

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan uji *quasi eksperimental* dengan desain *post test control group* untuk mengetahui pengaruh perbedaan pemberian ekstrak etanol kelopak bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) dan ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya* L.) dengan melibatkan kelompok eksperimen yaitu mencit yang di induksi asam asetat 1%.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

Dalam penelitian ini populasi dan sampel yang digunakan adalah mencit, dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan. Pengambilan sampel menggunakan teknik *purposive quota sampling* yaitu dengan cara memilih sampel diantara populasi sesuai dengan yang dikehendaki peneliti, sehingga dapat mewakili karakteristik populasi (Nursalam, 2008). Kemudian untuk pengelompokan menggunakan *simple random sampling*. Perhitungan besar dan pembagian sampel adalah sebagai berikut:

a. Besar sampel dicari dengan rumus menurut Supranto J (2000):

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

Keterangan : n : jumlah sampel

t : banyaknya kelompok perlakuan

Jika jumlah perlakuan ada 4, maka jumlah sample setiap kelompok dapat dihitung :

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

$$(n-1)3 \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 15 + 3$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6 \text{ ekor}$$

Karena hasil yang didapat adalah 6 ekor, jadi jumlah keseluruhan mencit yang dibutuhkan adalah 24 ekor.

b. Pembagian sampel secara *simple random sampling*:

- 1) Kelompok 1: kelompok mencit diberi suspensi ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya* L.) dosis 12 mg/20gBB secara oral lalu diberi asam asetat 1% sebanyak 10 ml/kgBB secara intraperitoneal.
- 2) Kelompok 2: kelompok mencit diberi suspensi ekstrak etanol kelopak bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) dosis 30 mg/20gBB secara oral lalu diberi asam asetat 1% sebanyak 10 ml/kgBB secara intraperitoneal.
- 3) Kelompok 3: kelompok mencit diberi suspensi paracetamol dosis 1,2 mg/20gBB secara oral lalu diberi asam asetat 1% sebanyak 10 ml/kgBB secara intraperitoneal sebagai kontrol positif.
- 4) Kelompok 4: kelompok mencit diberi suspensi aquades dosis 0,3 ml secara oral lalu diberi asam asetat 1% sebanyak 10 ml/kgBB secara intraperitoneal sebagai kontrol negatif.

Kriteria inklusi dan eksklusi dari sampel diuraikan sebagai berikut:

5) Kriteria inklusi

Penelitian ini menggunakan mencit Swiss berusia 2-3 bulan, dengan berat badan berkisar 20-30 gram, kondisi sehat, jenis kelamin jantan.

6) Kriteria Eksklusi

Mencit Swiss mati sebelum tiba waktu penelitian.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium penelitian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan Mei 2018.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol kelopak bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) dan ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya* L.) pada mencit.

2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah efektivitas analgetika.

E. Definisi Operasioanal

1. Efek analgesik

Adalah efek yang dihasilkan dari aktivitas senyawa analgetika atau senyawa yang dapat mengurangi rasa nyeri. Pada penelitian ini efek analgesic dilihat dari pengurangan respon nyeri pada mencit.

2. Ekstrak etanol kelopak bunga matahari (*Helianthus annuus* L.)

Adalah sediaan pekat yang diperoleh dari pengekstrakan simplisia kelopak bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) menggunakan metode meserasi dengan zat etanol 96% sebagai pelarut. Ekstrak yang sudah dibuat, diambil sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml aquades. Diaduk sampai homogen

dan diambil sebanyak 0,3 ml menggunakan sonde oral 1ml untuk diberikan pada tiap hewan uji, dengan perhitungan dosis yaitu :

$$\text{Dosis ekstrak} = (0,3 \text{ ml} / 10 \text{ ml}) \times 1000 \text{ mg} = 30 \text{ mg}$$

Jadi dosis yang diberikan untuk masing-masing mencit yaitu sebanyak 30 mg/20gBB.

3. Ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya* L.)

Adalah sediaan pekat yang diperoleh dari pengestrakan simplisia daun pepaya (*Carica papaya* L.) menggunakan metode meserasi dengan zat etanol 96% sebagai pelarut. Ekstrak yang sudah dibuat, diambil sebanyak 400 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml aquades. Diaduk sampai homogen dan diambil sebanyak 0,3 ml menggunakan sonde oral 1ml untuk diberikan pada tiap hewan uji, dengan perhitungan dosis yaitu

$$\text{Dosis ekstrak} = (0,3 \text{ ml} / 10 \text{ ml}) \times 400 \text{ mg} = 12 \text{ mg}$$

Jadi dosis yang diberikan untuk masing-masing mencit yaitu sebanyak 12 mg/20gBB.

4. Paracetamol

Sebagai kontrol positif digunakan obat analgesik paracetamol dalam sediaan sirup dengan dosis maksimal 500 mg/50kgBB. Perhitungan dosis konversi mencit dengan berat badan 20 gram pada manusia normal 70 kg yaitu 0,0026. Maka dosis untuk mencit adalah:

$$= (70/50 \times 500 \text{ mg}) \times 0,0026$$

$$= 1,82 \text{ mg}/20\text{gBB}$$

$$= 60 \text{ mg}/\text{kgBB}$$

=1,2 mg/20gBB

5. Mencit

Mencit adalah hewan mamalia yang paling umum digunakan sebagai hewan uji penelitian di laboratorium. Karena hewan mencit sifatnya mudah berkembang biak, aktif dan sangat praktis untuk penelitian kuantitatif (Kusumawati, 2004).

Klasifikasi taksonomi mencit menurut Arrington (1972) yaitu:

Kingdom : *Animalia*
Filum : *Chordata*
Class : *Mamalia*
Ordo : *Rodentia*
Genus : *Mus*
Spesies : *Mus musculus*

6. Induksi nyeri

Induksi nyeri dilakukan dengan kombinasi secara kimiawi menggunakan asam asetat 1% yang disuntikkan secara intraperitoneal dan secara termik dengan meletakkan mencit diatas hot plat pada suhu 55⁰C. Adanya stimulus nyeri akan merangsang pelepasan prostaglandin, sehingga mencit akan meloncat dan menggeliatkan atau menjilat kaki sebagai mekanisme pertahanan tubuh terhadap nyeri.

F. Instrumen Penelitian

1. Alat penelitian

- a. Sarung tangan
- b. Alat meserasi
- c. Hot plate

- d. Alat-alat gelas
- e. Blender
- f. Saringan
- g. Kain flanel
- h. Kertas saring
- i. Sonde oral
- j. Jarum
- k. Pipet tetes
- l. Waterbath
- m. Timbangan analitik
- n. Timbangan hewan
- o. Kandang hewan
- p. Stopwatch

2. Bahan Penelitian

- a. Daun pepaya (*Carica papaya* L.)
- b. Kelopak bunga matahari (*Helianthus annuus* L.)
- c. Paracetamol
- d. Aquades
- e. Asam asetat 1%
- f. Etanol 96%
- g. Es batu

G. Jalannya Penelitian

1. Persiapan Bahan

a. Pengambilan bahan dan identifikasi

- 1) Tanaman kelopak bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) diambil dari ladang bunga matahari di daerah Sanden, Bantul, Yogyakarta.
- 2) Tanaman daun pepaya (*Carica papaya* L.) diambil di daerah Kasihan, Bantul, Yogyakarta.
- 3) Mencit Swiss diperoleh dari unit pemeliharaan hewan coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada .

b. Pengeringan bahan

Sebelum dibuat ekstrak, daun pepaya (*Carica papaya* L.) dan kelopak bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) dibersihkan dari kotoran dengan cara dicuci menggunakan air. Kemudian dijemur sinar matahari dengan ditutup kain hitam sampai kering atau dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50⁰C.

c. Pembuatan suspensi ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% sebagai pelarut. Bahan yang sudah kering dihaluskan sampai diperoleh simplisia bubuk. Direndam selama kurang lebih 6 hari dan dilakukan pengadukan secara berkala. Kemudian disaring secara bertahap, pertama memakai kain flannel kemudian memakai kerta saring. Hasil penyaringan diuapkan menggunakan rotary evaporator untuk memisahkan ekstrak dengan larutan etanol. Tahap selanjutnya, di uapkan kembali pada waterbath hingga dihasilkan ekstrak kental.

d. Persiapan hewan uji

Sebelum dilakukan penelitian, hewan uji diadaptasikan dengan lingkungan dan makanan selama 2-3 hari. Mencit dipuasakan kurang lebih 12 jam sebelum diberi perlakuan.

2. Perlakuan

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 24 ekor, dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, yaitu:

- a. Kelompok 1: kelompok mencit diberi suspensi ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya* L.) dosis 12 mg/20gBB secara oral lalu diberi asam asetat 1% sebanyak 10 ml/kgBB secara intraperitoneal.
- b. Kelompok 2: kelompok mencit diberi suspensi ekstrak etanol kelopak bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) dosis 30 mg/20gBB secara oral lalu diberi asam asetat 1% sebanyak 10 ml/kgBB secara intraperitoneal.
- c. Kelompok 3: kelompok mencit diberi suspensi paracetamol dosis 1,2 mg/20gBB secara oral lalu diberi asam asetat 1% sebanyak 10 ml/kgBB secara intraperitoneal sebagai kontrol positif.
- d. Kelompok 4: kelompok mencit diberi suspensi aquades dosis 0,3 ml secara oral lalu diberi asam asetat 1% sebanyak 10 ml/kgBB secara intraperitoneal sebagai kontrol negatif.

Setelah dikelompokkan, semua mencit diberikan perlakuan. Mencit dibiarkan selama 30 menit agar bahan terabsorpsi di dalam tubuh. Kemudian, tiap mencit diletakkan diatas hot plate pada suhu 55⁰C untuk stimulus nyeri pada menit ke 30, 60, 90, dan 120.

3. Pengamatan

Pengamatan dilakukan dengan menghitung respon nyeri berupa meloncat, menggeliatkan dan menjilat kaki yang terjadi selama 2 menit pada menit ke 30, 60, 90, dan 120. Hasilnya dicatat dan kemudian dibandingkan. Kekuatan efek analgesik dihitung berdasarkan kemampuan penurunan respon nyeri dari hewan uji dari setiap kelompok perlakuan.

H. Analisis Data

Variabel data hasil penelitian merupakan skala nominal yang didapatkan dari kelompok tidak berpasangan sehingga analisa statistik menggunakan *uji one way ANOVA* dengan syarat distribusi data normal, bila distribusi data tidak normal uji statistik menggunakan *Kruskal Wallis*. Selanjutnya dilakukan uji Tukey HSD untuk mengetahui perbedaan dari masing-masing kelompok perlakuan.

I. Etika Penelitian

Karena penelitian ini melibatkan hewan uji, maka peneliti perlu memahami masalah etik penggunaan hewan percobaan. Komisi Nasional Kode Etik Penelitian Kesehatan (2006) menjelaskan tentang kelayakan penggunaan hewan percobaan secara etis pada penelitian kesehatan harus dikaji dengan membandingkan penderitaan yang dialami oleh hewan percobaan dengan manfaat yang akan diperoleh untuk manusia (*risk benefit analysis*). Penelitian kesehatan dengan menggunakan hewan percobaan hanya dapat dipertanggung jawabkan jika :

1. Tujuan penelitian cukup bernilai manfaat.
2. Desain penelitian disusun sedemikian rupa sehingga kemungkinannya sangat besar bahwa penelitian tersebut akan mencapai tujuannya.

3. Tujuan penelitian dapat dicapai dengan menggunakan subyek atau prosedur alternatif yang secara etis lebih dapat diterima namun sekaligus tidak mengurangi kaidah ilmiah yang diperlukan.
4. Manfaat yang akan diperoleh jauh lebih berarti dibandingkan dengan penderitaan yang dialami hewan percobaan.

Pada tahun 1954, Charles Hume, pendiri *Universitas Federation for Animal Welfare* (UFAW), mengusulkan untuk dilakukannya studi ilmiah tentang teknik manusiawi (humane technique) pada percobaan hewan di laboratorium. W.M.S Russell dan R.I.Burch (microbiologist) yang ditunjuk untuk melakukan studi ilmiah tersebut menerbitkan hasil studinya dalam buku berjudul *The Principles of Humane Experimental Technique*. Dalam buku tersebut diajukan defeni prinsip 3R sebagai perlakuan terhadap hewan percobaan, yaitu:

1. Reduction : Penggunaan hewan dalam jumlah sekecil mungkin tetapi memberikan hasil penelitian yang sah.
2. Replacement : Mengganti hewan percobaan dengan memakai jaringan hewan dari rumah potong, kultur jaringan sel, atau program komputer.
3. Refinement : Mengurangi rasa stres dengan memakai obat analgetik, sedative, anastesi, dan melakukan prosedur secara benar oleh tenaga ahli tehnisi terlatih.

Prinsip ini telah digunakan secara luas di seluruh dunia. Banyak negara menggunakan prinsip 3R dalam penetapan peraturan perundang-undangannya.

Kelayakan etik pada penelitian ini akan diajukan kepada Komisi Etika Penelitian FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

