

## BAB III

### SUBJEK/BAHAN DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Subjek/Bahan Penelitian

##### 3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar.

##### 3.1.1.1 Kriteria Subjek Penelitian

Subjek penelitian berupa tikus jantan galur Wistar yang memiliki kriteria sebagai berikut.

##### 3.1.1.2 Kriteria Inklusi

1. Tikus jantan.
2. Tikus dengan usia 8-10 minggu.
3. Tikus dengan berat badan 150-200 gram.
4. Tikus dalam kondisi sehat, tidak terdapat luka dan aktif bergerak.<sup>11</sup>

##### 3.1.1.3 Kriteria Eksklusi

Tikus mengalami penurunan berat badan lebih dari 10% selama masa adaptasi.<sup>11</sup>

##### 3.1.1.4 Sampel Subjek Penelitian

Menentukan jumlah sampel dalam subjek penelitian adalah dengan menggunakan rumus Federer sebagai berikut.

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok

n = jumlah sampel tiap kelompok (5 ekor tikus galur Wistar)

Berdasarkan hasil perhitungan rumus Federer, didapatkan jumlah sampel penelitian minimal 5 ekor tikus galur Wistar setiap kelompok.<sup>11</sup>

Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok sampel diantaranya sebagai berikut.

1. Kelompok kontrol negatif diberikan *carboxymethylcellulose*.
2. Kelompok kontrol positif diberikan natrium diklofenak.
3. Kelompok uji pertama diberikan ekstrak etanol ciplukan dosis kesatu.
4. Kelompok uji kedua diberikan ekstrak etanol dosis kedua.
5. Kelompok uji ketiga diberikan ekstrak etanol ciplukan dosis ketiga.

### 3.1.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.1.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut.

1. Kandang

Ukuran lantainya 148,35 cm<sup>2</sup> dan tinggi 17,8 cm.<sup>18</sup>

2. Spidol dan label

Spidol digunakan untuk menandai tikus dan label digunakan untuk menandai kandang tikus.

### 3. Sarung tangan dan masker

Sarung tangan dan masker dipakai sebagai alat perlindungan diri.

### 4. Sonde per oral

Sonde per oral digunakan untuk memberikan ekstrak etanol ciplukan dan natrium diklofenak pada tikus.

### 5. *Magnetic stirrer*

Digunakan untuk membuat larutan karagenan.

### 6. Pletismometer

Pletismometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur diameter kaki tikus atau mencit.

#### 3.1.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut.

1. Ekstrak etanol ciplukan
2. Natrium diklofenak
3. Karagenan
4. CMC 0,5%

#### 3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian ini adalah eksperimental murni *in vivo* yang dilakukan di laboratorium.

##### 3.2.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (*Complete Randomised Design*).

### 3.2.2 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

#### 3.2.2.1 Variabel Penelitian

##### 1. Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak etanol ciplukan.

##### 2. Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah efek antiinflamasi.

#### 3.2.2.2 Definisi Operasional

**Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel**

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala Ukur	Hasil Ukur
1	Dosis ekstrak etanol ciplukan	Sediaan cair yang dibuat dengan mengekstraksi etanol ciplukan	Timbangan	Kategorik	Tiga kelompok dosis Kelompok uji kesatu 3,6 mg/ 200 grBB Kelompok uji kedua 5,4 mg/ 200 grBB Kelompok uji ketiga 7,2 mg/ 200 grBB
2	Natrium diklofenak	Obat standar yang digunakan sebagai antiinflamasi.	Timbangan	Numerik	Untuk satu kali pemberian diberikan 27 mg/ 200grBB tikus
3	Karagenan	Larutan yang diinjeksikan secara subplantar untuk induksi inflamasi	Timbangan	Numerik	Karagenan 1% sebanyak 0,1 ml
4	Efek antiinflamasi	Perubahan volume telapak kaki tikus yang diinduksi karagenan	Pletismometer	Numerik	Volume telapak kaki tikus dalam satuan $\mu\text{L}$

#### 3.2.3 Prosedur Penelitian

##### 3.2.3.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Ciplukan

1. Membersihkan daun ciplukan setelah itu dikeringkan selama 2 minggu di bawah sinar matahari.

2. Menghaluskan daun ciplukan menggunakan blender elektrik sehingga membentuk serbuk.
3. Maserasi serbuk daun ciplukan menggunakan etanol 95% selama 3 x 24 jam pada suhu kamar.
4. Hasil maserasi daun ciplukan disaring menggunakan kertas saring dan dievaporasi menggunakan *vacuum rotary evaporator* untuk memisahkan pelarut dengan ekstraknya dan proses ini diulang sebanyak 3 kali. Hasil ekstraksi berupa pasta berwarna coklat, kemudian dilakukan skrining fitokimia yaitu proses analisis kualitatif untuk mengetahui metabolit sekunder yang terdapat dalam suatu simplisia maupun ekstraksi.
5. Ekstrak ciplukan didilusi oleh *Carboxymethyl cellulose* (CMC) 0,5%.<sup>14</sup>

### 3.2.3.2 Penentuan Dosis Ekstrak Etanol Ciplukan

Ditinjau dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Anes dan Emmanuel pada mencit untuk menguji aktivitas inflamasi ciplukan diberikan dalam dosis 200 mg, 300 mg, dan 400 mg. Pada penelitian ini digunakan sampel tikus dan akan diberikan ekstrak etanol ciplukan sebagai berikut.<sup>6</sup>

Kelompok uji ke-1

$$200\text{mg/kg} = 200 \times 0,018 = 3,6 \text{ mg}/200 \text{ grBB tikus}$$

Setiap tikus diberi ekstrak etanol  $3,6 \div 200 = 0,018 \text{ mg/grBB tikus}$ .

Kelompok uji ke-2

$$300\text{mg/kg} = 300 \times 0,018 = 5,4 \text{ mg}/200 \text{ grBB tikus}$$

Setiap tikus diberi ekstrak etanol  $5,4 \div 200 = 0,027 \text{ mg/grBB tikus}$ .

Kelompok uji ke-3

$$400 \text{ mg/kg} = 400 \times 0,018 = 7,2 \text{ mg}/200 \text{ grBB tikus}$$

Setiap tikus diberi ekstrak etanol  $7,2 \div 200 = 0,036$  mg/grBB tikus.

### 3.2.3.3 Penentuan Dosis Natrium Diklofenak

Dosis natrium diklofenak sebagai kontrol positif yaitu 27 mg/200 grBB, diperoleh dari dosis konversi penggunaannya pada manusia dalam sehari.<sup>11</sup>

### 3.2.3.4 Pembuatan Suspensi Karagenan

Menuangkan 500 ml saline 0,9% ke dalam gelas kimia 1 liter kemudian mengaduknya dan perlahan menambahkan 2,5 g (0,5%) hingga 5,0 g (1,0%) bubuk karagenan ke dalam gelas kimia. Memanaskan larutan hingga 90° C untuk melarutkan karagenan.<sup>17</sup>

### 3.2.3.5 Masa Adaptasi Tikus

Menempatkan tikus di lingkungan penelitian selama 7 hari dengan diberi air dan pakan standar serta menempatkan tikus dalam kandang di ruangan dengan ventilasi dan pencahayaan yang cukup, 12 jam terang dan 12 jam gelap.<sup>18</sup>

### 3.2.3.6 Perlakuan Sampel Penelitian

1. Kelompok kontrol negatif diberikan CMC 0,5% sebanyak 2ml/200 grBB tikus per oral.
2. Kelompok kontrol positif diberikan natrium diklofenak 27 mg/200 grBB tikus dalam larutan CMC 0,5% per oral.
3. Kelompok uji pertama diberikan ekstrak etanol ciplukan 3,6 mg/200 grBB tikus dalam larutan CMC 0,5% per oral.

4. Kelompok uji kedua diberikan ekstrak etanol ciplukan 5,4 mg/200 grBB tikus dalam larutan CMC 0,5% per oral.
5. Kelompok uji ketiga diberikan ekstrak etanol ciplukan 7,2 mg/200 grBB tikus dalam larutan CMC 0,5% per oral.

### 3.2.3.7 Induksi Inflamasi Akut pada Tikus

Induksi inflamasi akut pada tikus dilakukan dengan menyuntikkan karagenan 1% sebanyak 0,1 ml subplantar kaki kiri bagian belakang.<sup>17</sup>

### 3.2.3.8 Pengukuran Volume Telapak Kaki Tikus

Pengukuran volume telapak kaki tikus menggunakan pletismometer pada saat pengukuran awal, sesaat setelah induksi karagenan, serta 1 hingga 6 jam setelah induksi karagenan. Pletismometer menunjukkan ukuran telapak kaki tikus dalam satuan  $\mu\text{L}$ .<sup>19</sup>

### 3.2.3.9 Penghitungan Persentase Penghambatan Edema Rata-Rata

Penghitungan persentase penghambatan edema rata-rata dilakukan menggunakan rumus:

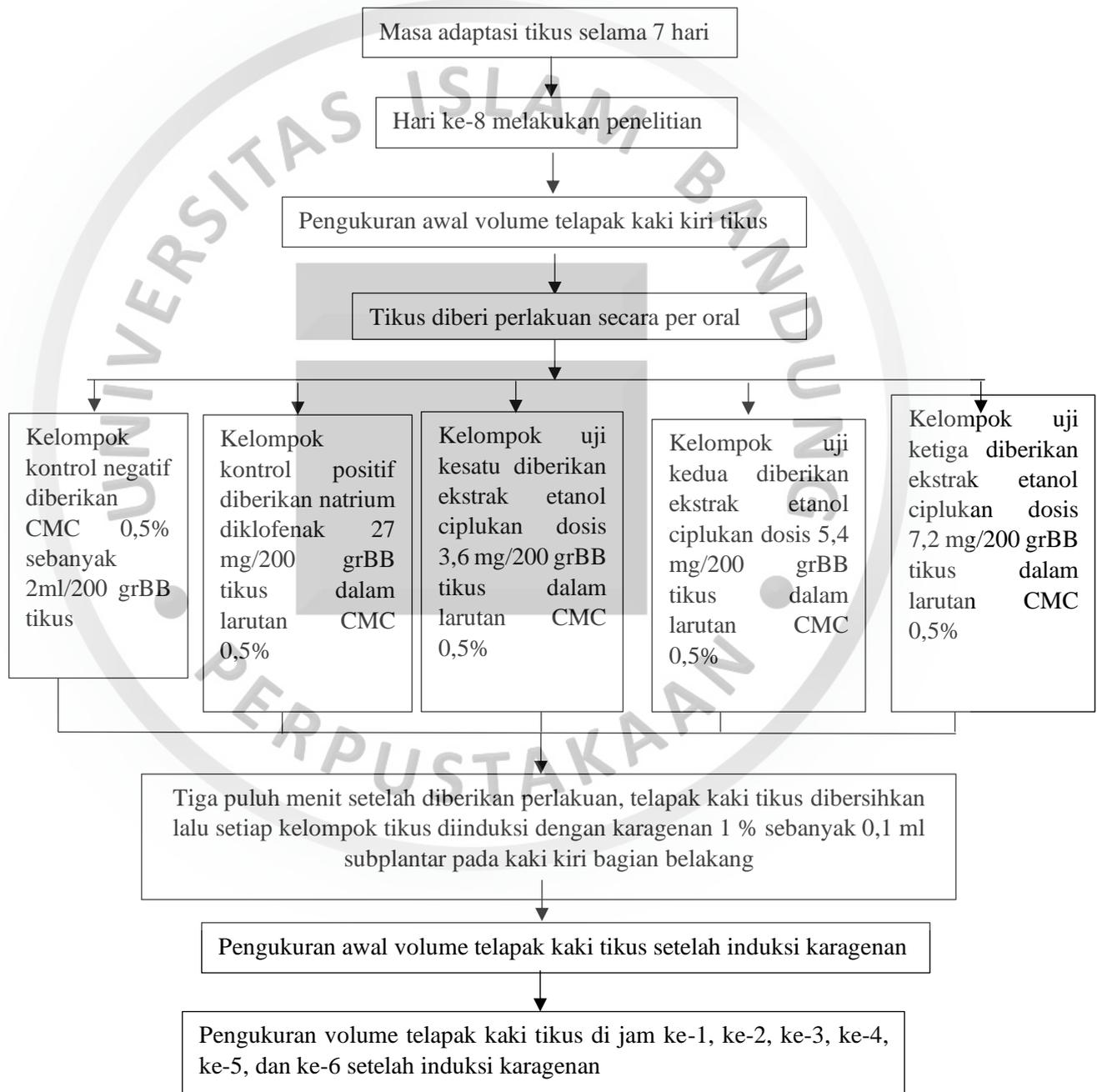
$$\text{Penghitungan \% Penghambatan Edema Rata-rata} = \left\{ 1 - \left( \frac{a-x}{b-y} \right) \right\} \times 100\%$$

Keterangan:

- a: Volume rata-rata telapak kaki tikus di jam tertentu pada kelompok tikus kontrol positif maupun kelompok uji
- x: Volume rata-rata telapak kaki tikus pada pengukuran awal kelompok tikus kontrol positif maupun kelompok uji

- b: Volume rata-rata telapak kaki tikus di jam tertentu pada kelompok tikus kontrol negatif
- y: Volume rata-rata telapak kaki tikus pada pengukuran awal kelompok tikus kontrol negatif

### 3.2.4 Alur Penelitian



**Gambar 3. 1 Bagan Alur Penelitian**

### 3.2.5 Analisis Data

Data hasil penelitian ditampilkan dalam bentuk tabel volume edema telapak kaki tikus pada jam ke-1, ke-2, ke-3, ke-4, ke-5 dan ke-6. Uji normalitas penelitian menggunakan *Saphiro-Wilk Test* dan uji homogenitas menggunakan *Levene*. Data yang terdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*. Data yang tidak terdistribusi normal dan atau tidak homogen dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis*. Hasil dari uji *Kruskal Wallis* yang bermakna dilanjutkan dengan uji beda *Man Whitney*. Pengujian dilakukan dengan menggunakan aplikasi *IBM SPSS Statistics 25*.

### 3.2.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran pada bulan Juni 2019.

### 3.2.7 Aspek Etika Penelitian

Penelitian ini sudah mendapat persetujuan etik oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung dengan nomor: 039/Komite Etik FK/IV/2019. Aspek etika pada penelitian ini mempertimbangkan hal sebagai berikut.

1. *Replacement*, menggunakan sampel dengan kelompok taksonomi paling rendah. Penelitian ini menggunakan tikus karena telapak kaki tikus dapat lebih mudah diukur.
2. *Reduction*, menggunakan jumlah sampel penelitian yang sedikit tetapi efektif dan mendapatkan hasil yang optimal. Pada penelitian ini digunakan rumus Federer dalam menentukan jumlah sampel.

3. *Refinement*, mengurangi rasa sakit pada subjek penelitian dengan memperlakukan subjek dengan baik dan tidak membuat subjek berada dalam kondisi kelaparan, kehausan, ketakutan. Tikus ditempatkan di dalam kandang yang berukuran 148,35 cm<sup>2</sup> dan tinggi 17,8 cm dengan alas sekam, berjumlah 5 ekor tikus setiap kandang. Tikus diberi air dan pakan standar secukupnya. Tikus ditempatkan di dalam ruangan dengan ventilasi dan pencahayaan yang cukup, 12 jam terang dan 12 jam gelap. Pada saat melakukan penelitian dalam memberikan obat atau induksi dilakukan secara *gentle* untuk mengurangi kesakitan dari tikus dan dilakukan oleh orang yang kompeten sehingga obat benar-benar masuk ke dalam saluran pencernaan dan bukan ke dalam saluran pernapasan.<sup>20</sup>