

BAB III

SUBJEK/OBJEK/BAHAN DAN METODE PENELITIAN

3.1 Subjek/Objek/Bahan Penelitian

3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah tikus jantan ras *Galur wistar* yang mempunyai berat 150-250 gr dengan usia 2-3 bulan yang diperoleh dari Pusat Antar Universitas (PAU) Institut Teknologi Bandung (ITB).

3.1.2 Kriteria Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan pada penelitian ini harus memenuhi kriteria sebagai berikut:

A) Kriteria inklusi sebagai berikut:

- a) Sehat dengan ciri-ciri mata bersinar, bulu tidak berdiri, dan tingkah laku normal.
- b) Jenis kelamin jantan.
- c) Ras *Galur wistar*.
- d) Usia 2-3 bulan.
- e) Berat 150-250 gr.

B) Kriteria eksklusi sebagai berikut:

- a) Tikus pernah dijadikan subjek penelitian sebelumnya.
- b) Penurunan berat badan 10% selama adaptasi.

c) Tikus mati pada saat adaptasi di laboratorium.

3.1.3 Sampel Penelitian

Besar sampel pada penelitian ini dihitung menggunakan rumus Federer sebagai berikut:

$$(r-1) \times (t-1) \geq 15$$

$$(r-1) \times (4-1) \geq 15$$

$$(r-1) \times (3) \geq 15$$

$$3r-3 \geq 15$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 6$$

Keterangan:

- r: Besar sampel; t: Jumlah perlakuan.
- Diketahui jumlah perlakuan yang diberikan sebanyak empat perlakuan.

Berdasarkan perhitungan diatas dapat disimpulkan bahwa besar sampel minimal pada penelitian ini setiap kelompoknya sebanyak enam ekor. Untuk mengantisipasi adanya *drop out*, maka tiap kelompok perlakuan ditambahkan sebanyak 10% menjadi tujuh ekor. Jumlah total dari sampel penelitian ini sebanyak 28 ekor.

3.1.4 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- A). Kandang tikus.
- B). Wadah makanan tikus.
- C). Wadah minuman tikus.
- D). Timbangan.
- E). *Stopwatch*.
- F). *Hot Plate*.
- G). *Beaker glass*.
- H). *Thermometer*.

3.1.5 Bahan Penelitian

Bahan pada penelitian ini adalah kunyit putih yang berasal dari pusat perkebunan tanaman obat Manoco, Lembang, Jawa Barat. Kunyit putih diekstrak di laboratorium farmasi Institut Teknologi Bandung (ITB).

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik menggunakan *Tail Immersion Method*.

3.2.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan pada penelitian ini dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu:

A. Variabel bebas (*Independent*).

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak kunyit putih.

B. Variabel terikat (*dependent*).

Variabel terikat pada penelitian ini adalah efek analgetik.

3.2.3 Definisi Operasional

Definisi operasional dari tiap variabel pada penelitian ini ditunjukkan pada tabel sebagai berikut:

Tabel 3.1 Definisi Operasional Pada Penelitian

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat ukur	Hasil ukur	Skala
1	Ekstrak kunyit putih	Ekstrak kunyit putih diberikan dengan konsentrasi sebanyak 40 mg/KgBB, 80 mg.KgBB, dan 160 mg/KgBB.	Timbangan	Miligram (mg)	Ordinal
2	Efek analgetik	Lama waktu hambat nyeri pada tikus yang diukur dengan cara menghitung lama waktu yang dibutuhkan tikus dari mulai diinduksi nyeri berupa panas sampai menunjukkan respon berupa menggerakkan ekornya	<i>Stopwatch</i>	Detik (s)	Interval

3.2.4 Prosedur Penelitian

3.2.4.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Kunyit Putih

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi kunyit putih menggunakan pelarut etanol karena zat aktif *curcumin* yang akan diteliti tidak dapat larut dalam air. Oleh

karena itu ekstraksi yang dilakukan menggunakan larutan etanol. Langkah-langkah ekstraksi etanol pada kunyit putih adalah sebagai berikut:

- A) Rimpang kunyit putih dibersihkan terlebih dahulu menggunakan air lalu dikeringkan.
- B) Setelah dibersihkan, rimpang kunyit putih diiris tipis.
- C) Keringkan rimpang yang telah diiris dalam lemari pengering pada suhu 40°C selama 5 hari.
- D) Setelah kering, rimpang akan ditumbuk hingga halus sampai menjadi bubuk.
- E) Rimpang kunyit putih yang telah bubuk, kemudian dimasukkan kedalam wadah plastik tertutup dan bersih.
- F) Sebanyak 600 gram serbuk rimpang kunyit putih dimasukkan kedalam bejana tertutup dan dibasahi dengan larutan etanol 96% sebanyak 300 ml.
- G) Kemudian lakukan maserasi selama 3 jam.
- H) Hasil maserasi akan dikumpulkan dan dilanjutkan dengan proses pemekatan menggunakan *rotatory evaporator* hingga ekstrak menjadi kental.

3.2.4.2 Pembagian Kelompok Perlakuan

Pada penelitian ini sampel akan dikelompokkan menjadi empat kelompok. Satu kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan. Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak akan diberikan dosis ekstrak etanol kunyit putih. Kelompok

perlakuan adalah kelompok yang akan diberikan ekstrak *Curcuma zedoaria* dengan dosis 40 mg/KgBB, 80 mg/KgBB, dan 160 mg/KgBB.

3.2.4.3 Perhitungan Dosis Ekstrak Kunyit Putih

Pada penelitian Zullies dkk. (2014), ditemukan bahwa dosis efektif curcumin sebagai analgetik pada tikus adalah 40 mg/KgBB. Maka dosis ekstrak kunyit putih pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

A. Kelompok II

Pada sampel kelompok II diberikan dosis 40 mg/KgBB.

B. Kelompok III

Pada sampel kelompok III diberikan dosis 80 mg/KgBB.

C. Kelompok IV

Pada sampel kelompok IV diberikan dosis 160 mg/KgBB.

3.2.4.4 Prosedur Induksi Nyeri Akut

Prosedur yang digunakan pada penelitian ini adalah prosedur *Tail Immersion test*. Berikut adalah langkah-langkah pada prosedur ini:

- 1) Subjek penelitian dibawa ke dalam ruang uji dan ukur berat dari masing-masing tikus.
- 2) Subjek penelitian diadaptasikan pada suhu ruangan sekitar 30 menit.
- 3) Persiapan dosis untuk diberikan pada subjek penelitian.
- 4) Pemberian dosis yang pada masing-masing subjek penelitian.

- 5) Air yang akan dipanaskan disiapkan dalam beaker glass.
- 6) Air dipanaskan sampai suhu antara 45-55°C.
- 7) Proses induksi dimulai dalam waktu 60 menit setelah pemberian dosis pada masing-masing subjek penelitian.
- 8) Ekor tikus direndam dalam air yang telah dipanaskan.
- 9) Perhitungan *latency time* (waktu yang dibutuhkan dari ekor tikus terendam dalam air panas sampai tikus menunjukkan respon dengan cara mengangkat ekornya.)
- 10) Apabila *latency time* melebihi 30 detik, maka induksi dihentikan untuk mengurangi kerusakan jaringan pada subjek penelitian.
- 11) Jika tikus sudah menunjukkan responnya, maka angkat tikus dan kembalikan ke dalam kandangnya.

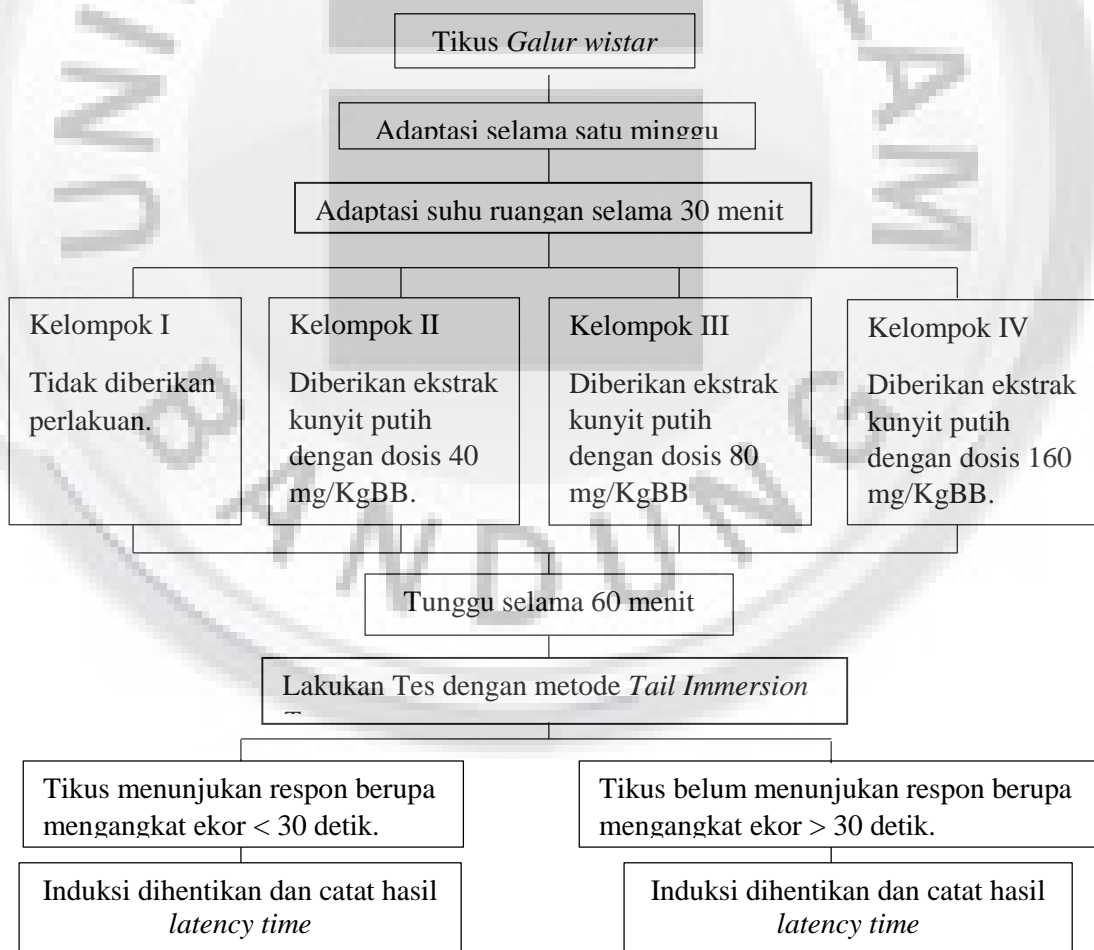
3.2.4.5 Alur Penelitian

Penelitian ini diawali dengan pengambilan subjek penelitian berupa tikus jantan dengan ras *Galur wistar* yang diperoleh dari Pusat Antar Universitas (PAU) Institut Teknologi Bandung (ITB) sebanyak 28 ekor. Subjek penelitian akan diadaptasikan terlebih dahulu di laboratorium selama satu minggu. Pada saat adaptasi berlangsung subjek penelitian tetap diberikan makanan dan minuman.

Setelah satu minggu, subjek penelitian akan dibagi menjadi empat kelompok. Sebelum diberikan ekstrak kunyit putih, terlebih dahulu subjek penelitian diadaptasikan dengan suhu ruangan sekitar selama 30 menit. Setiap kelompok, subjek penelitian akan dibagi sama rata yaitu tujuh ekor. Kelompok I

akan menjadi kelompok kontrol. Kelompok ini tidak diberikan apapun. Kelompok II akan diberikan ekstrak kunyit putih dengan dosis 40 mg/KgBB secara oral. Kelompok III akan diberikan ekstrak kunyit putih dengan dosis 80 mg/KgBB secara oral. Kelompok IV akan diberikan ekstrak kunyit putih dengan dosis 160 mg/KgBB secara oral. Setelah itu subjek penelitian akan didiamkan selama 60 menit.

Setelah 60 menit, subjek penelitian akan diinduksi nyeri berupa rasa panas dengan metode *Tail Immersion*. Hitung *latency time* dari subjek penelitian diinduksi nyeri hingga subjek penelitian menunjukkan respon dengan cara mengangkat ekornya. Induksi nyeri akan dihentikan jika subjek penelitian diinduksi lebih dari 30 detik untuk meminimalisir kerusakan jaringan pada subjek penelitian.



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian

3.2.5 Analisis Data

Setelah data dikumpulkan akan dianalisis secara statistik. Data bersifat parametrik, data dengan distribusi normal, dan homogen, maka akan dilakukan Uji *one-way* ANOVA untuk menguji apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Untuk menentukan dosis efektif minimalnya maka akan dilakukan uji Bonferroni dengan cara membandingkan rata-rata antar kelompok perlakuan. Analisis secara statistik akan dilakukan menggunakan bantuan *software* SPSS 22.

3.2.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium farmakologi dan terapi Universitas Padjadjaran pada tanggal 16 – 23 Mei 2015.

3.2.7 Aspek Etik Penelitian

Percobaan pada hewan harus memenuhi standar etik yang berlaku, karena hewan coba seringkali mendapatkan perlakuan yang tidak menyenangkan, tidak nyaman, penuh dengan tekanan, rasa nyeri, bahkan sampai kematian.¹²

Berdasarkan hal diatas, peneliti harus menghormati dan menghargai subjek penelitian dengan cara memperlakukan sampel secara manusiawi.¹²

Terdapat prinsip pemanfaatan hewan coba berdasarkan *Replacement*, *Reduction*, dan *Refinement* (3R), yaitu:

A. *Replacement*¹²

Penggantian subjek penelitian dengan alternatif lain. Penggantian ini dibagi menjadi dua yaitu:

- a. Penggantian relatif bisa dengan menggunakan metode *in vitro* seperti menggunakan jaringan tubuh.¹²
- b. Penggantian absolut yaitu sama sekali tidak menggunakan hewan coba sebagai subjek penelitian.¹²

B. *Reduction*¹²

Menggunakan subjek penelitian seminimal mungkin menggunakan perhitungan yang cermat dan tepat agar besar sampel yang digunakan pada penelitian tidak berlebihan.¹²

C. *Refinement*¹²

Menghindari atau meminimalisir penderitaan yang dialami oleh subjek penelitian.¹²

Pada penelitian menggunakan hewan coba, sering sekali diperlukan adanya pembunuhan hewan untuk pengambilan jaringan pada akhir penelitian atau selama penelitian. Pada akhir penelitian, hewan coba yang mengalami nyeri hebat, perasaan tidak enak, dan kecacatan, harus dilakukan *euthanasia*.¹³

Euthanasia adalah proses dibunuh dengan layak. Manusia merupakan faktor paling penting dalam melakukan *euthanasia*. Adapun kriteria yang harus dipenuhi pada saat akan dilakukan *euthanasia*, antara lain:¹³

- A. Hewan coba mati dengan tidak memperlihatkan rasa panik, ketakutan, dan rasa nyeri.
- B. Hilangnya kesadaran harus dalam waktu yang singkat.
- C. Orang yang mengerjakan harus dapat diandalkan.
- D. Aman dilakukan untuk orang yang mengerjakannya.
- E. Efek fisiologis seminimal mungkin.
- F. Sesuai dengan syarat dan ketentuan penelitian.
- G. Mudah, murah, dan relatif bebas biaya dan peralatan mekanik.
- H. Lokasi dilakukannya *euthanasia* cukup jauh dari tempat pemeliharaan hewan.

