

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Untuk mengetahui efek antiinflamasi dari *Pineapple Stem*, dilakukan pengukuran terhadap inflamasi (edema) pada tikus model inflamasi yang diinduksi carrageen dengan cara mengukur dan membandingkan volume telapak kaki tikus sebelum dan sesudah disuntik carrageen. Metode ini cukup efektif dan paling sering digunakan untuk menilai inflamasi akut pada hewan coba.

Rancangan penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental menggunakan hewan coba dengan metode *pre* dan *post test control group* karena efek antiinflamasi (edema) diamati setiap 15 menit selama satu jam setelah pemberian per oral bahan alam berupa larutan *Pineapple Stem* berbagai dosis dan kortikosteroid sebagai pembanding dengan cara disonde sesuai dosis yang telah ditentukan dan dibandingkan hasilnya dengan tikus tanpa perlakuan.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Hewan Coba

Populasi yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, berjenis kelamin betina, berumur 2-3 bulan dengan berat 150-200 gram.

4.2.2 Estimasi Jumlah Pengulangan

Penelitian ini dibagi dalam 5 kelompok perilaku dan banyaknya anggota pada tiap kelompok perlakuan ditentukan menggunakan rumus sebagai berikut (Sastroasmoro, 1999):

$$\{(np-1)-(p-1)\}^{-1} p^2$$

Keterangan:

$$\{(5n-1)-(5-1)\}^{-1} 5^2$$

p = jumlah kelompok perlakuan

$$(5n-1)-(4) = 25$$

n = jumlah sampel tiap kelompok

$$5n-5 = 25$$

$$5n = 30$$

$$n = 6$$

Perkiraan jumlah sampel yang dibutuhkan adalah sebanyak 30 ekor tikus yang kemudian dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Jadi, setiap kelompok perlakuan terdiri dari 6 ekor tikus.

4.3 Variabel Penelitian

Pada penelitian ini, variabel bebasnya adalah serbuk *Pineapple Stem* dengan berbagai dosis, sedangkan variabel tergangungnya adalah volume edema pada telapak kaki tikus yang diinjeksi carrageen.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dengan waktu pelaksanaan pada tanggal 15 Juni-29 Juli 2013.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan-bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah :

- Serbuk *Pineapple Stem*
- Carrageen
- Aquadest
- Alkohol 70%
- Kortikosteroid → Dexamethason 50 mg
- Air 20 ml

4.5.2 Alat-alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah :

- Kandang tikus (*Restricted cage*)
- Measuring cylinder
- Spuit
- Gelas ukur
- Pipet
- Sonde
- Timbangan digital
- Lakban
- Gunting
- Tissue

4.6 Definisi Operasional

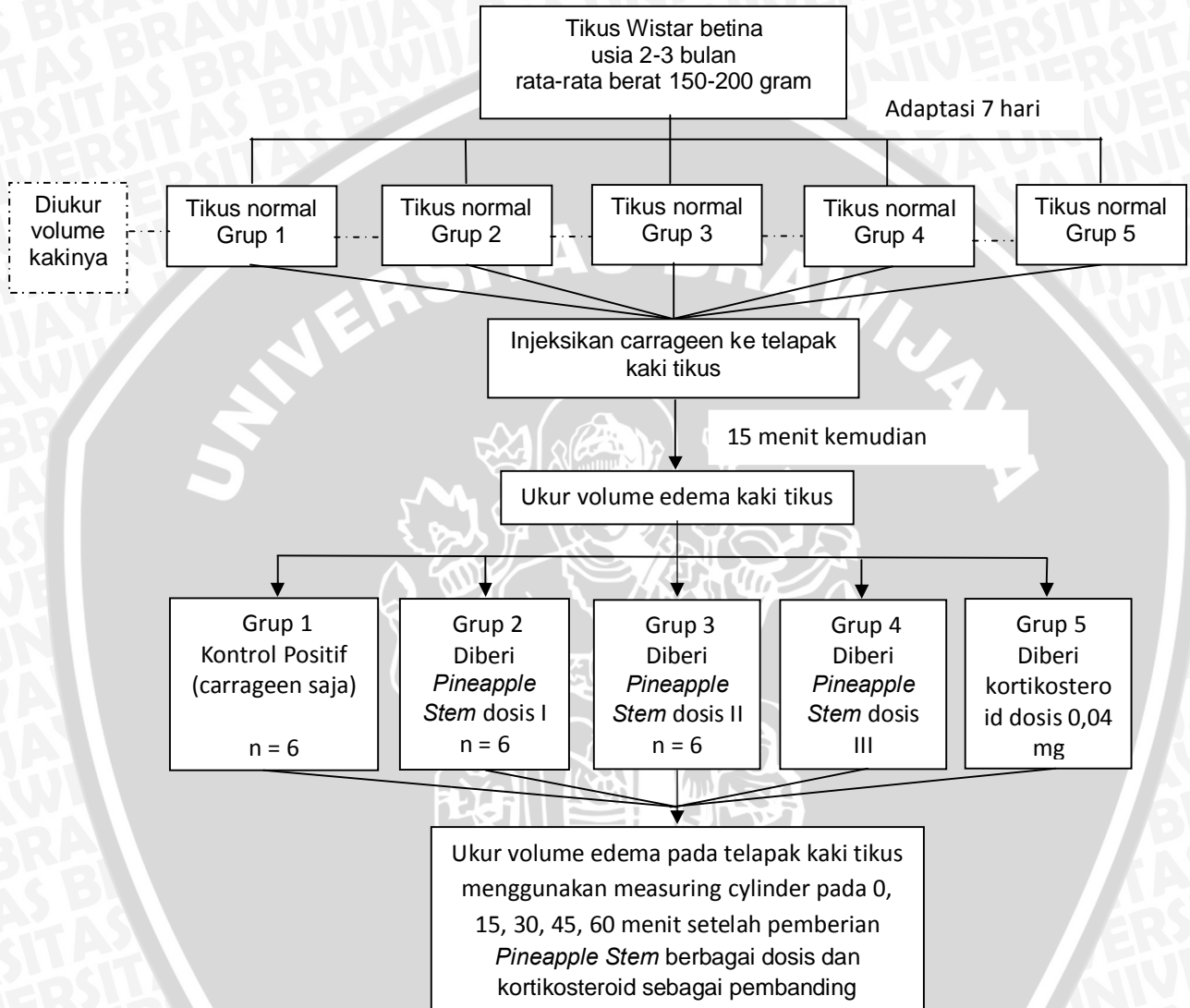
1. *Pineapple Stem* memiliki berbagai kandungan, salah satunya adalah bromelain. Bromelain adalah enzim yang secara alami terdapat didalam

bonggol nanas (*Pineapple Stem*) dan mempunyai bentuk serbuk amori dengan warna putih bening sampai kekuning-kuningan, berbau khas, larut sebagian dalam: aseton, eter, dan CHCl_3 , stabil pada pH 3,0 . 5,5 ,suhu optimum bromelain adalah 50°C . 80°C , kelarutan di dalam air: 20°C larut. Bromelain disimpan dalam suhu dibawah 15°C (Marck, KGA. 2013).

2. Serbuk *Pineapple Stem* didapatkan dari PT. GGP Terbang Besar Kabupaten Lampung Tengah Provinsi Lampung Indonesia.
3. Dosis serbuk *Pineapple Stem* yang digunakan adalah 10, 20 dan 40 mg/kgBB (Sudjarwo, 2005)
4. Suspensi carrageen 0,2 ml diinjeksikan pada salah satu telapak kaki tikus secara subkutan untuk menginduksi inflamasi (edema) pada telapak kaki tikus.
5. Parameter efek inflamasi adalah volume pembengkakan (edema) bagian belakang telapak kaki tikus setelah diinjeksi dengan carrageen 0,2 ml. Volume edema diukur menggunakan modifikasi Plestimometer dengan cara mencelupkan kaki tikus kedalam *measuring cylinder* hingga batas atas malleolus lateral yang telah ditandai dengan tinta (Madhav *et al.*, 2005)
6. Kortikosteroid yang umum digunakan dalam percobaan adalah Dexamethasone. Dosis kortikosteroid yang digunakan sebesar 0,04 mg/ekor.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Skema Rancangan Penelitian



Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian

4.7.2 Proses Adaptasi

Tikus diadaptasikan di dalam kandang yang terpisah tiap kelompok dimana satu kandang berisi 6 tikus yang diletakkan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang selama satu minggu.

4.7.3 Perlakuan

Sebelum dilakukan perlakuan, seluruh kelompok tikus diukur dahulu volume awal kakinya dengan menggunakan *measuring cylinder*. Terdapat 5 kelompok tikus pada penelitian ini, dengan pembagian sebagai berikut:

- Kelompok 1 adalah kelompok tikus yang digunakan sebagai kontrol positif, diberi perlakuan inflamasi dengan injeksi larutan carrageen 5% 0,2 mL secara subkutan di telapak kaki belakang tikus tanpa pemberian obat. 15 menit kemudian diukur lagi volume kakinya dengan *measuring cylinder*. Pengukuran volume kaki tikus dilakukan pada 0 menit, 15 menit, 30 menit, 45 menit, dan 60 menit.
- Kelompok 2 adalah kelompok tikus yang dibuat inflamasi dengan injeksi larutan carrageen 5% 0,2 mL secara subkutan di telapak kaki belakang tikus, 15 menit kemudian diukur lagi volume kakinya dengan *measuring cylinder*. Kemudian tikus diberi larutan *Pineapple Stem* dosis I (10 mg/kgBB) peroral dengan menggunakan sonde. Pengukuran volume kaki tikus dilakukan pada 0 menit, 15 menit, 30 menit, 45 menit, dan 60 menit sesudah diberi bahan obat.
- Kelompok 3 adalah kelompok tikus yang dibuat inflamasi dengan injeksi larutan carrageen 5% 0,2 mL secara subkutan di telapak kaki belakang tikus, 15 menit kemudian diukur lagi volume kakinya dengan *measuring cylinder*. Kemudian tikus diberi larutan *Pineapple Stem* dosis II (20 mg/kgBB) peroral dengan menggunakan sonde. Pengukuran volume kaki tikus dilakukan pada 0 menit, 15 menit, 30 menit, 45 menit, dan 60 menit sesudah diberi bahan obat.

- Kelompok 4 adalah kelompok tikus yang dibuat inflamasi dengan injeksi larutan carrageen 5% 0,2 mL secara subkutan di telapak kaki belakang tikus, 15 menit kemudian diukur lagi volume kakinya dengan *measuring cylinder*. Kemudian tikus diberi larutan *Pineapple Stem* dosis III (40 mg/kgBB) peroral dengan menggunakan sonde. Pengukuran volume kaki tikus dilakukan pada 0 menit, 15 menit, 30 menit, 45 menit, dan 60 menit sesudah diberi bahan obat.
- Kelompok 5 adalah kelompok tikus yang dibuat inflamasi dengan injeksi larutan carrageen 5% 0,2 mL secara subkutan di telapak kaki belakang tikus, 15 menit kemudian diukur lagi volume kakinya dengan *measuring cylinder*. Kemudian tikus diberi kortikosteroid 0,04 mg/kgBB peroral dengan menggunakan sonde. Pengukuran volume kaki tikus dilakukan pada 0 menit, 15 menit, 30 menit, 45 menit, dan 60 menit sesudah diberi bahan obat. Kelompok ini digunakan sebagai kelompok pembanding.

4.7.4 Pengukuran Inflamasi (Edema)

Penentuan inflamasi adalah dengan cara mengukur volume edema pada telapak kaki tikus sebelum dan sesudah dilakukan perlakuan. Untuk mengukur volume awal, sebelumnya telapak kaki tikus diberi tanda dengan tinta spidol pada malleolus lateralnya, lalu dilakukan pengukuran awal menggunakan modifikasi Plestimometer dengan cara mencelupkan kaki tikus setinggi malleolus lateral tadi kedalam *measuring cylinder* yang telah terisi air ± 20 ml (Madhav *et al.*, 2005). Kemudian untuk membuat edema, dilakukan injeksi subkutan dengan larutan carrageen 5% 0,2 ml pada telapak kaki tikus bagian belakang. Kemudian

diberi bromelain berbagai dosis dan kortikosteroid sebagai pembanding 15 menit setelah injeksi carrageen.

Volume kaki diukur lagi pada menit 15, menit 30, menit 45, dan menit 60 setelah induksi carrageen dan pemberian oral bahan obat. Apabila terjadi perubahan volume edema setiap 15 menitnya, maka dihitung sebagai nilai volume edema dan hasil pengukurannya dibandingkan dengan volume awal. Perbandingan nilai rata-rata kelompok tersebut di hitung untuk setiap interval waktu dan dilakukan evaluasi secara statistik.

4.8 Analisa Data

Hasil pengukuran volume edema (inflamasi) telapak kaki tikus dianalisis secara statistik dengan uji statistik Multivariate, menggunakan program SPSS 17 untuk Windows XP dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p < 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).