

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### A. DESAIN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan *Pre-post test control group design*.

#### B. TEMPAT DAN WAKTU

Penelitian ini akan dilakukan di LP3HP-LPPT Universitas Gajah Mada Yogyakarta pada tanggal 28 juni- 7 juli 2008.

#### C. SUBYEK PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih (*Rattus novergicus*) yang mempunyai kriteria:

1. Usia 6-8 minggu.
2. Memiliki berat 207-272 gram.
3. Berjenis kelamin jantan.

Penelitian ini dibagi dalam dua kelompok masing-masing kelompok berisi 5 ekor tikus. Masing-masing kelompok dilakukan perlakuan sebagai berikut:

1. Kelompok 1 : sebagai kelompok kontrol negatif.
2. Kelompok 2 : sebagai kelompok uji yang diberi rebusan herba putri malu dengan dosis 1,890 g/kgBB selama 8 hari.

#### D. VARIABEL PENELITIAN

1. Variabel perlakuan (bebas): pemberian rebusan herba putri malu. Dosis yang diberikan yaitu 1,890 g/kgBB.

2. Variabel tergantung: kadar MDA. Diamati perubahan kadar MDA sebelum dan setelah perlakuan dengan pemberian rebusan herba putri malu.
3. Variabel pengganggu terkendali: terdapat beberapa faktor yang dapat mengganggu hasil penelitian ini diantaranya ras dan genetik, berat badan, diet serta jenis kelamin. Berikut diuraikan tentang faktor-faktor tersebut:
  - a. Ras dan genetik. Sama halnya pada manusia, perbedaan ras dapat mempengaruhi farmakokinetik, dan efek samping dari suatu obat. Untuk mengendalikan penyakit dari faktor ini maka tikus yang digunakan pada penelitian ini dipilih dari galur yang sama.
  - b. Berat badan. Berat badan yang berbeda dengan pemberian dosis obat yang sama maka ada kemungkinan akan munculnya efek yang berbeda, sehingga untuk meminimalkan efek tersebut maka tikus yang digunakan dalam satu kelompok dipilih yang memiliki berat badan yang hampir sama.
  - c. Diet. Masing-masing tikus diberi diet yang sama.
  - d. Jenis kelamin pengaruhnya hampir sama dengan pengaruh ras, meskipun pengaruhnya itu sangat kecil akan tetapi untuk mendapatkan hasil yang valid maka dipilih tikus yang berjenis kelamin sama

#### E. DEFINISI OPERASIONAL

1. Hepatoprotektif adalah memberi daya tahan atau kekebalan pada hepar.
2. Karbon tetraklorida ( $\text{CCl}_4$ ) adalah cairan jernih, tidak berwarna, mudah menguap, inhalasi uapnya dapat mendepresi aktifitas system saraf pusat serta menyebabkan degenerasi hati dan ginjal.

3. MDA adalah hasil peroksidasi lipid utama ,dalam penelitian ini digunakan sebagai biomarker adanya kerusakan hepar.

4. Penurunan kadar MDA yang dimaksud dalam penelitian ini adalah penurunan kadar MDA kelompok uji dibandingkan kelompok kontrol.

#### F. ALAT

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Sduit injeksi, neraca, seperangkat alat untuk merebus, sonde, pipet, sentrifuge, spektrofotometer, pasteur pipette, eppendorf, tabung reaksi, ice bath dan Sep-Pak C<sub>18</sub> column.

#### G. BAHAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu larutan reagen untuk menentukan kadar MDA, plasma darah, putri malu (*Mimosa pudica L.*), CCl<sub>4</sub>, antikoagulan EDTA, aquades, posporic acid, polypropylene, dan methanol.

#### H. CARA KERJA

Jalannya penelitian ini yaitu:

1. Memilih subjek penelitian sesuai kriteria.
2. Membagi subjek penelitian menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif dan kelompok uji.
3. Masing-masing kelompok diambil darahnya untuk pemeriksaan kadar MDA awal.
4. Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung yang berisi Na<sub>2</sub> EDTA dan disimpan dalam suhu kamar kurang lebih 30 menit, kemudian disentrifuge (dipusingkan) dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit dan diambil supernatannya (serum). Kemudian serum dimasukkan ke dalam tabung eppendorf

dengan menggunakan pipet Pasteur dan disimpan pada suhu  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  sampai pemeriksaan kadar MDA dilakukan.

5. Penetapan aktifitas MDA serum dilakukan dengan Tiobarbiturat Acid (TBA).

Dalam suasana asam berbentuk kromogen berwarna merah muda. Jumlah kromogen MDA-TBA yang terbentuk tergantung pada jumlah deoksiribosa yang didegradasi. Semakin tinggi kadar deoksiribosa maka absorbansi kromogen MDA-TBA juga semakin tinggi. Absorbansi yang dibentuk kromogen MDA-TBA tersebut kemudian diukur dengan spektrofotometri.

6. Pemeriksaan kadar MDA dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- a. 750  $\mu\text{l}$  asam fosfor dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 13 ml polypropylene.
- b. 50  $\mu\text{l}$  TEP standar plasma kelompok uji dan kelompok kontrol ditambahkan pada tabung tersebut.
- c. Kemudian tambahkan 250 $\mu\text{l}$  dari 40mM TBA.
- d. Tambahkan 450 $\mu\text{l}$  aquades kemudian tabung tersebut ditutup rapat.
- e. Larutan ini dididihkan selama 1 jam, kemudian masukan ke dalam ice bath.
- f. Sampel yang telah dingin dicampur dan diletakkan pada kolom Sep-Pak  $\text{C}_{18}$ .
- g. Ekstrak tersebut dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm.

7. Sejumlah herba putri malu yang telah ditimbang sesuai dosis dimasukkan ke dalam panci. Kemudian daun direndam dengan air sebanyak 200 cc. Rebus daun putri malu sampai mendidih dalam waktu 15 menit sehingga tersisa 5ml.

Kemudian rebusan ini disaring dalam keadaan masih panas. Panci harus ditutup supaya air yang menguap tidak banyak hilang.

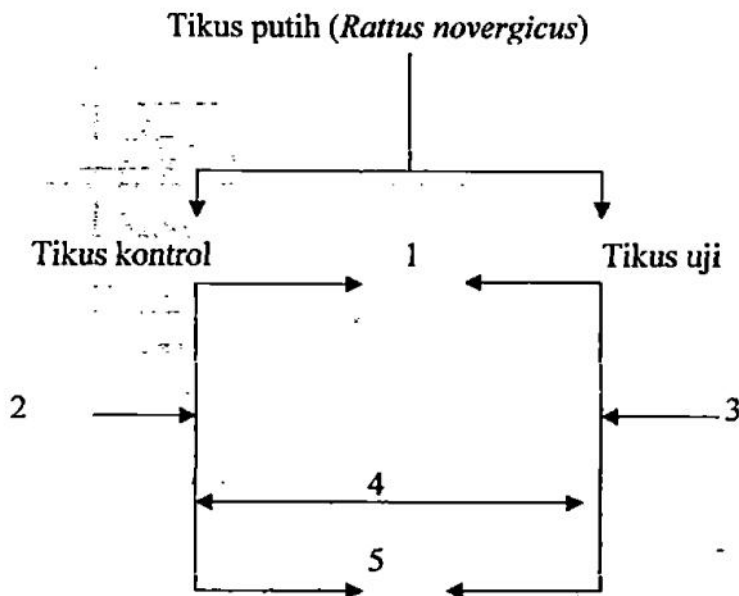
8. Kelompok uji diperlakukan seperti kelompok kontrol kecuali dalam hal yang diteliti yaitu kelompok uji diberi tambahan rebusan herba putri malu dengan dosis 1,890 g/kgBB selama 8 hari berturut-turut.

9. Pada hari ke 9 diinduksi  $\text{CCl}_4$  dengan dosis 1 ml.

10. Dua puluh empat jam setelah induksi, serum setiap subjek diambil kembali untuk dilakukan pemeriksaan kadar MDA.

11. Analisis data

I. Kerangka kerja



Keterangan :

1. Pemeriksaan kadar MDA awal.
2. Perlakuan tikus tanpa pemberian rebusan herba putri malu.
3. Perlakuan tikus dengan pemberian rebusa herba putri malu dengan dosis 1,890 g/kgBB setiap hari selama 8 hari berturut-turut.

4. Induksi  $\text{CCl}_4$  dengan dosis 1 ml pada hari ke 9
5. Pemeriksaan kadar MDA setelah 24 jam induksi  $\text{CCl}_4$

## J. ANALISIS DATA

Analisis data dilakukan dengan menggunakan seperangkat alat komputer dengan *pair t test* untuk menentukan kebermaknaan inter kelompok dan antar kelompok dengan *independent sample t test*.