

## BAB 3 METODE PENELITIAN

### 3.1 Desain

Desain yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah studi eksperimental pada *neuromuscular junction* otot rangka m. gastroknemius katak *Bufo melanostictus* Schneider secara *ex vivo*.

### 3.2 Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilakukan di Departemen Ilmu Farmasi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI), Departemen Fisiologi FKUI, Departemen Fisika FKUI dan Departemen Kimia FKUI, selama 24 (dua puluh empat) bulan sejak Juni 2007-Juni 2009 (dengan pembuatan proposal selama 6 bulan, eksperimen selama 4 bulan, pengolahan data selama 3 bulan, pembuatan laporan selama 6 bulan, revisi laporan selama 6 bulan).

### 3.3 Populasi dan Sampel

Sampel yang digunakan adalah katak *Bufo melanostictus* Schneider yang diperoleh dari Departemen Fisiologi FKUI dan telah diidentifikasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor.

### 3.4 Besar Sampel

Jumlah sampel dari tiap kelompok perlakuan akan dihitung menggunakan rumus Federer. Penelitian ini dilakukan sekaligus pada lima kelompok dosis (5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg) dengan satu kelompok kontrol (otot yang direndam ringer).

Rumus Federer:  $(n-1)(t-1) \geq 15$  ; dengan  $t = \text{jumlah kelompok} = 6$

$n = \text{jumlah sampel}$

$$(n-1)(6-1) \geq 15 \rightarrow 5(n-1) \geq 15 \rightarrow n \geq 4$$

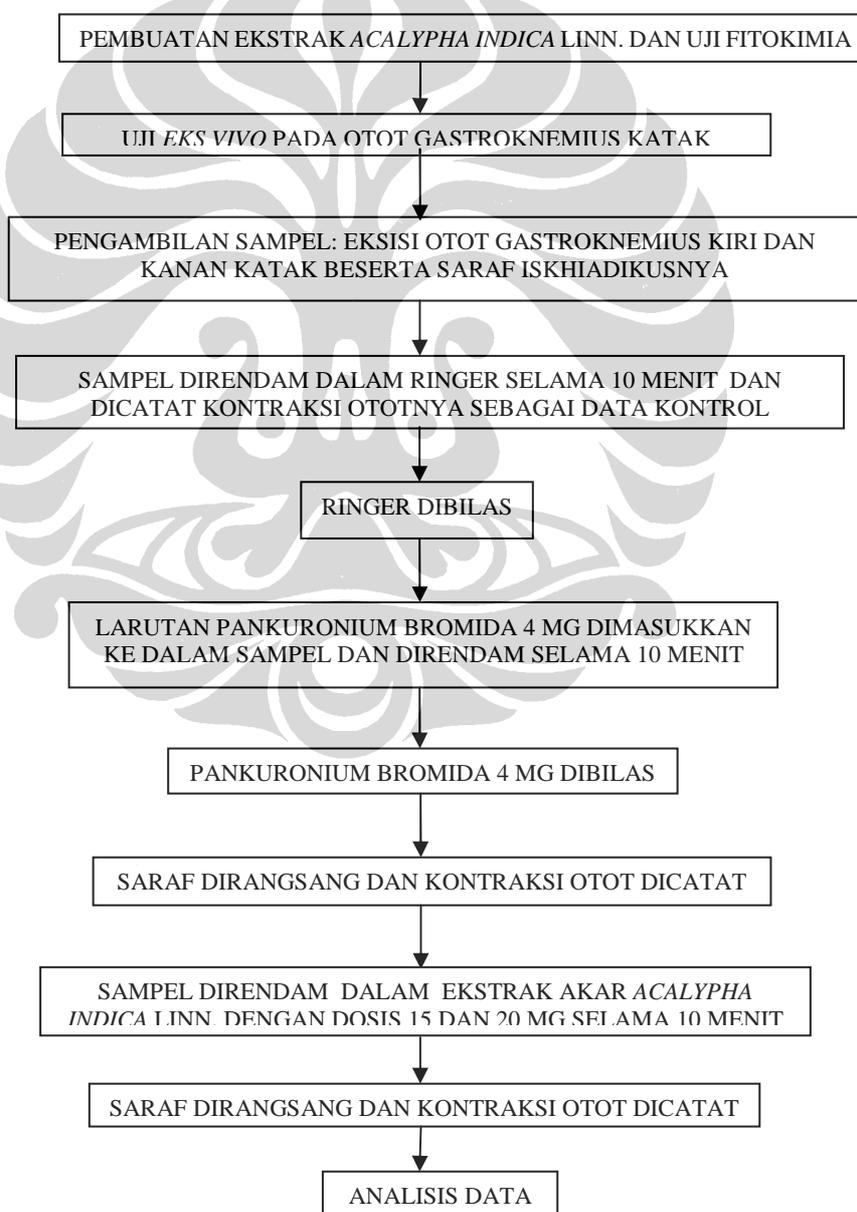
Berdasarkan perhitungan tersebut, maka jumlah sampel minimal yang diperlukan adalah **empat** sediaan m. gastroknemius untuk setiap kelompok percobaan. Jadi, jumlah katak yang diperlukan selama percobaan adalah 12 katak (dari satu katak dapat diperoleh dua sediaan m. gastroknemius).

Besar sampel yang seharusnya digunakan untuk penelitian ini, dengan tiga kelompok perlakuan (kelompok kontrol, kelompok dosis 15 dan 20 mg) adalah sembilan sediaan, dengan menggunakan rumus Federer seperti di atas.

### 3.5 Cara Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari katak dengan cara mengeksisi *m. gastroknemius* kiri dan kanan, beserta *n. iskhiadikusnya* setelah katak dimatikan dengan merusak otak dan sumsum tulang belakang.<sup>59</sup>

### 3.6 Alur Penelitian



### 3.7 Definisi Operasional

Ekstrak air: akar tanaman akar kucing dengan cara dekok

Dekok : perebusan akar dari tanaman *Acalypha indica* Linn. dengan uap air pada suhu 95°C selama 30 menit dengan kadar simplisia 10%

Dekokta : hasil dari proses dekok

Rendemen:  $\frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat akar kucing kering}} \times 100\%$

### 3.8 Cara Kerja

#### 3.8.1 Bahan

- 1 Katak 12 ekor didapat dari Departemen Fisiologi FKUI dan telah diidentifikasi di LIPI, Bogor
- 2 Larutan pankuronium bromida 4 mg
- 3 Larutan ringer laktat
- 4 Akuabides steril
- 5 Bahan-bahan kimia/reagen untuk uji fitokimia
- 6 Tanaman akar kucing (*A. indica* Linn) dari Depok, Jawa Barat dan sudah diidentifikasikan di LIPI, Bogor

#### 3.8.2 Peralatan

- 1 Rotavapor Buchi
- 2 Cawan arloji
- 3 Spuit 3 ml
- 4 Perekam kontraksi otot (modifikasi alat EKG/modifikasi peralatan opto-elektro dari Departemen Fisika FKUI)
- 5 Program komputer Data Studio
- 6 Alat-alat bedah minor
- 7 Perangsang saraf 5 mV

#### 3.8.3 Tahapan Penelitian

##### 3.8.3.1 Pembuatan Ekstrak

1. Akar tanaman akar kucing dipisahkan dari batang, dicuci, ditimbang, dan

dikeringkan pada suhu ruangan. Setelah kering, dipotong-potong kecil dengan ukuran  $\pm 0,5$  cm dan ditimbang.

2. Akar kering tanaman akar kucing ditimbang sebesar 106,7 g dan dicuci kembali. Setelah itu, akar kering dan air sebesar 960,3 ml dimasukkan ke dalam panci dekokta. Panci dipanaskan dengan penangas air hingga mencapai  $95^{\circ}\text{C}$ .
3. Panci ditutup rapat selama 30 menit dalam suhu  $95^{\circ}\text{C}$  diaduk 2-3 kali. Dekokta disaring dalam keadaan panas dengan menggunakan kain flanel basah rangkap dua, ampasnya didekok ulang hingga sedikit bening. Hasil saringan (ekstrak) dijadikan satu dan dimasukkan ke dalam labu berdasar bulat yang telah ditimbang sebelumnya. Kemudian labu ditutup dengan aluminium foil.
4. Ekstrak dikeringkan dengan rotavapor Büchi, diatas penangas air bersuhu  $60^{\circ}\text{C}$ . Sebelum rotavapor, penangas (*heating bath*), dan vakum dinyalakan, air di dalam tabung destilasi harus dipastikan bergerak. Setelah ketiga alat dinyalakan, rotavapor diputar dengan kecepatan sebesar dua kali kecepatan minimal. Vakum diturunkan terus-menerus secara perlahan selama larutan di dalam labu stabil (tidak berbuih) hingga 50 mBar.
5. Sebelum larutan dalam labu mengering maksimal, larutan dalam labu dipindahkan ke dalam labu kecil yang sudah ditimbang. Labu yang berisi ekstrak kental ditimbang untuk dihitung rendemennya. Dibuat sediaan larutan ekstrak dengan konsentrasi 5-50 mg/ml.
6. Sebagian ekstrak diuji fitokimia secara kualitatif standar yaitu saponin, flavonoid, steroid atau triterpen, dan alkaloid. Hasil uji akan dibandingkan dengan hasil uji fitokimia ekstrak akar kucing hasil penelitian FMIPA UI dan IPB.

#### 3.8.3.2 Uji *Eks Vivo*

Katak dibagi ke dalam 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok ekstrak. Kelompok ekstrak dibagi ke dalam 2 subkelompok dosis, 4 sediaan *neuromuscular junction* per subkelompok. Dosis ekstrak yang digunakan adalah 15 mg dan 20 mg.

Persiapan sediaan saraf n. iskhiadikus dan m. gastroknemius<sup>59</sup>

1. Mematikan katak dengan merusak otak dan sumsum tulang belakang.
  - Menggenggam katak dengan tangan kiri sehingga bagian antara kepala dan punggung katak terletak di antara ibu jari dan jari telunjuk
  - Mengantefleksikan kepala katak, kemudian dengan penusuk katak, menusuk di garis median, di antara tulang belakang kepala dan atlas ke dalam medula oblongata melalui *foramen occipitale magnum* dengan menembus kulit dan lapisan-lapisan jaringan lainnya.
  - Menyusun terus sehingga masuk ke dalam ruang kepala, kemudian mengorek-orek otak ke kiri dan ke kanan sampai rusak
  - Menarik penusuk dari otak, dan menusuk ke dalam kanalis vertebralis sampai kurang lebih setengah panjang kanalis tersebut.
2. Melakukan eksisi m. gastroknemius kiri dan kanan beserta n. iskhiadikus dengan cara sebagai berikut:
  - Menyematkan dengan jarum pentul keempat kaki katak yang baru dimatikan di papan fiksasi dengan punggungnya menghadap ke atas.
  - Mengangkat kulit beserta tonjolan *os coccygis* dengan pinset bedah, kemudian menggunting kulit di bawah *os coccygis* sampai *os coccygis* dan sakrum bebas.
  - Menggunting sekaligus *os coccygis* dan sakrum yang kini telah terangkat, sampai terlihat pangkal saraf iskhiadikus yang berasal dari pleksus lumbosakralis sebagai serat putih yang mengkilat.
  - Mengikat salah satu n. iskhiadikus dengan sepotong benang sedekat-dekatnya dengan tulang belakang.
  - Menggunting pangkal n. iskhiadikus tersebut di antara ikatan benang dan tulang belakang. Benang tersebut akan digunakan sebagai pemegang saraf pada waktu membebaskan n. iskhiadikus dari jaringan sekitarnya.
  - Jika yang dibebaskan n. iskhiadikus kanan, maka kulit di seluruh tungkai kanan dilepaskan dengan gunting dan pinset sehingga semua otot-otot terbuka, termasuk juga m. gastroknemius.
  - Menyingkap ke tepi otot-otot berikut ini:
    - ⇒ di atas lekuk lutut: m. biceps dan m. semimembranosus

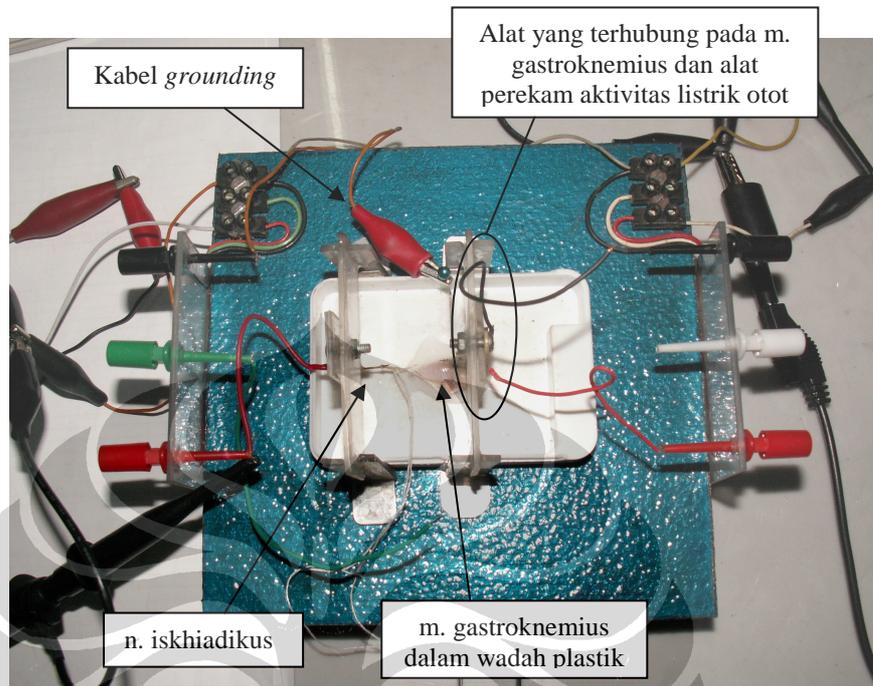
⇒ lebih ke atas: m. biceps dan m. piriformis

- Membebaskan n. iskhiaikus secara tumpul dari jaringan sekitarnya sampai ke m. gastroknemius. Pada waktu dibebaskan, n. iskhiaikus sama sekali tidak boleh terjepit, tertarik, atau tergantung.
- Memotong cabang-cabang saraf ke otot-otot tungkai kanan atas harus dipotong tanpa merusak n. iskhiaikusnya
- Setelah n. iskhiaikus bebas dari jaringan sekitarnya, saraf tersebut diletakkan untuk sementara di atas m. gastroknemius supaya tidak menjadi kering.
- Membebaskan m. gastroknemius secara tumpul dari jaringan sekitarnya.
- Memotong tendo Achilles sejauh-jauhnya dari perut m. gastroknemius, supaya pada otot masih terdapat tendo Achilles yang cukup panjang.
- Memotong tibia tepat di bawah sendi lutut.
- Membebaskan femur dari otot sekitarnya, kecuali origo m. gastroknemius.
- Memotong femur dekat sendi lutut. Sekarang telah diperoleh sediaan otot saraf yang terdiri dari sendi lutut, m. gastroknemius, tendo Achilles, dan n. iskhiaikus.
- Mengerjakan langkah-langkah yang sama pada tungkai kiri sehingga diperoleh sediaan m. gastroknemius kanan dan kiri beserta n. iskhiaikus.

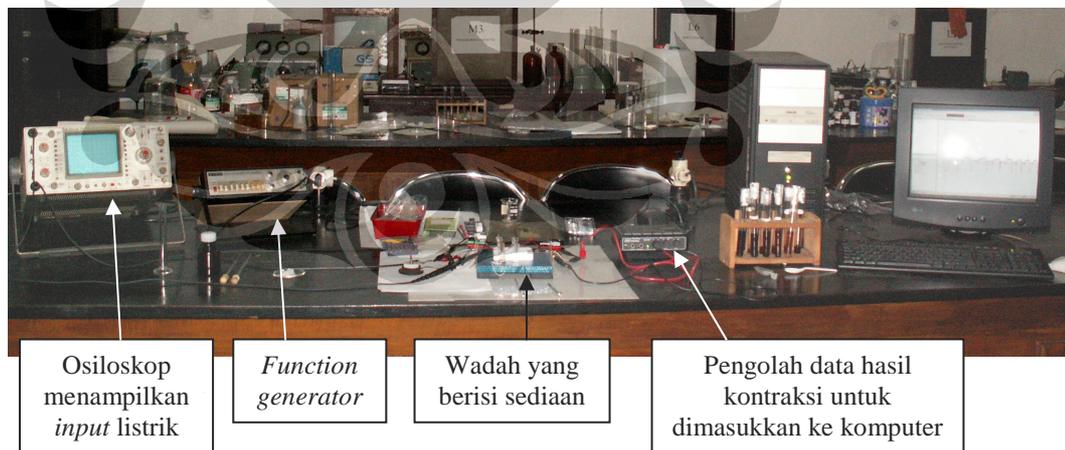
Uji *eks-vivo* efek neuroterapi ekstrak *Acalypha indica* Linn.

1. M. gastroknemius kiri dan kanan beserta n. iskhiaikus diletakkan masing-masing ke dalam cawan arloji. Otot dan saraf direndam dalam larutan ringer laktat sebelum diuji.
2. Larutan ringer laktat dibuang → saraf dirangsang dengan aliran listrik 5 mV dan dicatat kontraksi ototnya pada alat perekam kontraksi otot.
3. Untuk melakukan perekaman aktivitas listrik, sediaan diletakkan dalam alat perekam kontraksi otot dengan pengaturan sebagai berikut:
  - Sediaan diletakkan dalam wadah plastik yang sudah disediakan
  - M. gastroknemius disentuh dengan jarum kecil yang terhubung pada alat untuk merekam aktivitas listrik otot dan n. iskhiaikusnya dikaitkan pada jarum lain yang memberi stimulasi listrik.
  - Jarum pentul yang terhubung dengan kabel *grounding* diletakkan dalam

wadah. (Gambar 3.1 dan Gambar 3.2)



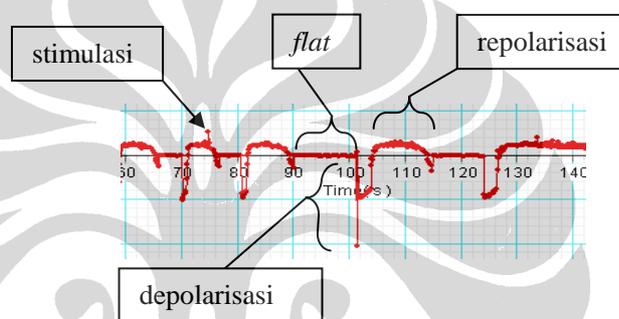
Gambar 3.1. Peralatan Stimulasi Listrik Beserta Sediaan Saraf-Otot Gastroknemius



Gambar 3.2 Peralatan Yang Digunakan Dalam Percobaan

4. Data dimasukkan ke dalam program komputer Data Studio. Antara satu rangsangan listrik dengan rangsangan listrik selanjutnya diberi jarak sekitar 60 detik dan dilakukan sebanyak 4 kali pada satu percobaan.

5. Ke dalam masing-masing sampel dimasukkan larutan pankuromium bromida 4 mg → didiamkan selama 10 menit. Larutan pankuronium bromida 4 mg dibuang dan saraf dirangsang dengan aliran listrik 5 mV dan dicatat kontraksi ototnya.
6. Ekstrak air dengan dosis seperti di atas, dimasukkan ke masing-masing sampel otot didiamkan selama 10 menit → saraf dirangsang dengan aliran listrik 5 mV dan dicatat kontraksi ototnya.
7. Menghitung rata-rata waktu yang dibutuhkan untuk depolarisasi, repolarisasi, dan *flat*, serta tinggi tegangan listrik dari stimulasi.



Gambar 3.3. Hasil Stimulasi Listrik

8. Menentukan dosis mana (15, 20 mg, atau keduanya) yang menimbulkan perubahan kontraksi otot pada akhir penelitian.

### 3.9 Identifikasi Variabel

1. Variabel bebas adalah dosis ekstrak air tanaman *Acalypha indica* Linn. yang dimasukkan ke masing-masing sampel otot.
2. Variabel tergantung adalah hasil perangsangan kontraksi otot dengan aliran listrik 5 mV yang dicatat oleh alat perekam kontraksi otot.
3. Variabel perancu (*confounding*) adalah sifat genetik katak. Hal ini dapat dikontrol dengan menggunakan otot yang sama dalam satu percobaan.

### 3.10 Rencana Manajemen dan Analisis Data

Analisis statistik terhadap kontraksi otot dicatat dalam ukuran numerik berupa tinggi amplitudo dan waktu yang dibutuhkan untuk satu kontraksi yang

dibandingkan dalam lebih dari dua kelompok, maka analisis statistik yang digunakan adalah Anova satu arah dengan batas kemaknaan  $p=0,05$ .<sup>60</sup>

