

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain true experimental laboratory dengan Randomized Post Test Only Controlled Group Design secara in vivo.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus Norvegicus*) umur 2 hingga 3 bulan dengan berat 180-200 gram. Tikus diberi pakan dan minum dengan cara ad libitum per oral. Tikus diletakkan di dalam kandang berukuran 45cm x 35,5cm x 14,5cm dengan jumlah 4 ekor tikus per kandang. Kandang tikus diletakkan di dalam ruang hewan coba Laboratorium Farmakologi FKUB.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah 24 ekor tikus wistar jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

4.2.3 Kriteria Inklusi

1. Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan.
2. Tikus berumur 2 hingga 3 bulan.
3. Tikus memiliki berat badan 180 hingga 200 gram.

4.2.4 Kriteria Eksklusi

1. Tikus yang mati saat penelitian berlangsung
2. Tikus yang sakit selama penelitian berlangsung

4.2.5 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel menggunakan purposive sampling sesuai dengan kriteria inklusi. Sample dikelompokkan menjadi enam kelompok yaitu : satu kelompok control negatif, satu kelompok control positif, satu kelompok arthritis dengan diberikan Natrium Diklofenak sebanyak 10mg/200grBB/hari, tiga kelompok dengan arthritis yang diberikan ekstrak galaktomannan dalam bentuk gel dengan tiga dosis berbeda (20mg/200grBB/hari, 30mg/200grBB/hari, 40mg/200grBB/hari). Penentuan kelompok secara simple random sampling.

Dalam menentukan jumlah minimal tikus per kelompok perlakuan, ditentukan dengan menggunakan rumus (Djala,2016):

$$\text{Jumlah tikus setiap perlakuan} = (t-1) \times (r-1) \geq 15$$

Jumlah tikus setiap perlakuan :

$$(6-1) \times (r-1) \geq 15$$

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

$$(r-1) \geq 15 : 5$$

$$r \geq 3 + 1$$

$$r \geq 4$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok perlakuan

r = jumlah replikasi sampel

Dari perhitungan dengan rumus didapatkan hasil minimal tikus per kelompok perlakuan adalah 4 ekor tikus. Sehingga jumlah tikus penelitian adalah 4 ekor per kelompok perlakuan dengan total 24 ekor tikus.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas adalah variasi dosis ekstrak kolang-kaling (galaktomannan) dan dosis jus kolang-kaling

4.3.2 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah Volume Edema pada kaki hewan coba model Arthritis.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi FK UB. Pelaksanaan penelitian diperkirakan selama 2 hingga 3 bulan (Maret hingga Mei 2015).

4.5 Bahan dan Alat / Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

1. Kolang-kaling yang di dapat dari pedagang di pasar besar Kota Malang Jawa Timur.
2. Natrium Diklofenak
3. Complete Freund's Adjuvant yang diproduksi oleh Sigma Aldrich USA.
4. Pakan standar diperoleh dari laboratorium farmakologi Universitas Brawijaya Malang, terdiri dari: pakan ayam/PAR-S (dengan kandungan air, protein, lemak, serat, abu, Ca, phosphor, antibiotika, cocodiosat 66,6%, dan tepung terigu 33,4%).
5. Tikus galur wistar jantan usia 2 hingga 3 bulan dengan berat badan sekitar 180-200 gram.

4.5.2 Alat Penelitian

Alat untuk pemeliharaan tikus :

1. Kandang dengan ukuran 45cm x 35,5cm x 14,5cm
2. Tutup dari kawat untuk menutup kandang agar tikus tidak keluar dari kandang.
3. Alat sonde
4. Botol wadah air minum tikus.
5. Sekam

Alat untuk perlakuan pada tikus dan ekstraksi kolang-kaling

1. Kapas
2. Spuit ukuran 1cc, 3cc, dan 10cc
3. Alat tulis
4. Timbangan
5. Neraca Sartorius
6. Pipet
7. Beaker glass
8. Spatula
9. Lemari pendingin
10. Sentrifuge
11. Valcon
12. Erlenmeyer 500 ml

4.5.3 Hewan Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada tikus berumur 2 hingga 3 bulan dengan berat 180 hingga 200 gram sebagai hewan coba. Tikus dipelihara di Laboratorium Farmakologi FKUB dengan persyaratan sesuai dengan penelitian eksperimental. Tikus ditempatkan di kandang dengan ukuran 45cm x 35,5cm x 14,5 cm dengan diberi alas sekam dan ditutup dengan penutup dari anyaman kawat.

Penelitian dilakukan pada tikus sebagai hewan coba dikarenakan mendukung penelitian terkait pengukuran volume edema pada hewan coba model arthritis karena struktur anatomi dan fisiologi dari tikus itu sendiri. Untuk membuat tikus dengan kondisi Arthritis, tikus diinjeksikan dengan CFA.

4.6 Defenisi Operasional

- a. Ekstrak kolang-kaling (galaktomannan) merupakan gel berisi galaktomannan dari kolang-kaling yang diperoleh dari Kecamatan Dau , Kabupaten Malang.
- b. Dosis ekstrak kolang-kaling (galaktomannan) yang dimaksud dalam penelitian ini adalah dosis yang diberikan sebagai perlakuan yaitu, 20mg/200grBB , 30mg/200grBB , dan 40mg/200grBB untuk uji efek anti inflamasi.
- c. Injeksi CFA (Complete Freund's Adjuvant) yang dimaksud dalam penelitian ini adalah pemberian Complete Freund's Adjuvant sebagai perlakuan yang diberi melalui injeksi intraplantar sebanyak 0,1cc/200grBB untuk menginduksi kondisi inflamasi pada kelompok hewan coba.
- d. Volume edema yang dimaksud dalam penelitian ini adalah ukuran edema akibat reaksi inflamasi yang timbul akibat injeksi CFA, dimana dapat dijadikan salah satu indicator fisik terjadinya inflamasi.
- e. Kaki Tikus yang dimaksud pada penelitian ini adalah kaki kiri belakang tikus dengan jari berjumlah 5.

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Ekstraksi Kolang-kaling

1. Persiapan bahan : Pencucian kolang-kaling yang akan di ekstraksi. Kolang-kaling dipotong kecil-kecil dengan ukuran ± 1 cm.
2. Kolang-kaling kering dengan berat 30 gram ditambah 375ml aquades dan dihaluskan dengan blender selama 5 menit. Hasil penghalusan disimpan di dalam refrigerator selama 24 jam.
3. Hasil penghalusan disentrifugasi dengan kecepatan 9500 rpm selama 15 menit.
4. Residu I ditambahkan 187,5 ml aquades, dihaluskan dan disentrifugasi pada kondisi yang sama.
5. Supernatan I dan II digabung, ditambahkan etanol 96% dengan perbandingan volume 1:2, kemudian disimpan selama 24 jam di refrigerator. Endapan yang terbentuk disaring dengan kain saring. Residu dicuci dengan etanol 96%.
6. Hasil yang didapat dikeringkan di dalam desikator, selanjutnya ditimbang berat galaktomannan yang diperoleh.
7. Analisa dilakukan 3 kali ulangan dan diperoleh rata-rata ekstrak kasar galaktomannan kolang-kaling dalam 30 gram.

4.7.2 Pembuatan gel galaktomannan

Ekstrak galaktomannan sebesar 2 gram dilarutkan dalam 100 ml aquades panas. Larutan dihomogenkan selama 12 jam menggunakan magnetic stirrer sehingga didapatkan hasil gel galaktomannan. Gel galaktomannan sebanyak 1 ml mengandung 20 mg ekstrak galaktomannan. Ekstrak galaktomannan yang sudah

dalam bentuk gel ini nantinya akan digunakan dalam proses terapi sebagai uji anti inflamasi untuk memudahkan pemberian kepada tikus model arthritis.

4.7.3 Perhitungan Dosis

Penentuan dosis Complete Freund's Adjuvant pada penelitian ini adalah berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Sri Mulyaningsih (2006) yaitu 0,1 ml.

Penentuan dosis Natrium Diklofenak pada penelitian ini merujuk kepada penelitian Sri Mulyaningsih (2006) yaitu 0,214 mg/200grBB tikus dan dosis maksimal natrium diklofenak sebanyak 2mg/kgBB/hari.

Dosis maksimal natrium diklofenak untuk setiap 200grBB tikus adalah

$$= 2\text{mg/kgBB}$$

$$= 2\text{mg}/1000\text{grBB}$$

$$= 0,2\text{mg}/100\text{grBB}$$

$$= 0,4\text{mg}/200\text{grBB}$$

Sehingga dosis pemberian natrium diklofenak pada tikus adalah 0,4mg/200grBB/hari.

Penentuan dosis galaktomannan pada penelitian ini merujuk kepada penelitian yang dilakukan oleh Ji Hoon (2005) yang menyebutkan bahwa dosis efektif galaktomannan dalam memberikan efek anti inflamasi dan penghambatan permeabilitas sel adalah 100mg/kgBB.

Dosis galaktomannan untuk setiap 200gr BB tikus adalah

$$= 100\text{mg/kgBB} \times 1000\text{grBB}/1000\text{grBB}$$

$$= 100\text{mg}/1000\text{grBB} \times 1000\text{grBB}/1000\text{grBB}$$

$$= 1\text{mg}/10\text{grBB} \times 20\text{gr}/20\text{gr}$$

$$= 20\text{mg}/200\text{grBB}$$

Sehingga dosis galaktomannan yang digunakan pada penelitian ini adalah 20mg/200grBB, 30mg/200grBB, dan 40mg/200grBB. Volume gel galaktomannan diberikan per oral melalui alat sonde sebanyak 1ml, 1,5 ml, dan 2ml. Setiap 1ml gel galaktomannan mengandung 20mg ekstrak galaktomannan. Jumlah volume pemberian ini berdasarkan volume yang diperbolehkan untuk pemberian kepada tikus yang memiliki volume lambung sebesar 3 hingga 5 ml.

4.7.4 Pembuatan tikus model arthrits

1. Tikus diadaptasikan di ruang hewan coba Laboratorium Farmakologi FKUB selama 7 hari sebelum diberi perlakuan. Hewan coba di beri pakan standart yaitu Pars dengan jumlah 66,6% ditambah tepung sebanyak 34,4%.
2. Pada hari ke 8, setiap kelompok hewan coba diinjeksi dengan Complete Freund's Adjuvant sejumlah 0,1mg/200grBB untuk menginduksi munculnya kondisi arthritis di Intraplantar tikus kecuali tikus control negative yang tidak diberikan CFA.
3. Pada hari pertama inflamasi muncul, maka setiap kelompok diberi perlakuan seperti pada Tabel 4.1. Ekstrak dan jus kolang-kaling diberikan per oral dengan cara sonde. Sebelum pemberian, masing-masing tikus ditimbang beratnya dan dihitung jumlah dosis yang akan diberikan berdasarkan berat badan tikus tersebut.

Tabel 4.1 . Keterangan Perlakuan Tikus Per Kelompok

	Kelompok	Perlakuan
1	Kontrol Negatif	Tidak diberikan apa – apa
2	Kontrol Positif	CFA
3	Perlakuan 1	CFA + Natrium Diklofenak 0,4 mg/200grBB/hari
4	Perlakuan 2	CFA + Gel Galaktomannan 20mg/200grBB/hari
5	Perlakuan 3	CFA + Gel Galaktomannan 30mg/200grBB/hari
6	Perlakuan 4	CFA + Gel Galaktomannan 40mg/200grBB/hari

4. Pada tikus setiap kelompok dilakukan pengukuran ukuran inflamasi yang terbentuk dari hari pertama hingga hari ke 10 untuk melihat ada atau tidaknya perubahan yang terjadi. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan spuit 10cc yang telah diisi aquadest sebanyak 8 hingga 9cc. Kemudian kaki tikus dimasukkan ke dalam tabung spuit dan dilihat peningkatan aquadest yang muncul. Ukuran volume inflamasi yang didapat adalah berdasarkan rumus $V2 - V1$.

Keterangan : $V1$ = Volume awal aquadest (sebelum kaki tikus dimasukkan)

$V2$ = Volume akhir aquadest (setelah kaki tikus dimasukkan)

4.8 Analisa Data

Data rata-rata volume edema disajikan dalam bentuk table dan grafik kemudian dianalisa secara deskriptif. Data yang telah dikumpulkan diuji menggunakan ANOVA satu arah untuk melihat perbedaan volume edema pada setiap perlakuan.

4.9 Jadwal kegiatan

Tabel 4.2 . Jadwal Kegiatan

Kegiatan												
Bulan ke-	I			II			III			IV		V
Persiapan Alat dan bahan												
Pengujian Etik												
Persiapan hewan coba												
Persiapan bahan uji												
Proses adaptasi hewan coba												
Uji aktifitas anti-inflamasi												
Evaluasi hasil												
Pengumpulan data												
Analisa dan pengolahan data												
Penyusunan laporan kegiatan												

