

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian di bidang biokimia, kimia, dan farmakologi.

3.2 Tempat dan waktu penelitian

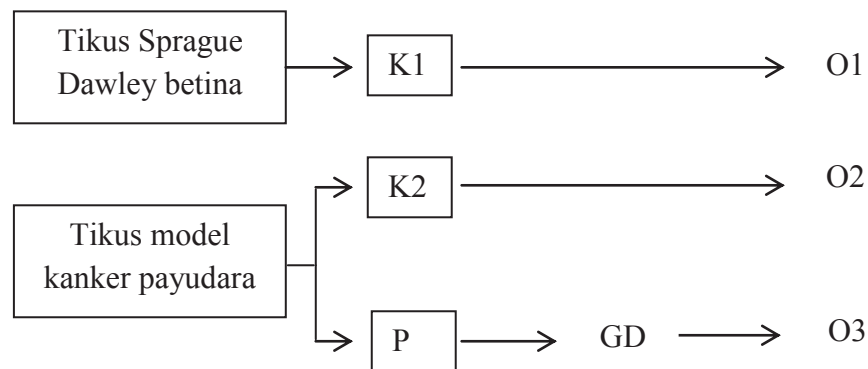
Penelitian ini dilaksanakan di beberapa tempat:

- a) Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu – Layanan Penelitian Pra Klinik Pengembangan Hewan Percobaan (LPPT-LP3HP) Universitas Gadjah Mada untuk pengadaan hewan coba, intervensi terhadap hewan coba, serta pengambilan sampel.
- b) Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada untuk pemeriksaan kadar MDA darah.
- c) Laboratorium Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk pembuatan ekstrak etanol daun *Gynura divaricata*.
- d) Laboratorium Kimia Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro untuk uji kualitatif kandungan dalam ekstrak etanol daun *Gynura divaricata*.
- e) Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro untuk uji determinasi tanaman *Gynura divaricata*.

Penelitian telah dilakukan selama 14 minggu selama bulan Februari-Mei 2016.

3.3 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan desain *post test only control group design* pada tikus. Penelitian ini menggunakan tiga kelompok, yaitu satu kelompok kontrol negatif (K1), satu kelompok kontrol positif (K2), dan satu kelompok perlakuan (P).



Skema rancangan penelitian

Keterangan:

K1 : Kelompok tikus Sprague Dawley® betina yang tidak diinduksi kanker payudara maupun diberikan ekstrak etanol daun dewa

K2 : Kelompok tikus model kanker payudara yang tidak mendapat ekstrak etanol daun *Gynura divaricata*

P : Kelompok tikus model kanker payudara yang mendapat ekstrak etanol daun *Gynura divaricata*

GD : Ekstrak daun *Gynura divaricata*

O : Pengukuran kadar MDA darah

3.4 Sampel

Sampel yang telah digunakan adalah tikus Sprague Dawley® betina normal dan kanker payudara (induksi DMBA) yang diperoleh dari LPPT-LP3HP

Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Sampel penelitian yang digunakan memiliki kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

3.4.1 Kriteria inklusi

- Tikus Sprague Dawley® betina
- Usia 13-17 minggu
- Tidak ada kelainan anatomis yang tampak
- Berat badan 180-230 gram

3.4.2 Kriteria eksklusi

Tidak ditemukan adanya benjolan setelah diinduksi

3.4.3 Kriteria drop out

Tikus Mati

3.4.4 Cara sampling

Sampel didapatkan dengan mengalokasikan kelompok berdasarkan cara *random sampling allocation*.

3.4.5 Besar sampel

Besar sampel menurut kriteria WHO dalam *Research Guideline for Evaluating The Safety and Efficacy of Herbal Medicines*, yaitu jumlah minimal 5 ekor tiap kelompok dengan cadangan untukantisipasi *drop out* sebanyak 10% (1 ekor). Terdapat dua kelompok kontrol dan satu kelompok perlakuan, sehingga berdasarkan ketentuan tersebut didapatkan jumlah sampel keseluruhan adalah 18 sampel.

3.5 Variabel penelitian

3.5.1 Variabel bebas

Ekstrak etanol daun *Gynura divaricata*

3.5.2 Variabel terikat

Kadar MDA darah

3.5.3 Variabel terkontrol

- Strain
- Usia
- Jenis kelamin
- Pakan
- Sistem kandang hewan coba

3.6 Definisi operasional

Tabel 2. Definisi operasional

| No | Variabel | Definisi Operasional dan Cara Pengukuran | Unit | Skala |
|----|--|--|---------|---------|
| 1 | Ekstrak etanol daun <i>Gynura divaricata</i> | Ekstrak berasal dari daun <i>Gynura divaricata</i> yang didapatkan dari PT. Jamu Jago Semarang, kemudian diekstraksi menggunakan pelarut etanol 45% dengan metode maserasi dan dilarutkan dalam PEG dengan konsentrasi larutan hasil | mg/kgBB | Nominal |

| pengenceran 50 mg/ml | | | | | | |
|----------------------|-------|-----|---|----------|--------|-------|
| 2 | Kadar | MDA | Masing-masing | kelompok | mmol/L | Rasio |
| | darah | | <p>dilakukan pengambilan darah 1 cc melalui pembuluh retroorbita dan disentrifuge menjadi plasma. Plasma kemudian diperiksa kadar MDA-nya mengikuti metode TBARS dalam pengukuran kadar MDA darah</p> | | | |

3.7 Cara pengumpulan data

3.7.1 Alat

1) Pembuatan ekstrak

- Kain lunak
- Erlenmeyer
- Pisau
- *Waterbath*
- Gelas ukur

2) Perawatan dan perlakuan hewan coba

- Kandang hewan
- Timbangan hewan
- Sonde lambung *syringe*
- Tabung penampung

3) Pemeriksaan kadar MDA darah

- Kapas alkohol
- Spuit
- Tabung penampung

3.7.2 Bahan

1) Pembuatan Ekstrak

- Daun *Gynura divaricata*
- Alkohol 45%
- Aquadest

2) Perawatan dan perlakuan hewan coba

- 18 ekor tikus Sprague Dawley® betina dengan masing-masing kelompok memiliki 1 ekor antisipasi *drop out* (5 normal, 10 tikus kanker payudara)
- Pakan dan minum standar
- Ekstrak etanol daun *Gynura divaricata*

3) Pemeriksaan kadar MDA darah

Darah vena/kapiler dari vena retroorbita

3.7.3 Jenis data

Pemeriksaan kadar MDA darah tikus Sprague Dawley® mendapatkan data primer. Data diperoleh melalui pembacaan hasil pemeriksaan laboratorium terhadap kadar MDA darah tikus Sprague Dawley® betina dari kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok kontrol.

3.7.4 Cara kerja

3.7.4.1 Pembuatan ekstrak etanol daun *Gynura divaricata*

Daun tanaman *Gynura divaricata* pada awalnya dibersihkan kemudian dipotong-potong. Setelah itu, potongan daun diletakkan dalam tabung erlenmeyer yang telah diisi larutan etanol 45%. Tahapan selanjutnya adalah maserasi selama 30 menit dengan menggoyang-goyangkan tabung erlenmeyer tersebut. Setelah selesai, didiamkan sebentar, lalu campuran tersebut disaring dengan kain lunak agar filtrat dan residu dapat dipisahkan. Tahapan berikutnya, filtrat diproses refluks selama 30 menit pada temperatur 90 °C. Ekstrak yang telah didapat kemudian dilarutkan dengan PEG dengan konsentrasi larutan hasil pengenceran 50 mg/ml.

3.7.4.2 Perlakuan pada hewan coba

Kelompok kontrol diberikan pakan dan minum standar sedangkan kelompok perlakuan diberikan pakan dan minum standar disertai pemberian ekstrak etanol daun *Gynura divaricata*. Dosis yang diberikan adalah 750 mg/kgBB selama 14 hari. Dosis ini dikonversi ke dalam dosis tikus dan didapatkan nilai konversi 0,018. Sebelum diberikan perlakuan, tikus harus selalu ditimbang untuk mendapatkan dosis yang tepat.

3.7.4.3 Pengambilan data

Pemeriksaan laboratorium dilakukan pada hari ke-15, tikus pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan perlakuan yang dipilih yang masih memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi untuk diambil darahnya pada vena retroorbitalis untuk pemeriksaan kadar MDA darah.

3.8 Alur Penelitian

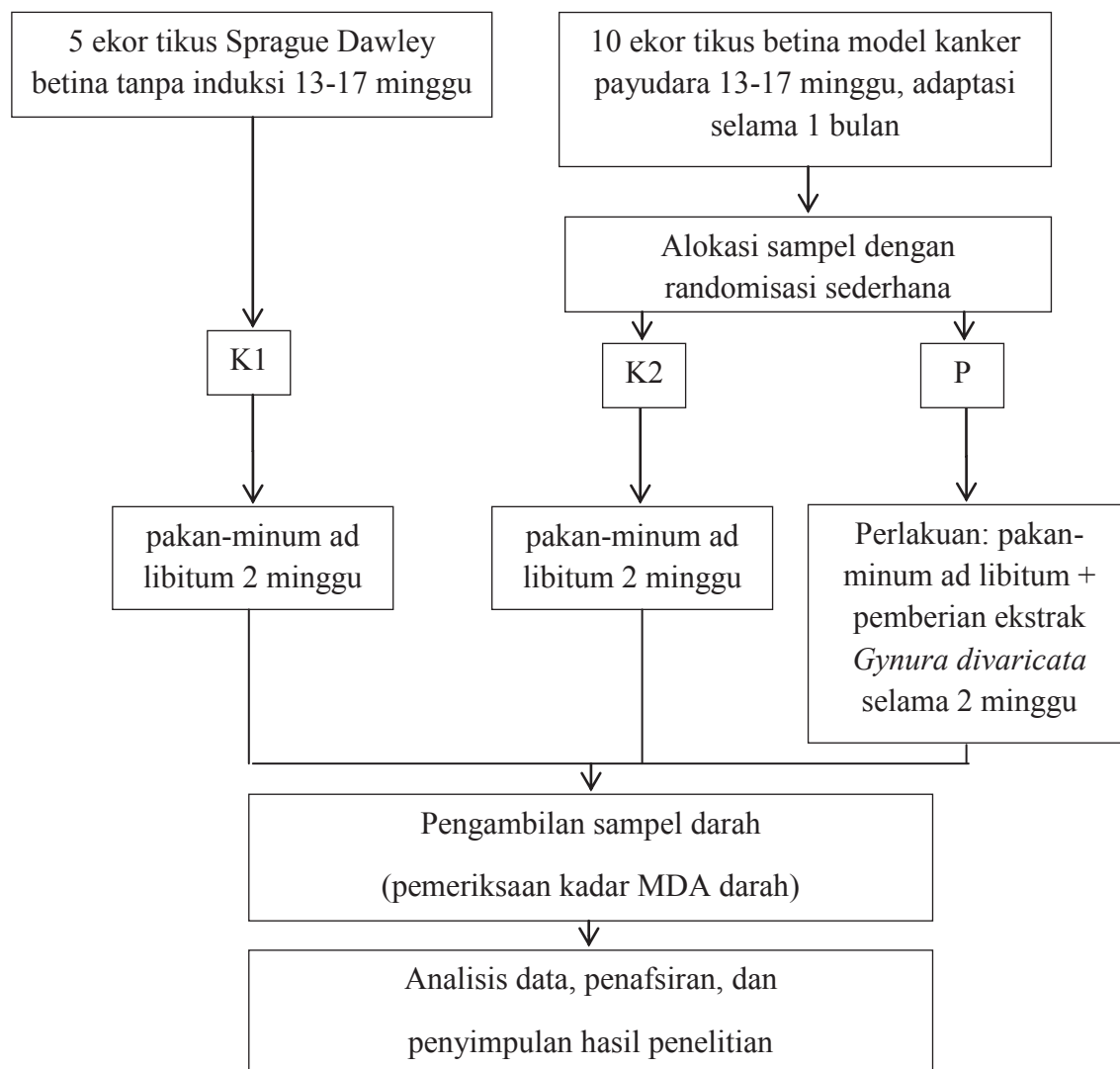


Diagram Alur Penelitian

3.9 Analisis data

Analisis data menggunakan program SPSS 21 *for Windows*®. Normalitas distribusi data diuji dengan uji Saphiro-Wilk karena jumlah sampel kurang dari 50 sampel. Kesamaan varians data diuji dengan uji varians (*Levene's test*). Perbedaan kadar MDA darah ketiga kelompok dibandingkan

