

BAB III

METODE PENELITIAN

A. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan mengukur kadar malondialdehid pada tikus jantan. Tikus jantan (*Rattus norvegicus*) digunakan sebagai populasi pada penelitian ini, tikus yang digunakan berumur 2-3 bulan dengan bobot 100-200 gram. 30 ekor tikus dibagi dengan cara acak menjadi 6 kelompok, antara lain kelompok kontrol negatif, kontrol positif, kontrol normal (tanpa obat), dan kelompok pemberian ekstrak daun sungkai dengan tiga macam variasi dosis.

Kelompok I sebagai kelompok normal hanya diberi aquadest dan tidak diberi perlakuan apapun, kelompok II, III, IV, V, dan VI diberi aktivitas perenangannya dihari ke-1, kemudian kelompok kontrol negatif atau kelompok II diberi perlakuan berenang selama 55 menit pada hari ke-7, kelompok III (kontrol positif yang diberi vitamin C selama 7 hari), kelompok IV, V, dan VI diberi ekstrak daun sungkai selama 7 hari. Pengukuran kadar MDA dilakukan pada hari ke-7. Selanjutnya tikus di bius menggunakan cairan eter, darah yang akan digunakan diambil melalui jantung lalu di tempatkan pada tabung *EDTA*. Darah yang didapatkan, di sentrifugasi atau dipisahkan dengan kecepatan 3000 rpm selama 10menit. Jika sudah terpisah, plasma yang berwarna bening kekuningan pada lapisan atas diambil sebanyak 200 μ L ditambahkan 100 μ L trikloroasetat (TCA) 20%, 250 μ L HCl 1 N dan 100 μ L asam tiobarbiturat (TBA) 0,67% . Larutan dicampur secara homogen dengan dipanaskan di penangas air selama 10 menit. Apabila sudah dingin, larutan di sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm dan dengan waktu 10 menit. Filtrat yang berwarna pink diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 532 nm. Kadar MDA dihitung menggunakan kurva baku TEP dengan konsentrasi 5, 7, 11, 15, 19, dan 23 μ M.

B. SUBJEK DAN OBJEK PENELITIAN

Daun sungkai (*Peronema canescens* Jack.) didapatkan di kota Samarinda. Subjek pada penelitian ini menggunakan tikus jantan putih (*Rattus norvegicus*) yang sebelumnya di aklimatisasi selama 8 hari.

1. Kriteria inklusi :
 - a. Bobot tikus 100-200 g
 - b. Tikus jantan
 - c. Sehat dengan umur 2-3 bulan
2. Kriteria eksklusi :
 - a. Sakit selama masa aklimatisasi
 - b. Mati semasa penelitian

C. WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN

Penelitian ini berlangsung pada bulan Januari-Juni 2022 yang dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Kimia Bahan Alam, dan Laboratorium Kimia di Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

D. DEFINISI OPERASIONAL

1. Variabel Penelitian
 - a. Variabel Bebas yaitu dosis kombinasi ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canscens* Jack.).
 - b. Variabel Terikat efek pemberian ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* Jack.) terhadap kadar malondialdehid pada hewan uji tikus jantan.
 - c. Variabel Terkendali yaitu berat badan hewan uji, jenis hewan uji, usia, dan waktu pemberian ekstrak.
2. Definisi operasional
 - a. Malondialdehid adalah senyawa dialdehida yang merupakan produk akhir peroksidasi lipid dalam tubuh. MDA merupakan salah satu biomarker kerusakan oksidatif dan kadarnya diukur

dengan menggunakan metode *TBARS* (reaksi asam tiobarbiturat)

- b. Proses *TBARS* berdasar pada prinsip reaksi kondensasi (reaksi penggabungan) antara satu molekul MDA dan dua molekul TBA untuk menghasilkan produk yang stabil dalam bentuk adisi MDA-TBA. Laju reaksi tergantung pada suhu, pH, dan suhu (Khoubnasabjafari *et al*, 2015). Reaksi terjadi pada pH 2-3 dan memberi hasil warna merah muda yang dapat diperiksa pada panjang gelombang antara 532-535 nm menggunakan spektrofotometer Uv-Vis. Plasma, urin, atau jaringan dapat digunakan untuk menguji kadar MDA (Tangvarasittichai, 2009).
- c. Antioksidan ialah senyawa yang elektronnya bisa diberikan dengan percuma kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu sedikitpun serta dapat memutuskan reaksi berantai dari radikal bebas (Yuliarti, 2008).
- d. Radikal bebas merupakan molekul yang mempunyai sejumlah elektron yang tidak memiliki pasangan pada orbit terluarnya (Murray, 1996).

E. INSTRUMEN PENELITIAN

1. Bahan Penelitian

Sampel daun sungkai (*Peronema canescens Jack.*), tikus (*Rattus norvegicus*), vitamin C, etanol 96%, eter, asam tiobarbiturat (TBA) 0,67%, tetratoksiopropan (TEP), trikloroasetat (TCA) 20%, HCl dan air suling.

2. Alat Penelitian

Seperangkat alat maserasi, kandang tikus, sonde oral, alat bedah, timbangan analitik, alat-alat gelas, spuit, cawan porselen, kertas saring, *rotary evaporator*, spektrofotometri UV-Vis.

F. PROSEDUR PENELITIAN

1. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack.)

Sampel yang digunakan adalah daun sungkai, diperoleh dari Kota Samarinda. Daun sungkai segar yang sudah diambil dari pohonnya langsung dibersihkan dengan sortasi basah, dimana daun sungkai dipisahkan dari kotoran yang menempel dan bercampur pada daun. Kemudian daun sungkai dicuci dengan air mengalir hingga bersih dari kotoran yang menempel pada daun. Daun sungkai yang sudah dicuci kemudian dirajang untuk memudahkan proses pengeringan dan proses ekstraksi. Kemudian dilakukan sortasi kering untuk memisahkan kotoran yang masih ada tertinggal pada daun sungkai. Lalu simplisia kering daun sungkai ditimbang. Simplisia daun sungkai yang sudah kering kemudian dihaluskan, kemudian ke tahap proses maserasi yang dilakukan dengan merendam simplisia dengan etanol 96% dalam wadah dan diaduk selama 3-5 hari. Kemudian filtrat dipekatkan dengan *rotary vaccum evaporator*.

2. Adaptasi Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus jantan putih sehat yang berumur 2-3 bulan dengan berat 100-200 gram. Sebelum tikus jantan digunakan dalam penelitian ini, terlebih dahulu tikus diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium selama ± 8 hari. 30 ekor tikus jantan yang akan digunakan dibagi menjadi 6 kelompok dengan setiap kelompoknya terdapat 5 ekor tikus jantan. Tikus jantan diadaptasi dengan tetap diberi makan dan minum *ad libitum*.

3. Pembuatan *Animal Model* MDA

Tikus jantan yang sudah diadaptasi selama ± 8 hari kemudian diberi perlakuan perenangan selama 55 menit dengan begitu kadar MDA tikus akan meningkat. Kelompok tikus yang diberi perlakuan perenangan yaitu kelompok II, III, IV, V, dan VI. Kelompok I tidak diberi perlakuan apapun karena digunakan sebagai kelompok kontrol

(kelompok pembanding). Aktivitas fisik maksimal dilakukan untuk menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dengan sistem pertahanan antioksidan tubuh, yang biasa dikenal sebagai stres oksidatif.

4. Uji Efek Ekstrak Sungkai

Pada penelitian ini, pengujian terhadap efek ekstrak etanol daun sungkai untuk mengetahui efektivitas antioksidan terhadap pengurangan kadar MDA tikus jantan dilakukan dengan cara pemberian oral selama 7 hari berturut-turut pada kelompok IV, V, dan VI yang sudah diberikan aktivitas perenangan selama 55 menit pada hari ke-1 dan ditingkatkan kadar MDA pada hari ke-7. Darah diambil dari jantung lalu di sentrifugasi dan didapatkan filtrat berwarna merah muda yang kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 532 nm. Dengan penurunan kadar MDA pada tikus, ekstrak daun sungkai bisa menjadi penangkal radikal bebas penyebab stres oksidatif.

G. METODE PENGUMPULAN DATA

Metode pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental dengan cara mengambil darah hewan uji yang sudah di euthanasia melalui jantung kemudian sampel darah di sentrifugasi dengan waktu 10 menit dan kecepatan 3000 rpm. Ditambahkan TCA 20% dan TBA 0,67%. Ukur absorbansi filtrat merah muda pada panjang gelombang 530nm menggunakan spektrofotometer Uv-Vis. Tingkat MDA dihitung menggunakan kurva TEP standar pada konsentrasi 5, 7, 11, 15, 19, dan 23 μM .

H. TEKNIK ANALISIS DATA

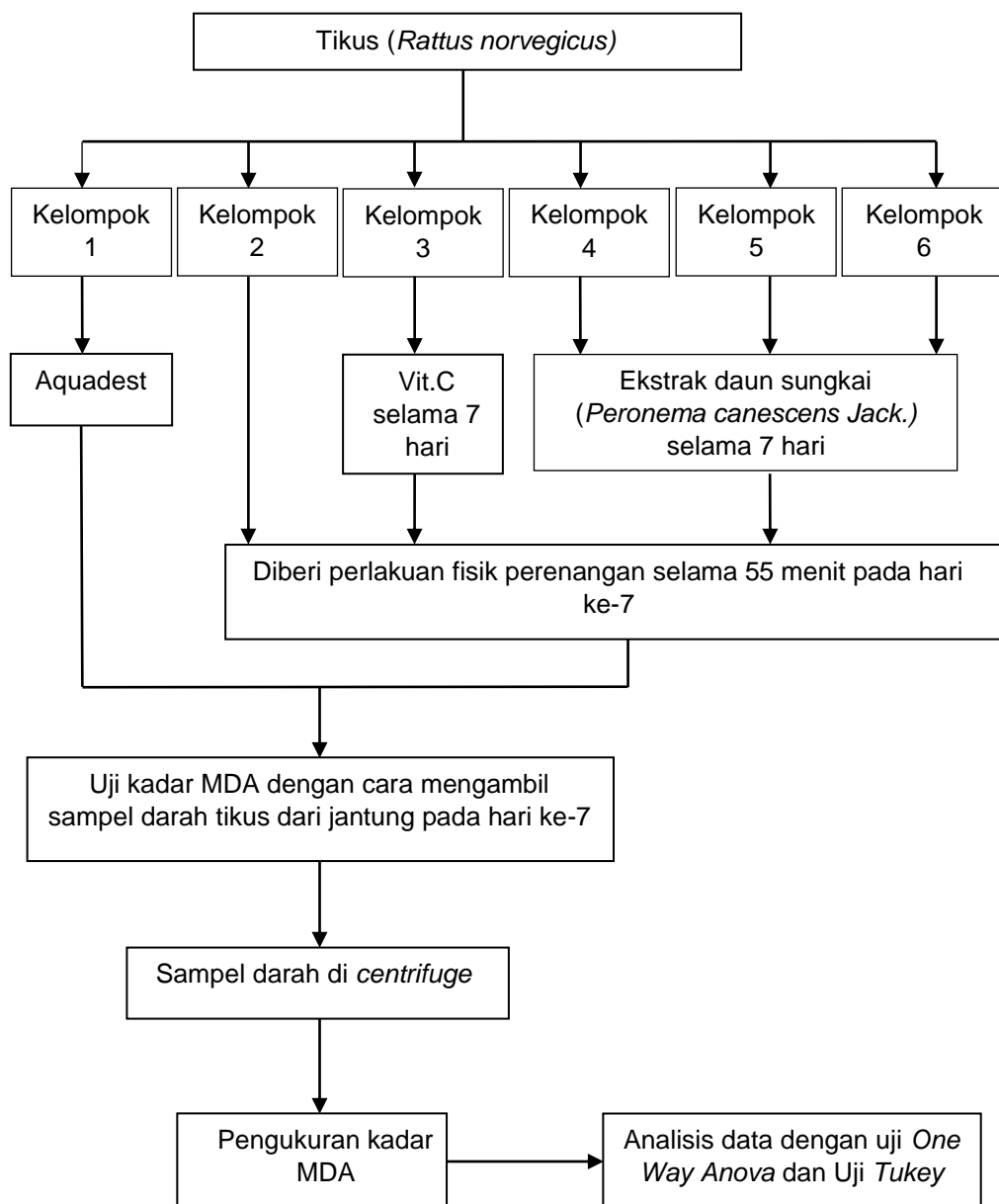
Data yang dikumpulkan pada penelitian ini yaitu analisa turunya kadar malondialdehid guna mengetahui terjadinya penurunan kadar malondialdehid pada kelompok kontrol dan kelompok dengan pemberian ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens Jack.*), menghitung kadar MDA dengan menggunakan kurva baku TEP, lalu

dilanjutkan dengan uji statistik menggunakan metode uji *One Way ANOVA* dan Uji *Tukey*.

I. ETIKA PENELITIAN

Penelitian ini akan diajukan kepada komisi Etik Penelitian Kesehatan Politeknik Kesehatan Kalimantan Timur.

J. ALUR JALANNYA PENELITIAN



Gambar 3.1 Alur Jalannya Penelitian

K. JADWAL PENELITIAN

Tabel 3. 1 Jadwal Penelitian

No.	Kegiatan	Januari	Februari	Maret	April	Mei	Juni
1.	Uji etika Penelitian						
2.	Pengumpulan sampel dan determinasi						
3.	Pembuatan siplisia dan ekstrak						
4.	Pengujian kadar MDA						
	a. Pemberian ekstrak daun sungkai						
	b. Pengambilan sampel darah dan pengujian kadar MDA						