

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan *pre* dan *post test control group design*.

#### **3.2. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Waktu penelitian dilakukan selama bulan Oktober-Desember 2013.

#### **3.3. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley*.

## 2. Sampel

### a. Kriteria Sampel

#### 1. Kriteria Inklusi

- a. Tikus jantan galur *Sprague Dawley* sehat (bergerak aktif).
- b. Umur 2-3 bulan.
- c. Berat badan 180-200 gram.

#### 2. Kriteria Eksklusi

Tikus sakit atau mati sebelum mendapat perlakuan.

#### 3. Kriteria *Drop Out*

- Tikus mati.
- Tikus tampak sakit (gerakan tidak aktif, tidak mau makan, rambut kusam atau rontok).

### b. Besar Sampel

Sampel penelitian ini ditentukan menurut rumus Federer untuk uji eksperimental, yaitu:

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

dimana (t) adalah kelompok perlakuan, dan (n) adalah jumlah sampel perkelompok perlakuan.

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

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

$$4 (n - 1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \sim 5$$

Dalam penelitian ini, tikus dibagi dalam dua kelompok kontrol perlakuan dan tiga kelompok perlakuan, dan jumlah sampel per kelompok lima ekor, sehingga didapat jumlah sampel 25 ekor tikus.

### **3.4. Alat dan Bahan Penelitian**

#### **1. Alat Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Kandang tikus beserta kelengkapan pemberian makan
- Gelas Ukur
- Sduit
- Jarum oral
- Gelas kimia beserta spatula
- Neraca digital
- Kertas saring

- *Rotary evaporator*
- *Waterbath*
- *Stopwatch*

## 2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Ekstrak daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steensis)
- Asam mefenamat
- *Aquadest*
- Karagenin 1%

### 3.5. Prosedur Penelitian

#### 1. Prosedur Pemberian ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steensis)

##### a. Cara pembuatan ekstrak etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steensis)

Daun Binahong diperoleh dari kebun di kawasan Sukabumi, Bandar Lampung. Masing-masing simplisia yang sudah dibersihkan dan dikeringkan hingga diperoleh simplisia kering, dipotong-potong  $\pm 5$  mm dan diblender sampai jadi bubuk kasar. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70 % selama 24 jam kemudian diuapkan dengan evaporator untuk menguapkan pelarut sehingga didapatkan ekstrak kental.

## b. Cara perhitungan dosis

Volume cairan maksimal yang dapat diberikan per oral pada tikus adalah 5 ml (Rosalind Franklin University, 2012). Menurut Laurence dan Bacharach (1964), faktor konversi dosis dari manusia Eropa dengan berat badan 70 kg terhadap hewan uji (tikus) dengan berat badan 200 g adalah 0,018. Berat badan rata-rata orang Indonesia adalah 50 kg (Birawati, 2012).

Kelompok kontrol positif diberikan asam mefenamat dengan dosis  
 $= 500 \text{ mg} \times (70\text{kg}/50\text{kg}) \times 0,018 = 12,6 \text{ mg}/200 \text{ gram BB}$ .

Dosis lazim yang digunakan masyarakat untuk mengatasi inflamasi ringan adalah 2 lembar daun binahong perhari. Massa rata-rata satu lembar daun binahong adalah 1 gram.

Dosis lazim masyarakat =  $2 \times 1 \text{ gram} = 2 \text{ gram}$ .

Dosis konversi tikus =  $2 \times (70\text{kg}/50\text{kg}) \times 0,018 = 0,504 \text{ g} = 50,4 \text{ mg}/200\text{g BB}$

Dalam penelitian ini digunakan dosis ekstrak daun binahong yang bertingkat:

Kelompok uji I : Dosis rendah/dosis I =  $0,5 \times 50,4 \text{ mg}/200 \text{ g BB}$   
 $= 25,2 \text{ mg}/200 \text{ g BB}$

Kelompok uji II : Dosis sedang/dosis II =  $1 \times 50,4 \text{ mg}/200 \text{ g BB}$   
 $= 50,4 \text{ mg}/200 \text{ g BB}$

Kelompok uji III : Dosis tinggi/dosis III =  $2 \times 50,4 \text{ mg}/200 \text{ g BB}$   
 $= 100,8 \text{ mg}/200 \text{ g BB}$

## 2. Prosedur Penelitian

- a. Tikus jantan galur *Sprague Dawley* (180-200 gr) diadaptasikan selama satu minggu sebelum mulai diberikan perlakuan.
- b. Tikus dimasukkan ke dalam 5 kelompok
  - Kelompok 1 (5 ekor tikus) sebagai kontrol negatif yang diberikan *aquadest* 5ml
  - Kelompok 2 (5 ekor tikus) sebagai kontrol positif yang diberikan asam mefenamat 12,6 mg/200g BB
  - Kelompok 3 (5 ekor tikus) sebagai kelompok perlakuan 1 yang diberikan ekstrak daun binahong 25,2 mg/200g BB
  - Kelompok 4 (5 ekor tikus) sebagai kelompok perlakuan 2 yang diberikan ekstrak daun binahong 50,4 mg/200g BB
  - Kelompok 5 (5 ekor tikus) sebagai kelompok perlakuan 3 yang diberikan ekstrak daun binahong 100,8 mg/200g BB
- c. Tikus dipuasakan 24 jam sebelum masa percobaan dengan tetap diberi minum.
- d. Melarutkan 0,1 gram karagenin dalam 10 ml larutan salin.
- e. Mengukur volume telapak kaki kanan dengan cara volumemetriik sesuai Hukum Archimedes menggunakan gelas ukur yang telah dikalibrasi sebelum diberi perlakuan ( $t=0$ ).
- f. Memberikan ekstrak daun Binahong dan asam mefenamat peroral sesuai dengan kelompok perlakuan masing-masing tikus ( $t=0'$ ).

- g. Melakukan induksi dengan 0,1 ml karagenin 1% diinjeksikan pada telapak kaki kanan tikus 1 jam setelah pemberian ekstrak dan asam mefenamat (t=1).
- h. Menghitung volume edema pada telapak kaki setelah injeksi karagenin (interval waktu 1,2,3,4,5,6 jam) dengan cara volumemetri menggunakan gelas ukur yang telah dikalibrasi. Pengulangan pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali kemudian hasil tersebut dirata-rata.
- i. Menganalisis data yang diperoleh secara statistik
- j. Menghitung persentase penghambatan edema dengan rumus (Mogosan dan Munteanu, 2008):

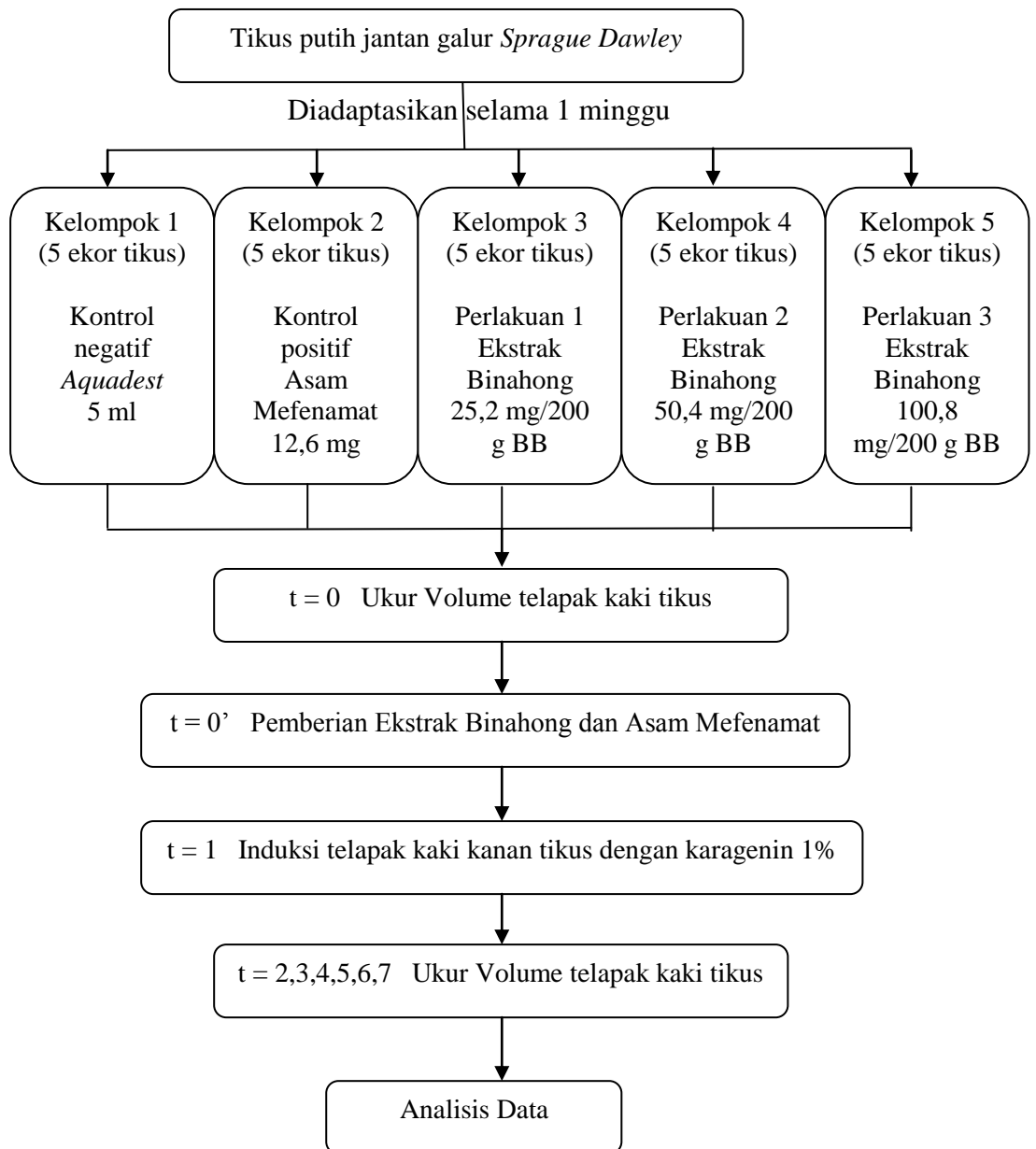
$$\% \text{ penghambatan edema} = \left(1 - \frac{X \text{ substance}}{X \text{ control}}\right) \times 100 \%$$

Keterangan :

$X \text{ substance}$  = volume rerata telapak kaki tikus dalam kelompok kontrol (ml)

$X \text{ control}$  = volume rerata telapak kaki tikus dalam kelompok perlakuan(ml)

### 3. Alur Penelitian



**Gambar 6.** Alur Penelitian



### **3.6. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional**

#### **1. Identifikasi Variabel**

- a. Variabel bebas / independen
- b. Variabel tergantung / dependen

#### **2. Klasifikasi Variabel**

- a. Variabel Independen : Dosis ekstrak daun Binahong dan asam mefenamat
- b. Variabel Dependen : Volume telapak kaki tikus

### 3. Definisi Operasional

**Tabel 1.** Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Skala
<b>Dosis Ekstrak Daun Binahong</b>	Dosis ekstrak yang terbuat dari daun Binahong ( <i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis) dalam pelarut etanol 70%	Numerik
<b>Karagenin</b>	Zat yang digunakan untuk menginduksi edema pada telapak kaki tikus	
<b>Volume Telapak Kaki Tikus</b>	Volume telapak kaki tikus yang diukur dari ujung jari kaki hingga mata kaki dengan gelas ukur secara volumetrik.	Numerik
<b>Persentase Penghambatan Edema</b>	Persentase penghambatan edema untuk menilai kerja obat antiinflamasi dengan rumus:  % penghambatan edema =  $\left(1 - \frac{X_{substance}}{X_{control}}\right) \times 100 \%$	Numerik
	Keterangan :  $X_{substance}$ = volume rerata telapak kaki tikus dalam kelompok kontrol (ml)  $X_{control}$ = volume rerata telapak kaki tikus dalam kelompok perlakuan(ml)	

### 3.7. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *software* pengolah data statistik dengan uji normalitas data (*Shapiro-Wilk*) dan homogenitas (*Levene*). Jika data berdistribusi normal serta homogen ( $p > 0,05$ ), maka dilanjutkan dengan uji beda lebih dari dua sampel, yaitu uji analisis varian satu arah (*one way ANOVA*) dengan taraf kepercayaan 95% sehingga dapat diketahui apakah perbedaan yang diperoleh bermakna atau tidak. Uji *ANOVA* akan dianggap bermakna bila  $p < 0,05$  dan selanjutnya dilakukan uji post hoc. Jika salah satu syarat untuk uji *ANOVA* tidak terpenuhi, maka dilakukan uji *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui adanya perbedaan. Apabila terdapat perbedaan bermakna, dilakukan uji *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antar tiap kelompok perlakuan.

### 3.8. Justifikasi Etik

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian ini menggunakan hewan coba sebagai sampel sehingga dalam pelaksanaan penelitian, peneliti akan menerapkan prinsip 3R yaitu *Replacement*, *Reduction* dan *Refinement*.

1. *Replacement*, adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh sel atau biakan jaringan (Ridwan, 2013).
2. *Reduction*, adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Pengurangan jumlah penggunaan hewan coba dilakukan sampai pada batas jumlah yang masih bisa dianalisis secara statistik. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus Freederer yaitu  $(n-1)(t-1) \geq 15$ , dengan  $n$  adalah jumlah hewan yang diperlukan dan  $t$  adalah jumlah kelompok perlakuan (Ridwan, 2013). Pada penelitian ini dibutuhkan jumlah sampel minimal sebanyak 5 ekor tikus tiap kelompok dengan total 25 ekor tikus yang dibutuhkan.
3. *Refinement*, adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi (Ridwan, 2013).
  - a. Bebas dari rasa lapar dan haus, pada penelitian ini hewan coba diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitum*.
  - b. Bebas dari ketidak-nyamanan, pada penelitian hewan coba ditempatkan di *animal house* dengan suhu terjaga 20-25°C, kemudian hewan coba terbagi menjadi 3-4 ekor tiap kandang. *Animal house* berada jauh dari gangguan bising dan aktivitas manusia serta kandang dijaga kebersihannya.

- c. Bebas dari nyeri dan penyakit dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan percobaan jika diperlukan. Pada penelitian ini, hewan coba diberikan anestesi berupa eter sebelum diinjeksikan induksi karagenin pada telapak kakinya.
- d. Bebas dari stres, dengan memberikan waktu adaptasi selama 1 minggu sebelum dilakukan perlakuan.

Prosedur pemeliharaan, perlakuan dan pengambilan data selama penelitian mempertimbangkan tindakan manusiawi dan pada akhir penelitian akan dilakukan tindakan dislokasi servikal untuk menewaskan hewan coba. Kemudian, kadaver hewan coba akan dimasukkan ke dalam plastik, ditutup rapat lalu dimusnahkan dengan pembakaran.