berat serbuk batang serai yang diperlukan untuk tikus putih dengan berat rata-rata 200 gram adalah $0,018 \times 70/50 \times 10000 \text{ mg}$. Hasil yang diperoleh adalah 252 mg/200 gr BB tikus. Berat 200 gr

tersebut merupakan standar tiap satu ekor tikus sehingga volume yang diperlukan adalah 3 ml sesuai dengan kapasitas lambung tikus. Berat yang dibutuhkan untuk membuat larutan sebanyak 100 ml adalah dosis untuk 1 tikus (rata-rata BB 200 gr) dibagi volume dosis 1 ekor tikus dikali volume larutan yang secara matematis ditulis $252 \text{ mg}/3 \text{ ml} \times 100 \text{ ml}$. Hasil yang diperoleh adalah 10000 mg atau 10 gr. Jadi konsentrasi ekstrak batang serai untuk kelompok III adalah 10%.

- 5) Kelompok V, dengan serbuk batang serai seberat 20 gr. Berat serbuk batang serai yang diperlukan untuk tikus putih dengan berat rata-rata 200 gram adalah $0,018 \times 70/50 \times 20000 \text{ mg}$. Hasil yang diperoleh adalah $504 \text{ mg}/200 \text{ gr}$ BB tikus. Berat 200 gr tersebut merupakan standar tiap satu ekor tikus sehingga volume yang diperlukan adalah 3 ml sesuai dengan kapasitas lambung tikus. Berat yang dibutuhkan untuk membuat larutan sebanyak 100 ml adalah dosis untuk 1 tikus (rata-rata BB 200 gr) dibagi volume dosis 1 ekor tikus dikali volume larutan yang secara matematis ditulis $504 \text{ mg}/3 \text{ ml} \times 100 \text{ ml}$. Hasil yang diperoleh adalah 20000 mg atau 20 gr. Jadi konsentrasi ekstrak batang serai untuk kelompok III adalah 20 %.

Selama penelitian, tikus putih diberi perlakuan sesuai dengan kelompoknya masing-masing dan tiap kelompok mendapat perlakuan yang sama secara per oral.

6. Pembuatan Larutan Karagenin

Pembuatan larutan karagenin 1% dengan cara sebanyak 0,1 gr karagenin ditimbang, dilarutkan dalam larutan fisiologis NaCl sampai 10 ml (larutan fisiologis NaCl 0,9%).

7. Pembuatan Radang

Satu jam setelah semua kelompok diberi perlakuan, pada semua telapak kaki kanan belakang tikus yang sudah ditandai, kemudian disuntikkan karagenin 1% sebanyak 0,1 ml secara subplantar (dibawah kulit telapak kaki tikus). Dosis yang diberikan adalah sebesar 0,1 ml (Winter et al, 1962).

8. Jalannya Penelitian

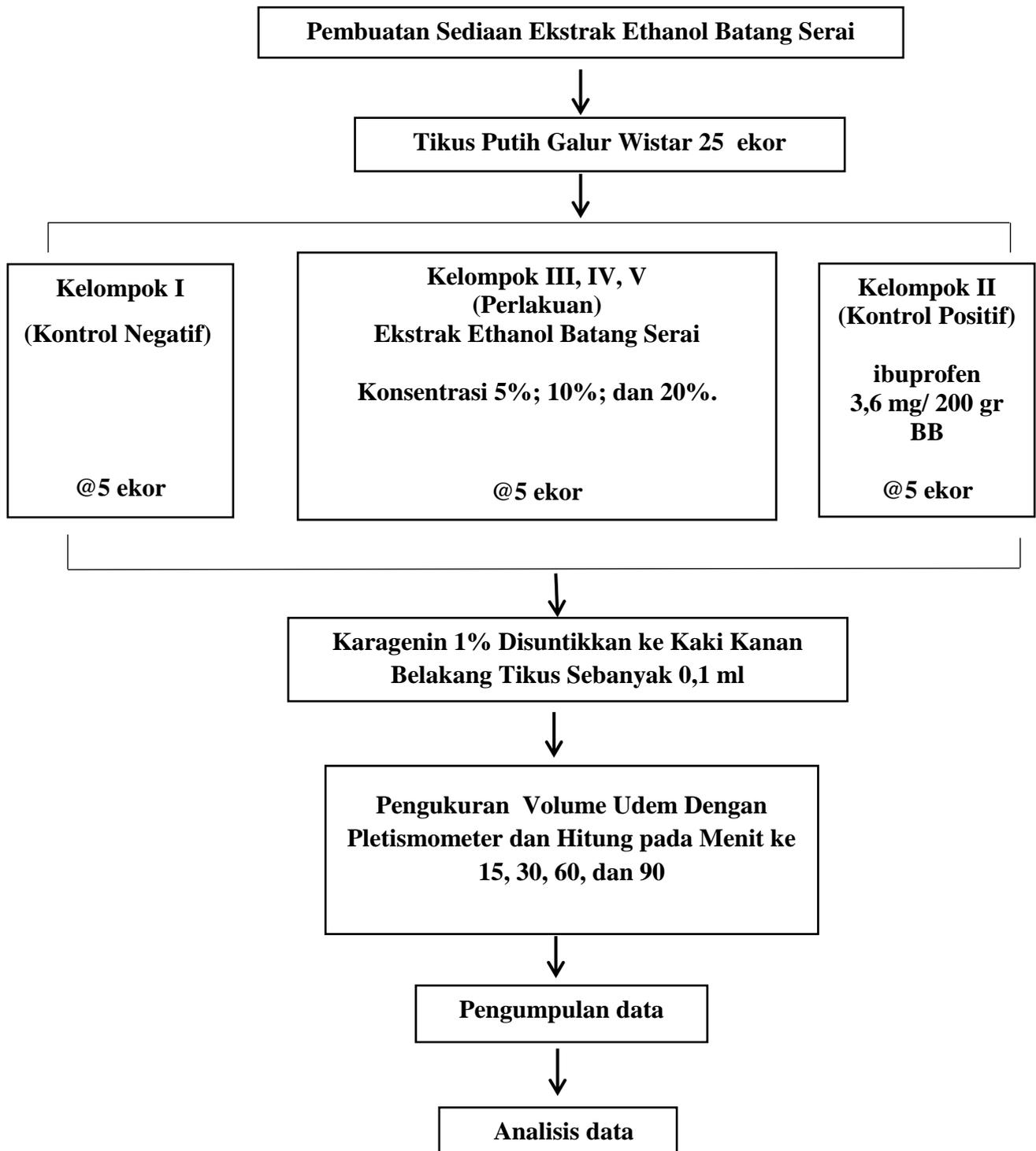
Pengujian efek antiinflamasi dengan metode edema buatan pada telapak kaki tikus.

- 1) Sebelum penelitian dilakukan, tikus dipuasakan terlebih dahulu kurang lebih 12 jam untuk meniadakan variabel pengganggu yang berasal dari makanan. Tidak diberikan makanan namun air minum tetap diberikan *ad libitum*.
- 2) Pada hari pengujian, tikus ditimbang beratnya dan dikelompokkan secara acak (random). Tikus sebanyak 25 ekor, dikelompokkan menjadi 5 kelompok, dan setiap kelompok

terdiri dari 5 ekor tikus. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol negatif (-), tanpa diberikan perlakuan. Kelompok kedua adalah kontrol positif (+), akan diberikan larutan ibuprofen. Kelompok ketiga, keempat, dan kelima adalah kelompok yang akan diberikan perlakuan berupa pemberian ekstrak etanol batang serai (*Cymbopogon citratus*) dengan dosis berurut-turut 5%; 10%; dan 20%.

- 3) Setiap kaki kanan belakang tikus yang akan diinduksi diberi tanda pada mata kaki menggunakan spidol permanen.
- 4) Tikus putih diberi perlakuan sesuai dengan kelompoknya masing-masing yaitu: kelompok I tidak diberikan perlakuan, kelompok II diberikan larutan ibuprofen 3,6mg, kelompok III, IV, dan V diberikan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol batang serai dosis 5%, 10%, dan 20%. Tikus putih pada tiap kelompok mendapatkan perlakuan yang sama.
- 5) Setelah 1 jam perlakuan, kemudian diberikan induksi inflamasi karagenin 1% subplantar pada telapak kaki kanan tikus
- 6) Setelah masing-masing kelompok diberikan induksi inflamasi karagenin 1%, kemudian dilakukan pengukuran pada kaki kanan tikus dengan menggunakan alat pletismometer pada menit ke 15, 30, 60, dan 90. Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali.

- 7) Kemudian catat hasil pengukuran.
- 8) Setelah mendapatkan volume udem, selanjutnya daya inflamasi dinilai dengan menghitung rerata selisih volume penghambatan edema.
- 9) Data yang diperoleh kemudian dihitung dan diuji secara statistik, dan disajikan dalam bentuk grafik dan tabel.



Gambar 5. Diagram alur penelitian

H. Analisis Data

Data hasil yang diperoleh dianalisis menggunakan uji normalitas *Shapiro Wilk* untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal atau tidak. Uji ini dilakukan karena jumlah sampel pada penelitian ≤ 50 . Hasil uji *Shapiro Wilk* menunjukkan data berdistribusi normal apabila nilai signifikansi $> 0,05$, sedangkan menunjukkan data berdistribusi tidak normal apabila nilai signifikansi $< 0,05$. Kemudian dilakukan uji *Levene Test* untuk mengetahui homogenitas varian data. Pada uji *Levene Test* jika nilai signifikansi $> 0,05$ berarti data dikatakan homogen, sedangkan jika nilai signifikansi $< 0,05$ berarti data dikatakan tidak homogen. Apabila data menunjukkan berdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji parametrik analisis varian satu jalan (*Oneway Anova*) dengan taraf kepercayaan 95%, sedangkan jika data tidak berdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis* sehingga dapat diketahui apakah terdapat perbedaan yang bermakna pada seluruh kelompok tikus secara statistik. Jika terdapat perbedaan bermakna, kemudian dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil *Least Significant Difference (LSD)*.