

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

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

Sampel penelitian ini adalah 25 tikus wistar jantan yang akan dikelompokkan menjadi 5 kelompok kriteria: Tikus wistar jantan, usia \pm 3 bulan dengan berat badan 150-200 gram.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Terapi Universitas Gajah Mada (UGM). Penelitian ini dilakukan selama \pm 2 bulan (Oktober 2017 - November 2017).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : ekstrak etanol batang serai (*Cymbopogon citratus*) 5%; 10%; dan 20%, ibuprofen 3,6 mg/200 gr BB tikus.
2. Variabel terikat : Efek analgetik
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 etanol batang 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 dengan dosis 3,6 mg/200 gr BB tikus.
3. Efek analgetik adalah kemampuan bahan uji untuk menghambat nyeri pada kaki hewan uji akibat diletakkan diatas *hot plate*. Pengukuran efek analgetik menggunakan stopwatch. Efek analgetik dinilai berdasarkan lamanya timbul rasa nyeri (onset nyeri) saat tikus berada

diatas *hot plate* dengan suhu $\pm 55^{\circ}\text{C}$ dengan memperlama waktu tikus bertahan diatas *hot plate* sampai tikus menjilat kaki atau meloncat.

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) *hotplate*; (4) Alat – alat gelas; (5) *Water bath*; (6) *Oven*, *Vacum rotary evaporator*; (7) *Blender*; (8) Kertas saring; (9) Tisu gulung; (10) Spidol permanen; (11) *stopwatch*; (12) 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) Aquades 100 ml; (5) Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar sebanyak 25 ekor.

3. Hewan Percobaan

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih wistar jantan 25 ekor, kondisi sehat, galur wistar, umur 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi dan Terapi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta (UGM).

G. Jalannya Penelitian

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

1. Persiapan Alat dan Bahan

Pilih dan kumpulkan batang serai yang masih muda berwarna hijau pupus, bebas dari hama, penyakit dan pengganggu lainnya. Batang serai (*Cymbopogon citratus*) yang akan digunakan dicuci dengan air hingga bersih, ditiriskan agar dapat bebas dari sisa cucian, dikeringkan, dan diangin – anginkan. Setelah kering dan bebas air kemudian digiling dengan mesin penyerbuk yang memiliki saringan berdiameter 1 mm hingga diperoleh 400 gram berat serbuk batang serai, serbuk yang diperoleh disimpan dalam wadah bersih dan tertutup rapat.

2. Pembuatan Ekstrak Etanol Batang Serai

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 poselin dan dipanaskan dengan pemanas *water bath* sambil terus diaduk agar kadar air yang terkandung hilang, maka didapatkan ekstrak etanol batang serai murni.

Perhitungan hasil % kadar ekstrak dengan rumus:

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

3. Pengenceran Ekstrak Etanol Batang Serai

Untuk mengencerkan ekstrak etanol batang serai dilakukan pembuatan larutan stok. Lima gram ekstrak etanol batang serai dilarutkan ke dalam etanol 70% sebanyak 100 ml, akan didapatkan ekstrak etanol batang serai konsentrasi 5%. Sepuluh gram ekstrak etanol batang serai dilarutkan ke dalam etanol 70% sebanyak 100 ml, akan didapatkan ekstrak etanol batang serai konsentrasi 10%. Dua puluh gram ekstrak etanol batang serai dilarutkan ke dalam etanol 70% sebanyak 100 ml, akan didapatkan ekstrak etanol batang serai konsentrasi 20%.

4. Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar dengan kondisi sehat, berumur 2-3 bulan dengan berat 150-200 gram sebanyak 25 ekor. Tikus putih diperoleh dari Laboratorium 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.

Tikus putih wistar jantan dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok. Tiap kelompok terdiri dari 5 ekor. Sebelum penelitian dilakukan, seluruh kelompok tikus dipuaskan kurang lebih selama 12 jam untuk meniadakan variabel pengganggu yang berasal dari makanan. Selama penelitian dilakukan, seluruh kelompok tikus putih tidak diberi makanan namun tetap diberi air minum secukupnya. Sesaat sebelum pemberian perlakuan dilakukan pengukuran berat badan tikus ditimbang dengan neraca dan diberi nomor pada ekor serta pada kaki kanan belakang ditandai sebatas mata kaki menggunakan spidol.

5. Uji Analgetik

Sebelum pengambilan hasil dilakukan, tikus diadaptasikan terhadap lingkungan dan makanan selama 3 hari. Serta diadaptasikan dengan *hot plate*. Selanjutnya sebelum diberikan injeksi tikus dibagi menjadi 5 kelompok. Setiap kelompok mendapat perlakuan yang berbeda. Pada kelompok I tidak diberi perlakuan apapun, pada kelompok II diberikan injeksi larutan ibuprofen 3,6 mg/kg berat badan tikus, kelompok III, IV, dan V diberi perlakuan secara oral ekstrak etanol batang serai 5%, 10%, dan 20%. Tikus dibiarkan 2 jam agar obat dapat terabsorpsi. Selanjutnya tiap tikus diinduksi nyeri dengan cara termik. Induksi nyeri cara termik ini dilakukan dengan menempatkan tikus di atas *hot plate* dengan suhu tetap yaitu 55°C sebagai stimulus nyeri sebagai patokan bahwa tikus mulai merasa nyeri adalah pada waktu tikus mulai menjilat kaki belakang atau meloncat.

6. Perhitungan Dosis Perlakuan

- a) Kelompok I, merupakan kontrol negatif sehingga tidak diberikan perlakuan pada kelompok tikus tersebut.
- b) Kelompok II, diberikan obat pembanding yaitu ibuprofen sebagai kontrol positif. Dosis ibuprofen yang digunakan pada manusia adalah dosis sebesar 50-100 mg yang diminum tiap 4 jam. Dosis maksimum 200 mg/hari dan tidak boleh dikonsumsi lebih dari 3 hari. 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/200 gr berat badan 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.

- c) Kelompok III, dengan serbuk batang serai seberat 5 gr. Berat serbuk batang serai serai yang diperlukan untuk tikus putih dengan berat rata-rata 200 gram adalah $0,018 \times 70/50 \times 5000$ 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 etanol batang serai untuk kelompok III adalah 5%.
- d) 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 $0,018 \times 70/50 \times 10000$ 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 etanol batang serai untuk kelompok III adalah 10%.

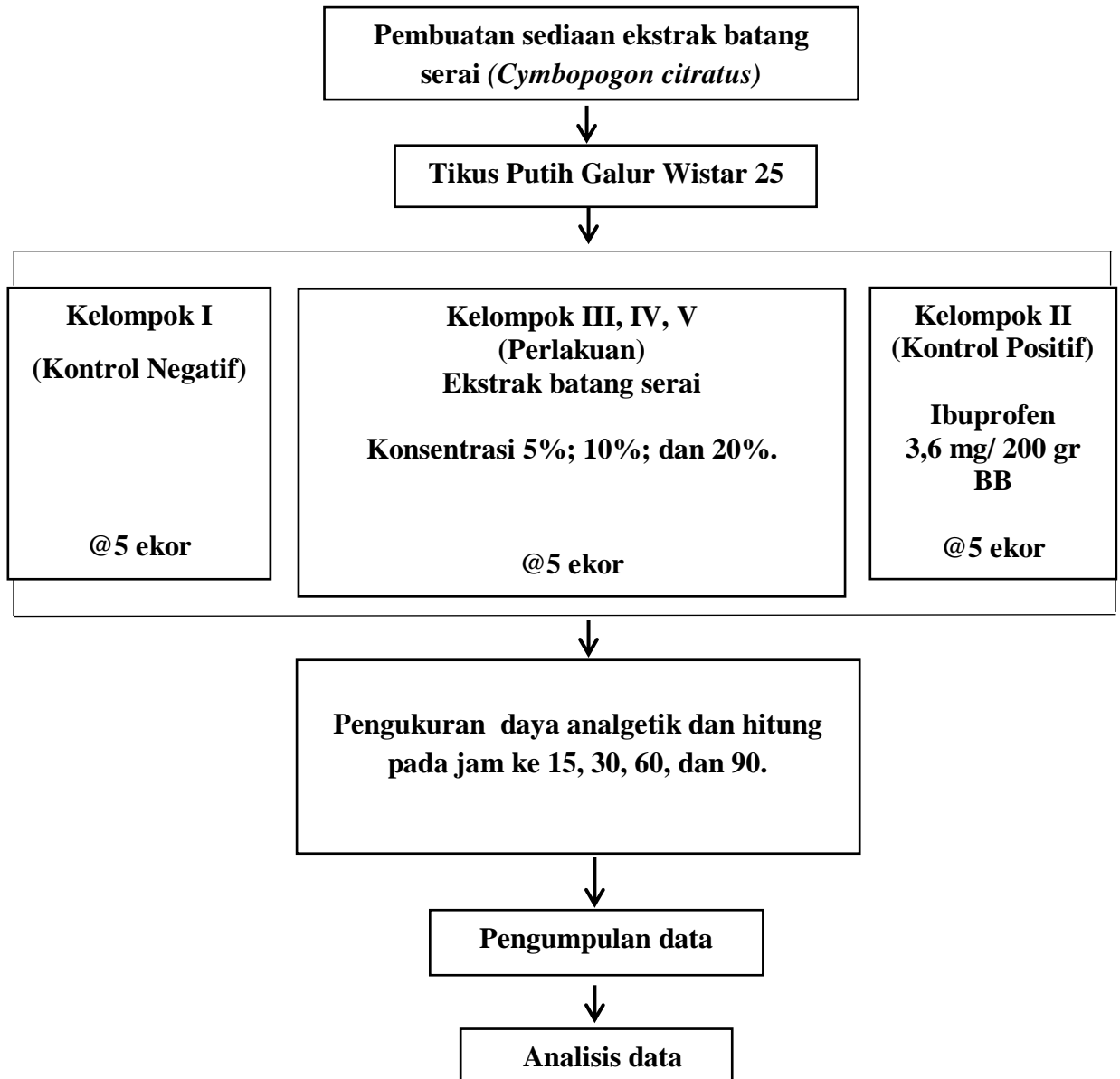
- e) Kelompok V, dengan serbuk batang serai seberat 20 gr. Berat serbuk batang serai yang diperlukan untuk tikus putih dengan berat rata-rata 200 gram adalah $0,018 \times 70/50 \times 20000$ mg. Hasil yang diperoleh adalah 504 mg/200 gr BB tikus. Berat 200 gr tersebut merupakan standar tiap satu ekor 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 $504 \text{ mg}/3 \text{ ml} \times 100 \text{ ml}$. Hasil yang diperoleh adalah 20000 mg atau 20 gr. Jadi konsentrasi ekstrak etanol batang serai untuk kelompok III adalah 20 %.

Semua perlakuan diberikan secara injeksi dengan dosis 2 ml/200 gr berat badan tikus. Selama penelitian, tikus putih diberi perlakuan sesuai dengan kelompoknya masing-masing dan tiap kelompok mendapat perlakuan yang sama.

7. Pengukuran Efek Analgetik

Tepat pada waktu tikus berada di atas *Hot Plate*, *stopwatch* dihidupkan kemudian saat tikus mulai menjilat kaki belakang atau meloncat maka *stopwatch* dimatikan. Selang waktu antara pemberian stimulus nyeri dan terjadinya respon disebut onset nyeri. Pengukuran efek analgetik menggunakan *stopwatch*. Efek analgetik dinilai berdasarkan lamanya timbul rasa nyeri (onset nyeri) yang ditandai dengan tikus menjilat kaki atau meloncat saat diatas *hot plate*.

H. Alur Penelitian



Gambar 5. Diagram alur jalannya penelitian

I. Analisis Hasil

Pada uji statistik yang harus dilakukan pertama kali adalah uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk*. Uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* merupakan metode uji yang valid dan efektif. Pada uji tersebut memiliki syarat yaitu jumlah sampel ≤ 50 . Pada uji *Shapiro-Wilk* dapat diambil keputusan jika nilai signifikansi $> 0,05$ maka data berdistribusi normal tetapi jika nilai signifikansi $< 0,05$ maka data tidak berdistribusi normal.

Apabila data tidak berdistribusi normal maka akan digunakan uji statistik non-parametrik menggunakan *Kruskal Wallis* tetapi apabila data berdistribusi normal uji statistik menggunakan uji *One-way ANOVA*.

Data berupa onset nyeri yang dianalisis dengan menggunakan *one-way ANOVA (Analysis Of Variance)*. Apabila terdapat beda nyata antara perlakuan maka dilanjutkan uji LSD (*Least Square Difference*) pada taraf signifikansi 95 % (Puspitasari dkk., 2003).