

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi adalah semua objek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba ciplukan (*Physalis angulata* L.) yang diperoleh dari petani di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah pada tanggal 3 Oktober 2018.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba ciplukan (*Physalis angulata* L.) yang terdiri atas daun, batang, dan buah ciplukanyang diperoleh dari petani didaerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah variasi dosis ekstrak etanol herba ciplukan (*Physalis angulata* L.) yang diperoleh dengan metode maserasi kemudian diujikan terhadap tikus *Sprague-Dawley* yang diinduksi prednison dan NaCl dengan pengukuran tekanan darah secara tidak langsung dengan *Tail Cuff method* menggunakan alat *blood pressure analyzer CODA*<sup>®</sup>.

##### **2. Klasifikasi Variabel Utama**

Variabel utama dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel yakni variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi dosis ekstrak etanol herba ciplukan (*Physalis angulata* L.) yang diperoleh dengan metode maserasi.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian dan variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek atau pengaruh variasi dosis ekstrak etanol herba ciplukan terhadap tekanan darah sistolik dan diastolik hewan uji setelah diberikan perlakuan.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel tergantung selain variabel bebas, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah peneliti, kondisi fisik hewan uji meliputi berat badan, usia, jenis kelamin, kondisi laboratorium, dan perlakuan oleh peneliti.

### **3. Definisi Operasional Variabel Utama**

Pertama, herba ciplukan adalah keseluruhan bagian dari tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) yang terdiri atas batang, daun dan buah ciplukan yang diperoleh dari petani di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk herbaciplukan adalah herba ciplukan yang dikeringkan, kemudian diserbuk lalu diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol herba ciplukan adalah hasil ekstraksi dari serbuk herba ciplukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% yang selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator*.

Keempat, aktivitas antihipertensi adalah kemampuan ekstrak etanol dari herba ciplukan dalam menurunkan tekanan darah sistolik dan tekanan darah diastolik pada tikus *Sprague-Dawley* yang diinduksi prednison dan NaCl.

Kelima, dosis efektif adalah dosis dari ekstrak etanol herba ciplukan yang menurunkan tekanan darah paling optimal tetapi tidak menimbulkan hipotensi.

## **C. Bahan dan Alat**

### **1. Bahan**

Bahan yang digunakan sebagai sampel adalah herba ciplukan (*Physalis angulata* L.). Pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah etanol 70%.

Bahan yang digunakan untuk identifikasi kandungan senyawa serbuk dan ekstrak simplisia adalah serbuk magnesium, asam klorida, amil alkohol, FeCl<sub>3</sub>,

asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, toluen, aquadest.

Bahan yang digunakan dalam pengujian antihipertensi adalah prednison dan NaCl sebagai induksi hipertensi, kaptopril sebagai pembanding (kontrol positif), Na CMC digunakan sebagai kontrol negatif.

## **2. Alat**

Pembuatan simplisia menggunakan alat antara lain pisau, oven, mesin giling, dan ayakan nomor 40. Alat yang digunakan untuk mengetahui kadar air dalam serbuk adalah *Sterling-Bidwell*. Alat yang digunakan untuk membuat ekstrak antara lain botol kaca kedap cahaya sebagai tempat maserasi, botol penampung, *beaker glass*, mortir, stamper, batang pengaduk, corong gelas, kain flanel, dan evaporator (Heidolp WB 4000). Alat yang digunakan untuk perlakuan hewan uji adalah kandang tikus, neraca analitik, tempat minum dan makan tikus, sonde oral (Kanul), dan *non invasive blood pressure analyzer CODA*<sup>®</sup>.

Identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak etanol herba ciplukan menggunakan alat antara lain kertas saring, tabung reaksi, pipet tetes, penangas air, dan cawan penguap.

## **3. Hewan Uji**

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur *Sprague-Dawley (Rattus norvegicus)* dengan usia 2-3 bulan dan berat badan 170-300 gram. Penelitian ini menggunakan hewan uji sebanyak 30 ekor tikus putih jantan yang terbagi menjadi enam kelompok masing-masing kelompok terdiri atas lima ekor tikus.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi Tanaman**

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi tanaman ciplukan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta. Determinasi ini bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang diambil, menghindari terjadinya kesalahan dalam pengumpulan bahan serta menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain dengan cara mencocokkan ciri-ciri morfologi antara

tanaman dengan pustaka yang diambil dari buku FLORA karangan C.G.G.J. van Steenis, tahun 2006.

## **2. Pengambilan Sampel dan Pembuatan Serbuk Herba Ciplukan**

Herba ciplukan dalam penelitian ini diperoleh dari petani di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Herba ciplukan yang masih segar kemudian dicuci bersih dengan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan sisa kotoran yang menempel pada tanaman. Kemudian dilakukan perajangan untuk mempercepat proses pengeringan dan mempermudah proses penyerbukan. Setelah itu herba ciplukan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan ditempat terbuka dan tidak terkena sinar matahari langsung yang bertujuan untuk menghilangkan kadar air agar herba ciplukan tidak mudah ditumbuhi jamur dan atau bakteri, menghilangkan aktivitas enzim yang dapat mengurangi zat aktif, serta memudahkan pada proses penggilingan maupun penyimpanan (Gunawan & Mulyani 2004).

Kemudian dilakukan pengeringan lebih lanjut dengan cara simplisia yang telah dikeringkan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40°C, lalu dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40. Tujuan simplisia dibuat serbuk adalah untuk memperbesar luas permukaan kontak serbuk dengan pelarut pada saat ekstraksi, sehingga senyawa aktif akan terekstrak lebih banyak dan prosesnya lebih cepat.

## **3. Pembuatan Ekstrak Etanol Herba Ciplukan**

Pada penelitian ini pembuatan ekstrak etanol menggunakan metode maserasi. Serbuk herba ciplukan yang sudah diayak diekstraksi dengan pelarut etanol 70%, dengan cara merendam serbuk herba ciplukan dengan etanol 70% dengan perbandingan 1,0:10. Ekstraksi dilakukan dengan merendam serbuk herba ciplukan pada botol kaca kedap cahaya selama 6 jam pertama sambil diaduk-aduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Ekstrak disaring dengan kain flanel kemudian disaring lagi dengan corong *Buchner* sehingga diperoleh filtrat. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan *vaccum*

*rotary evaporator* pada suhu maksimal 50°C sampai diperoleh ekstrak kental. Hitung rendemen yang diperoleh yaitu presentase bobot b/b antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan bobot ekstrak (rendemen tidak kurang dari 9,6%) (Depkes RI 2013).

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak (g)}}{\text{bobot serbuk (g)}} \times 100\%$$

#### 4. Karakterisasi Serbuk dan Ekstrak Herba Ciplukan

##### 4.1. Pemeriksaan organoleptik

Parameter organoleptik digunakan untuk mendeskripsikan bentuk, warna, bau, rasa menggunakan panca indera dengan tujuan pengenalan awal yang sederhana dan seobjektif mungkin (Depkes RI 2000).

##### 4.2. Penetapan kadar sari larut air

Timbang seksama lebih kurang 5 g serbuk yang telah dikeringkan di udara. Masukkan ke dalam labu bersumbat, tambahkan 100 mL air jenuh kloroform (2,5 mL kloroform dalam 1000 mL aquadest), kocok berkali-kali selama 6 jam pertama, biarkan selama 18 jam. Saring, uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal beralas datar yang telah dipanaskan 105°C dan ditara, panaskan sisa pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam % sari larut air (Depkes RI 2013).

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{bobot sari}}{\text{bobot bahan awal yang dimaserasi}} \times \frac{100}{20} \times 100$$

##### 4.3. Penetapan kadar sari larut etanol

Timbang seksama lebih kurang 5 g serbuk yang telah dikeringkan di udara. Masukkan ke dalam labu bersumbat, tambahkan 100 mL *etanol P*, kocok berkali-kali selama 6 jam pertama, biarkan selama 18 jam. Saring, uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal beralas datar yang telah dipanaskan 105° dan ditara, panaskan sisa pada suhu 105° hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam % sari larut etanol (Depkes RI 2013).

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{bobot sari}}{\text{bobot bahan awal yang dimaserasi}} \times \frac{100}{20} \times 100$$

#### 4.4. Penetapan kadar air herba ciplukan

Penetapan kadar air serbuk herba ciplukan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Dengan cara mencuci tabung pendingin dan penerima dengan asam pencuci, bilas dengan air, kemudian dikeringkan dalam lemari pengering. Kemudian menimbang serbuk herbaciplukan sebanyak 20 gram, lalu dimasukkan dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut toluen jenuh air sebanyak 200 mL, kemudian memasang rangkaian alat, tahap selanjutnya dipanaskan. Pemanasan dihentikan bila air pada penampung tidak menetes lagi. Baca volume air setelah air dan toluen memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b (kadar air tidak lebih dari 11,7%) (Depkes RI 2010).

$$\% \text{ kadar air} = \frac{\text{volume air (mL)}}{\text{bobot ekstrak (gram)}} \times 100\%$$

#### 4.5. Penetapan susut pengeringan herba ciplukan

Penetapan susut pengeringan serbuk herba ciplukan menggunakan alat *moisture balance*. Suhu atau temperatur yaitu sebesar 105°C dan waktu pengeringan secara manual hingga kering. Serbuk herba ciplukan ditimbang dengan seksama sebanyak 1 sampai 2 gram, masukkan dalam alat *moisture balance* ditunggu sampai alat berbunyi, menandakan hasil analisa telah selesai, replikasi sebanyak tiga kali atau sampai bobot konstan. Angka yang muncul dalam satuan persen pada alat *moisture balance* dicatat sebagai kadar kelembaban. Tujuan dari susut pengeringan adalah untuk memberikan batas maksimal (rentang) besarnya senyawa volatil yang hilang selama proses pengeringan. Nilai atau rentang kadar lembab yang memenuhi syarat dimana suhu serbuk dari simplisia tidak boleh lebih dari 10% (Depkes RI 2010).

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{berat sebelum pemanasan} - \text{berat akhir}}{\text{berat sebelum pemanasan}} \times 100\%$$

#### 4.6. Uji bebas etanol ekstrak etanol herba ciplukan

Ekstrak etanol herba ciplukan yang sudah jadi, kemudian dilakukan uji bebas alkohol dengan cara ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah 1

mL larutan asam asetat glasial dan 1 mL asam sulfat pekat kemudian dipanaskan hingga tidak tercium bau ester khas alkohol (Depkes RI 2013).

#### **4.7. Penetapan bobot jenis ekstrak etanol herba ciplukan**

Penetapan bobot jenis ekstrak etanol herba ciplukan menggunakan piknometer. Piknometer yang bersih, kering ditimbang ( $W_0$ ). Kemudian dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$  kemudian ditimbang ( $W_1$ ). Ekstrak diencerkan sebesar 5% dengan etanol 70% diatur suhunya kurang lebih  $20^{\circ}\text{C}$  lalu dimasukkan dalam piknometer kosong, buang kelebihan ekstrak, atur suhu piknometer yang telah diisi hingga suhu  $25^{\circ}\text{C}$  kemudian ditimbang ( $W_2$ ) (Depkes RI 200).

$$\text{Bobot jenis (d)} = \frac{\text{bobot piknometer+ekstrak (W2)} - \text{bobot piknometer kosong(W0)}}{\text{bobot piknometer+air (W1)} - \text{bobot piknometer kosong(W0)}}$$

### **5. Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia Serbuk dan Ekstrak Herba Ciplukan**

Tujuan dilakukannya identifikasi kandungan senyawa kimia adalah untuk menetapkan keberadaan senyawa kimia yang terkandung dalam serbuk herba ciplukan. Tata cara identifikasi kandungan senyawa adalah sebagai berikut:

#### **5.1. Identifikasi alkaloid**

Uji alkaloid dilakukan dengan dengan cara melarutkan ekstrak uji sebanyak 2 mL diuapkan diatas cawan porselin hingga didapat residu. Residu kemudian dilarutkan dengan 5 mL HCl 2 N. Larutan yang didapat kemudian dibagi ke dalam tiga tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan HCl 2 N yang berfungsi sebagai blanko. Tabung kedua ditambahkan pereaksi Dragendorff sebanyak 3 tetes dan tabung ketiga ditambahkan pereaksi Mayer sebanyak 3 tetes. Terbentuknya endapan jingga pada tabung kedua dan putih hingga kekuningan pada tabung ketiga menunjukkan adanya alkaloid (Jones & Kinghorn 2006).

#### **5.2. Identifikasi flavonoid**

Reduksi Mg dan HCl. Sejumlah kecil ekstrak (50 mg) dilarutkan dalam 5 mL amil alkohol dan beberapa potongan pita magnesium dan tambahkan beberapa

tetes HCl pekat. Warna merah sampai warna coklat menunjukkan adanya flavanol glikosida pada lapisan amil alkohol (Bandiola 2018).

### **5.3. Identifikasi steroid**

Sebanyak 1 gram serbuk atau 2 mL ekstrak simplisia ditambahkan dengan 2 tetes larutan asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Hasil yang terbentuk menunjukkan adanya warna merah, hijau, ungu, dan akhirnya biru yang menandakan adanya senyawa steroid (Ajiboye *et al* 2013).

### **5.4. Identifikasi fenolik**

Ekstrak ditetesi dengan 3-4 tetes larutan besi klorida. Terbentuknya warna hitam kebiruan menunjukkan adanya fenol (Tiwari *et al* 2011).

## **6. Penetapan Dosis**

### **6.1. Dosis prednison**

Dosis prednison yang digunakan untuk meningkatkan tekanan darah pada tikus adalah 1,5 mg/kgbb. Dosis untuk tikus (rata-rata 200 g) =  $\frac{1,5}{1000} \times 200 = 0,3$  mg/200 g bb tikus.

### **6.2. Dosis NaCl**

Dosis NaCl yang digunakan untuk meningkatkan tekanan darah pada tikus adalah 200 mg/kgbb. Dosis untuk tikus (rata-rata 200 g) =  $\frac{200}{1000} \times 200 = 40$  mg/200 g bb tikus.

### **6.3. Dosis kaptopril**

Dosis terapi kaptopril untuk manusia 70 kg adalah 25 mg. Dikonversikan ke tikus 200 gram dengan faktor konversi 0,018. Jadi,  $25 \text{ mg} \times 0,018 = 0,45$  mg/200 g bb tikus.

### **6.4. Dosis ekstrak herba ciplukan**

Dosis yang digunakan berdasarkan dosis empiris herba kering ciplukan pada manusia sebesar 5 gram berat kering. Dosis ekstrak diperoleh setelah dilakukan proses ekstraksi dengan metode maserasi dengan perbandingan 500 gram serbuk simplisia dan 5000 mL etanol 70%, besarnya randemen ekstrak kental yang diperoleh sebesar 20,76%. Dosis ekstrak diperoleh dengan

mengalikan randemen ekstrak kental dengan dosis empiris pada manusia, dosis ekstrak yang diperoleh adalah 1,04 gram.

Kemudian dosis ekstrak dikonversikan ke tikus 200 gram dengan faktor konversi 0,018 diperoleh dosis sebesar 95 mg/kgbb tikus. Setelah dilakukan konversi dosis maka akan dilakukan orientasiterhadap hewan percobaan menggunakan dua variasi dosis, yaitu dosis I 50 mg/kgbb tikus dan dosis II 100 mg/kgbb tikus. Selanjutnya, membandingkan pengaruh dosis I dan dosis II dengan kontrol positif kaptopril 2,5 mg/kgbb tikus terhadap tekanan darah hewan uji. Dosis yang akan digunakan pada penelitian adalah dosis orientasi yang efek hipotensinya mendekati atau sama dengan kontrol positif. Kemudian dosis tersebut dibuat dalam tiga variasi dosis yaitu dosis I (1/2 dosis orientasi), dosis II (1 kali dosis orientasi), dan dosis III (2 kali dosis orientasi).

## **7. Pembuatan Larutan Stok**

### **7.1. Larutan CMC Na 0,5%**

Larutan CMC Na dengan konsentrasi 0,5% dibuat dengan cara melarutkan 0,5 gram serbuk CMC Na dalam 100 mL aquadest panas sambil diaduk sampai homogen.

### **7.2. Larutan prednison**

Larutan stok prednison dibuat dengan konsentrasi 0,03% yaitu sebanyak 6 tablet prednison kemudian disuspensikan dengan CMC Na 0,5% sedikit demi sedikit diaduk hingga homogen, dicukupkan volumenya hingga 100 mL.

### **7.3. Larutan NaCl**

Larutan NaCl dengan konsentrasi 2% dibuat dengan cara melarutkan 2 gram serbuk NaCl pada 100 mL aquadest hangat diaduk sampai larut.

### **7.4. Larutan kaptopril**

Larutan stok kaptopril dibuat dengan menggerus 1 tablet kaptopril kemudian dilarutkan dengan air sedikit demi sedikit sampai larut, dicukupkan volumenya hingga 500 mL.

## 8. Persiapan Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus jantan *Sprague-Dawley* dengan berat antara 200-300 gram. Jumlah hewan uji dalam satu kelompok ditentukan melalui rumus *Federer* untuk uji eksperimental, yaitu:

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

Dimana (t) adalah kelompok perlakuan dan (n) jumlah sampel perkelompok perlakuan. Masing-masing tikus ditimbang dan ditandai, kemudian dibagi secara acak menjadi 6 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 tikus, yaitu :

Kelompok I : Kontrol normal (tanpa perlakuan)

Kelompok II : Kontrol negatif (CMC Na 0,5%)

Kelompok III : Kontrol positif (kaptopril 2,5 mg/kgbb)

Kelompok IV : ½ kali dosis ekstrak etanol herba ciplukan

Kelompok V : 1 kali dosis ekstrak etanol herba ciplukan

Kelompok VI : 2 kali dosis ekstrak etanol herba ciplukan

## 9. Pengujian Aktivitas Antihipertensi

Sebelum dilakukan induksi, hewan uji terlebih dahulu dipuasakan selama 12 jam kemudian diukur tekanan darahnya sebagai tekanan darah awal ( $T_0$ ). Induksi hipertensi dilakukan dengan metode buatan pada kelompok hipertensi, kelompok kontrol positif (kaptopril 2,5 mg/kgbb), kelompok EEHC dosis 50 mg/kgbb, kelompok EEHC dosis 100 mg/kgbb, dan kelompok EEHC dosis 200 mg/kgbb dengan diberikan prednison dengan dosis 0,3 mg/200 grambb dengan volume pemberian 2 mL/200 gbb dan NaCl 40 mg/200 grambb dengan volume pemberian 2 mL/200 g bb setiap hari selama 21 hari sehingga terjadi peningkatan tekanan darah sistolik tikus putih jantan menjadi >149-199 mmHg dan diastolik >97 mmHg. Pengukuran tekanan darah tikus selama periode induksi pada hari ke 7 ( $T_1$ ), hari ke 14 ( $T_2$ ), dan hari ke 21 induksi ( $T_3$ ). Selanjutnya, tikus diberikan sediaan uji sesuai kelompok selama 21 hari masa terapi.

Kemudian kelompok uji diberikan CMC Na 0,5% (kelompok hipertensi), kaptopril 2,5 mg/kgbb (kelompok kontrol positif), ekstrak etanol herba ciplukan 50 mg/kgbb (kelompok IV), 100 mg/kgbb (kelompok V), dan 200 mg/kgbb

(kelompok VI). Pemberian sediaan uji dengan teknik sonde lambung untuk memastikan agar tidak ada yang terbuang dan tersisa. Teknik sonde lambung merupakan teknik pemberian kepada hewan uji melalui rongga mulut dengan menggunakan spuit dan jarum suntik tumpul. Selanjutnya sonde dimasukkan melalui mulut secara perlahan sampai mencapai lambung dan ekstrak disemprotkan. Pemberian terapi ekstrak selama 21 hari yang terbagi dalam dosis satu kali sehari, diikuti pemberian induksi prednison dan NaCl berlanjut sampai terapi 21 hari selesai. Pengukuran tekanan darah tikus selama terapi dilakukan pada hari ke 28 ( $T_4$ ), terapi hari ke 35 ( $T_5$ ), dan terapi hari ke 42 ( $T_6$ ) (Nisa et al 2017; Purwidyaningrum *et al* 2017).

Diharapkan setelah mendapat terapi dengan ekstrak etanol herba ciplukan tekanan darah sistol dan diastol hewan uji hipertensi turun  $<20$  mmHg atau sebanding dengan tekanan darah kelompok normal (Thompson 1990).

## 10. Pengukuran Tekanan Darah

Pengukuran tekanan darah menggunakan alat pengukur tekanan darah *non invasive blood pressure system* CODA<sup>®</sup>. Langkah pertama pengukuran dengan menyiapkan alat dan menyesuaikan suhu alat antara  $30-31^{\circ}\text{C}$  selama sekitar 15-30 menit. Pengkondisian hewan uji pada holder dilakukan sekitar 10-15 menit sampai suhunya mencapai  $30-31^{\circ}\text{C}$ . Hewan uji yang telah dimasukkan ke dalam holder kemudian dipasangkan manset ekor, dan diletakkan pada papan penghangat selama 10-15 menit agar tekanan darah dapat terukur dengan tepat dan konsisten oleh sistem VPR *tail-cuff*. Suhu tubuh hewan uji harus terus dipantau agar tetap stabil, hal ini dapat dilakukan dengan menggunakan kain lap pada bagian luar holder. Kecuali untuk suhu lingkungan, diatur agar paling tidak mencapai  $26^{\circ}\text{C}$ . Kondisi hewan uji juga harus dijaga agar tidak stres, karena hal ini akan mempengaruhi aliran darah ke ekor. Prosedur pengukuran tekanan darah sebagai berikut:

Pertama. Platform pemanas diaktifkan. Suhu ideal yang disarankan untuk analisis tekanan darah adalah  $33-35^{\circ}\text{C}$ . Pengukuran suhu ekor tikus menggunakan termometer inframerah. Jika ekor tikus terlalu dingin, tekanan darah tidak dapat

dibaca. Sebaliknya, jika platform pemanas terlalu panas, tikus akan stres dan dapat menyebabkan dehidrasi parah atau bahkan kematian.

Kedua. Tikus dimasukkan ke dalam holder. Perlakuan terhadap tikus harus dengan lembut. Mengangkat tikus dengan cara memegang ekornya, kemudian ditempatkan ke dalam holder dan dilekatkan dengan hati-hati dengan tidak mencubit ekor atau bagian tubuh lainnya. Masukkan ekor melalui *O-cuff* terlebih dahulu dan kemudian melalui *VPR-cuff*. Kunci manset dengan menggeser selang ke takik di atas holder. Sesuaikan posisi *O-cuff* pada ekor agar tidak terlalu ketat atau terlalu longgar.

Ketiga. Tempatkan tikus pada posisi yang ditentukan pada platform pemanas. Pastikan untuk merotasi tikus setiap hari untuk memeriksa konsistensi masing-masing kanal. Rotasi ini membantu mengidentifikasi masalah-masalah khusus kanal yang potensial.

Keempat. Tikus dibiarkan berada di holder dengan manset pada ekor selama minimal lima menit. Langkah ini bertujuan untuk membuat tikus untuk beradaptasi dan mengurangi kemungkinan kegagalan dalam pengukuran.

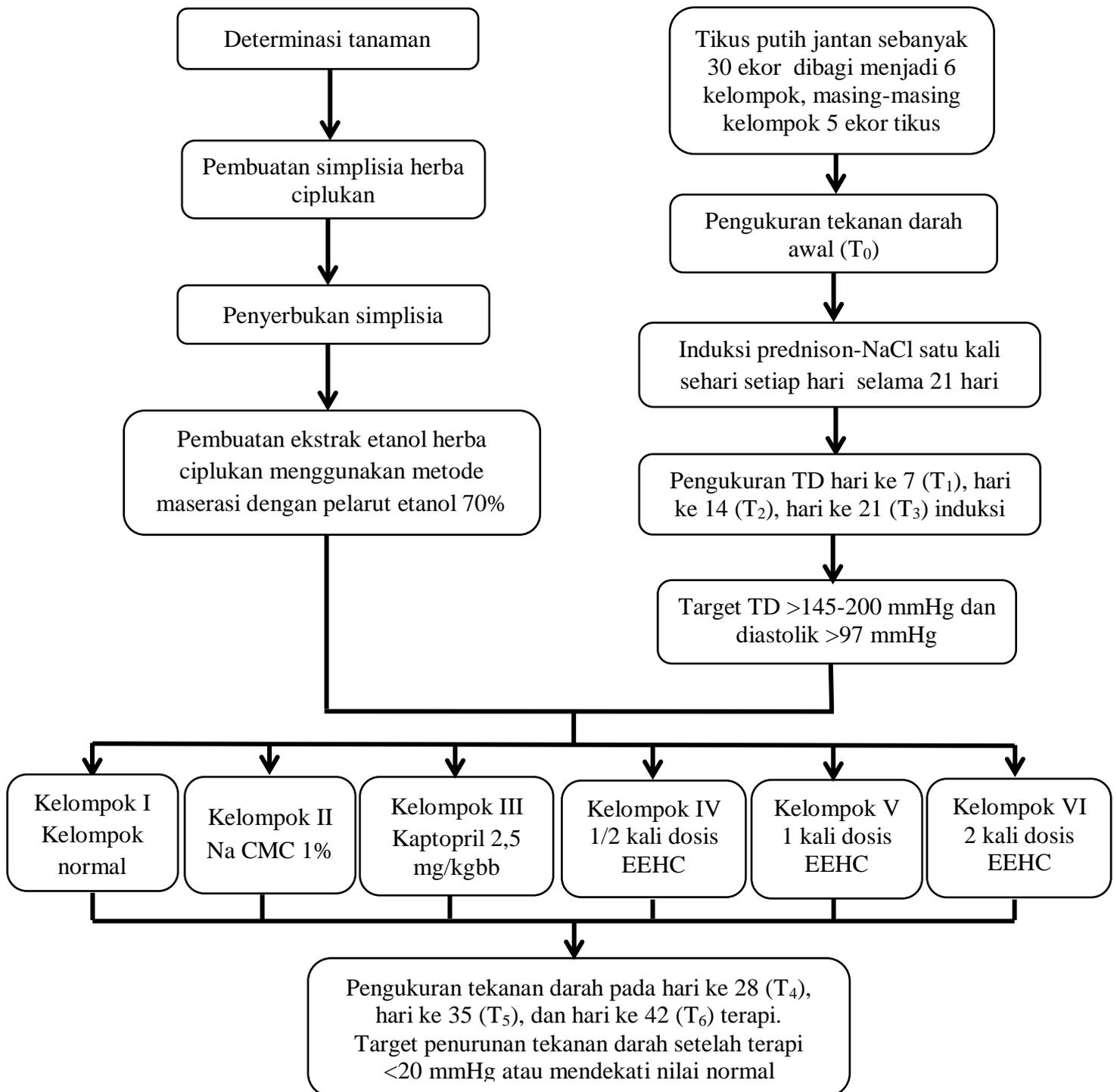
Kelima. Dilakukan pengukuran tekanan darah pada tikus dengan program CODA<sup>®</sup> yang telah terhubung pada komputer dengan cara menekan tombol *running* untuk melakukan pengukuran, alat akan menampilkan pengukuran tekanan darah sebanyak 15 kali.

Keenam. Setelah menyelesaikan *running*, tikus dilepaskan segera dan dikembalikan ke kandang. Bersihkan alat. Kemudian lakukan pengukuran tekanan darah pada tikus berikutnya. Pengukuran tekanan darah dilakukan pada sebelum perlakuan (T0), selama masa induksi hari ke 7 (T1), hari ke 14 (T2), hari ke 21 (T3), dan hari ke 7 terapi (T4), hari ke 14 terapi (T5), dan hari ke 21 terapi (T6).

## 11. Analisis Hasil

Analisis statistik yang digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu dilihat apakah data tekanan darah tersebut terdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*, jika tidak terdistribusi dengan normal maka  $p < 0,05$  kemudian dilanjutkan dengan metode uji non parametik, dan apabila data terdistribusi dengan normal  $p > 0,05$  dilakukan dengan uji parametik *ANOVA*. Uji dilanjutkan dengan *Post Hoc test* untuk melihat apakah terdapat perbedaan diantara masing-masing kelompok perlakuan. Analisa hasil statistik pada penelitian ini menggunakan *ANOVA* satu jalan.

### E. Skema Penelitian



Gambar 5 Skema penelitian.