

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis/Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorik karena terdapat perlakuan dan kelompok kontrol pada hewan coba tikus wistar serta menggunakan randomisasi dengan menggunakan desain penelitian *Control Group Post Test Design* dimana pengujian dilakukan setelah intervensi. Pemilihan objek penelitian untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), hal ini dikarenakan hewan coba, tempat percobaan dan bahan penelitian lainnya bersifat homogen

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Sampel Penelitian ini menggunakan populasi hewan uji tikus putih galur wistar (*Rattus novergicus*) yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2.2 Pemilihan Sampel

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

1. Tikus jantan
2. Berat badan tikus 300-500 gram
3. Usia >8 minggu
4. Kondisi sehat (aktif, tidak cacat)

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

1. Bobot tikus menurun hingga berat badannya kurang dari 150 gram
2. Tikus mati dalam masa penelitian

Sampel yang digunakan adalah tikus jenis *Rattus norvegicus*. Jenis kelamin tikus yang digunakan adalah tikus jantan yang sehat karena pada tikus betina terdapat estrogen yang mempengaruhi metabolisme lemak dan kolesterol (Julia dkk., 2011).

4.2.3 Estimasi Besar Sampel

Jumlah replikasi (n) pada setiap perlakuan (p) dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut (Solimun, 2001) dengan $p=5$:

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

$$pn-p \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Dari perhitungan didapatkan $n \geq 4$, jadi dilakukan minimal 4 kali replikasi untuk masing-masing kelompok. Dalam penelitian ini digunakan 4 ekor tikus sebagai sampel untuk masing-masing kelompok sehingga besar sampel secara keseluruhan adalah 36 ekor tikus.

4.3 Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 2 bulan mulai bulan Februari sampai Maret 2012 di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas

Brawijaya. Pengukuran kadar *Malondialdehyde* paru tikus dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4 Variable Penelitian

A. Variable Bebas : Lama waktu paparan asap kendaraan bermotor

B. Variable Tergantung : Jumlah kadar *malondialdehyde* paru tikus

4.5 Bahan dan Alat / Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah:

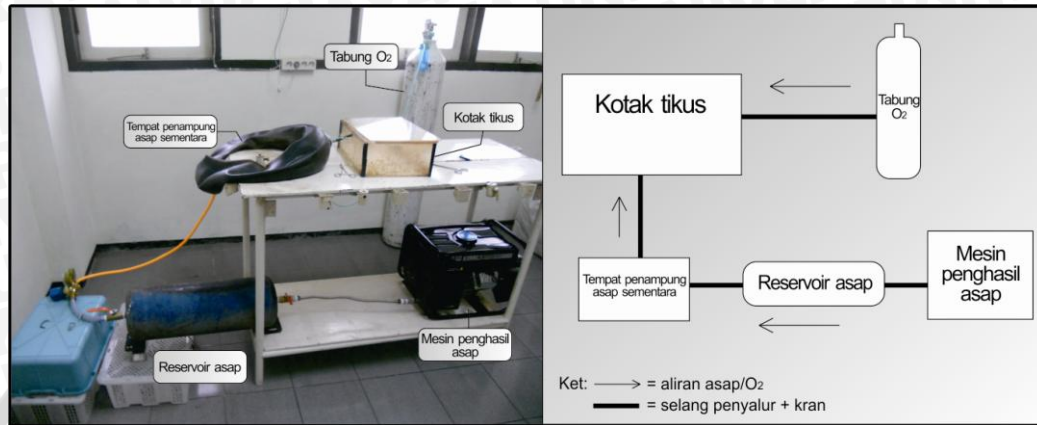
- a. Mesin untuk pemberian asap
Asap kendaraan bermotor yang dipaparkan berasal dari mesin yang sudah dimodifikasi .
 - b. Kacang tunggak yang telah diekstrak sehingga menghasilkan genistein.
 - c. Makanan tikus yang merupakan campuran comfeed PAR-S, Terigu, Air.
 - d. Air untuk mencuci *box smooking pump* serta minum tikus
- **Bahan pemeriksaan MDA paru**
0,15 gram paru tikus, buffer tris KCL pH 7,6, triton X 0,2 %, TCA (*Trichloroacetic-acid*) 100%, HCL 1 N, asam Na-thio barbiturat, dan aquabidest.

4.5.2 Alat/Instrumen Penelitian

- a. Mesin untuk pemberian asap kendaraan bermotor

Mesin untuk pemberian asap buatan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Terdiri atas kotak tempat pengasapan, mesin

dengan bahan bakar bensin (w : 1000w, PM : 0.127 gr/kwh), alat pengatur banyak sedikitnya asap, dan tabung oksigen (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Mesin untuk Pemberian Asap

- b. Alat pembuatan pakan hewan coba: timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, dan nampan.
- c. Alat untuk membuat ekstrak kacang tunggak
- d. Alat untuk pengambilan organ
- e. Alat Untuk Pemberiaan Ekstrak kacang tunggak : Spuit yang ujungnya dipasang suatu sonde yang dapat dimasukkan ke dalam mulut tikus wistar hingga mencapai esophagus bahkan sampai lambung.
- f. Alat pemeriksaan Kadar MDA paru : Alat yang dibutuhkan adalah termos es, timbangan mettler H31AR dengan kapasitas maksimal 160 gram dan ketelitian 0,1 gram, mortar, pipet, vortex, sentrifuse 2500 rpm, tabung reaksi, *waterbath* dengan suhu maksimal 100°C, glass woll, dan spektrofotometer dengan panjang gelombang 532 nm. Bahan-bahan yang dibutuhkan adalah homogenat paru tikus strain wistar, larutan TCA, larutan HCL 1 M dan Na-Thio.

4.6 Definisi Istilah/Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini adalah:

a. Hewan uji coba

Hewan coba tikus yang digunakan adalah tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 2,5-3 bulan dengan berat badan 150-200 gram. Tikus diperoleh dari Laboratorium Farmakologi FKUB. Tikus yang sudah disiapkan dibagi menjadi 9 kelompok dimana masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Penelitian menggunakan tikus ini juga dimintakan sertifikat layak etik penelitian menggunakan hewan coba.

b. Pemaparan Asap kendaraan bermotor

Pemaparan dengan menggunakan alat bantu mesin yang sudah dimodifikasi sehingga dapat menyalurkan asap hasil pembakaran ke dalam suatu kotak yang diisi tikus-tikus perlakuan

c. Lama waktu paparan asap kendaraan bermotor

pemaparan asap dilakukan setiap hari selama 1 bulan dengan menggunakan alat bantu mesin yang sudah dimodifikasi sehingga dapat menyalurkan asap hasil pembakaran bahan bakar bensin ke dalam kotak tempat tikus perlakuan berukuran 40x30 cm. Lama waktu paparan asap kendaraan bermotor dalam penelitian ini adalah lama mesin berbahan bakar bensin dalam memproduksi asap. Lama waktu ini merupakan variabel bebas yang mewakili kadar asap kendaraan bermotor. Semakin lama waktu mesin tersebut menyala, maka kadar asap yang dihasilkan semakin tinggi. Lama waktu pengeluaran asap dari mesin berbahan bakar bensin dalam penelitian ini adalah 2 menit, 3 menit,

dan 4 menit, kemudian mesin dimatikan dan asap yang terproduksi tetap dipaparkan pada tikus bersama oksigen murni untuk dihirup hingga 4 menit.

d. Jenis Kacang Tunggak

Kacang tunggak di beberapa daerah lebih dikenal dengan nama kacang tolo atau kacang dadap, kacang tunggak hampir terdapat di seluruh daerah di Indonesia. Kacang tunggak yang digunakan pada penelitian ini adalah kacang tunggak (KT) 6 yang diperoleh dari Balitkabi (Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian) Malang.

e. Ekstarak kacang tunggak

Diperoleh dari kacang tunggak KT 6 yang telah melalui proses ekstraksi metode Maserasi yang hasilnya kemudian diuapkan dari pelarutnya (metanol 96%) menggunakan rotary evaporator.

f. Kadar *melondialdehyde* (MDA) Paru

Hasil peroksida asam lemak yang dapat digunakan sebagai parameter pengukuran aktivitas radikal bebas didalam tubuh. MDA digunakan sebagai indikator pengukuran terjadinya stres oksidatif. Pengukuran MDA menggunakan metode *Thiobarbituric Acid (TBA) Test* yang dibaca menggunakan panjang gelombang 532 nm pada spektrofotometer/ UV.

4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.7.1 Pembuatan Ekstraksi Kacang Tunggak

Untuk mendapatkan kandungan zat aktif genistein dalam kacang tunggak diperlukan suatu proses pengekstraksian. Dalam penelitian ini dilakukan dengan metode Maserasi.

a. Bahan:

1. Bahan alam
2. Metanol 96% (pelarut)
3. Aquades
4. Pelarut etanol, bisa diganti dengan pelarut lain, misalnya metanol atau n-heksan

b. Alat:

- | | |
|-------------------------|--|
| 1. Oven | 9. Labu penampung etanol (1) |
| 2. Blender | 10. Pendingin spiral / rotary evaporator (1) |
| 3. Timbangan (1) | 11. Selang water pump |
| 4. Gelas Erlenmeyer (2) | 12. Water pump |
| 5. Corong gelas (1) | 13. Water bath |
| 6. Kertas saring (1) | 14. Vacum pump (1) |
| 7. Labu evaporator(1) | 15. Botol hasil ekstrak |
| 8. Evaporator (1) | |

c. Cara pembuatan Ekstrak Bahan:

1. Proses pengeringan
 - a. Cuci bersih bahan alam (sample basah) yang akan dikeringkan
 - b. Potong kecil-kecil
 - c. Lalu masukkan oven dengan suhu 40-60°C atau dengan panas matahari hingga kering (bebas kandungan air)
2. Proses ekstraksi
 - a. Setelah kering, haluskan dengan blender sampai halus
 - b. Timbang sebanyak 100 gram (sample kering)

- c. Masukkan 100 gram sample kering ke dalam gelas erlenmeyer ukuran ± 1 L
 - d. Kemudian rendam dengan etanol sampai volume 900 mL
 - e. Kocok sampai benar-benar tercampur (± 30 menit)
 - f. Diamkan 1 malam sampai mengendap
 - g. Ambil lapisan atas campuran etanol (pelarut) dengan zat aktif yang sudah tercampur (bisa dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring)
 - h. Lakukan proses perendaman ini sampai 3 kali
3. Proses evaporasi
- a. Masukkan dalam labu evaporasi 1 L
 - b. Pasang labu evaporasi pada evaporator
 - c. Isi water bath dengan air sampai penuh
 - d. Pasang semua rangkaian alat termasuk rotary evaporator, pemanas water bath (atur sampai 90°C atau sesuai dengan Titik Didih pelarut), sambungkan dengan aliran listrik
 - e. Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi
 - f. Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ sampai 2 jam untuk 1 labu) ± 900 mL
 - g. Hasil yang diperoleh kira-kira $\frac{1}{4}$ dari bahan alam kering
 - h. Masukkan hasil ekstraksi ke dalam botol plastik/kaca
 - i. Kemudian simpan dalam freezer

4.7.2 Proses Perlakuan pada Tikus Percobaan

1. Semua tikus dilihat umur dan ditimbang berat badannya. Dilakukan randomisasi dengan metode RAL agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan.
2. Tikus wistar dibagi menjadi 9 kelompok, 6 kelompok perlakuan dan 3 kelompok kontrol, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Pembagian kelompok dilakukan secara acak (*simple random sampling*). Pembagian kelompok adalah sebagai berikut :
 - a. Kelompok Normal (-), yaitu sampel dengan kondisi tanpa paparan asap mesin berbahan bakar bensin, tanpa pemberian oksigen, dan tanpa pemberian ekstrak kacang tunggak.
 - b. Kelompok (+) Oksigen, yaitu sampel dengan kondisi tanpa paparan asap mesin berbahan bakar bensin, diberikan oksigen 4 menit perhari.
 - c. Kelompok (+) G, yaitu sampel dengan kondisi tanpa paparan asap mesin berbahan bakar bensin, diberikan ekstrak kacang tunggak.
 - d. Kelompok $A_2O_4(-)G$, yaitu sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama 2 menit dan oksigen 4 menit perhari selama 4 minggu tanpa pemberian ekstrak kacang tunggak.
 - e. Kelompok $A_2O_4(+)G$, yaitu sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama 2 menit dan oksigen 4 menit perhari selama 4 minggu dengan pemberian ekstrak kacang tunggak.
 - f. Kelompok $A_3O_4(-)G$, yaitu sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama 3 menit dan oksigen 4 menit perhari selama 4 minggu tanpa pemberian ekstrak kacang tunggak.

- g. Kelompok $A_3O_4(+)$ G, yaitu sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama 3 menit dan oksigen 4 menit perhari selama 4 minggu dengan pemberian ekstrak kacang tunggak 2ml/hari.
- h. Kelompok $A_4O_4(-)$ G, yaitu sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama 4 menit dan oksigen 4 menit perhari selama 4 minggu tanpa pemberian ekstrak kacang tunggak.
- i. Kelompok $A_4O_4(+)$ G, yaitu sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama 4 menit dan oksigen 4 menit perhari selama 4 minggu dengan pemberian ekstrak kacang tunggak.

4.7.3 Persiapan Hewan Uji

- a. Tikus ditempatkan dalam kandang terpisah.
- b. Sebelum perlakuan, semua kelompok tikus percobaan diadaptasikan pada kondisi laboratorium tempat percobaan, kandang, waktu makan dan eksplorasi terhadap pakan tikus selama 7 hari. Tiap tikus diberikan pakan standar yang terdiri dari 66% PARS dan 33% terigu sejumlah 40 gram secara ad libitum.

4.7.4 Pemberian Ekstrak Kacang Tunggak pada Tikus

- **Alat** : S spuit dan Sonde
- **Bahan** : Ekstrak Kacang tunggak KT-6 dengan dosis 0,5 ml/kgBB di semua perlakuan.
- **Dasar Penentuan Dosis**

Penentuan dosis pemberian ekstrak kacang tunggak dilakukan berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Christina (2010), yang mengamati efek ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) terhadap kadar superoksida dismutase (SOD) serum tikus putih (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar yang Telah

Dioviarekatomi. Dari penelitian itu digunakan 3 macam dosis ekstrak kacang tunggak, yaitu 0,5 ml/kgBB, 2,5 ml/kgBB, dan 5 ml/kgBB. Akan tetapi, hasil penelitiannya menunjukkan bahwa pada peningkatan dosis 2,5 ml/kgBB dan 5 ml/kgBB justru mempunyai efek terbalik, yaitu makin menurunkan kadar SOD serum. Hal ini dimungkinkan oleh karena kemampuan ikatan genistein terhadap reseptor estrogen ER-b lima kali lebih kuat dibanding reseptor estrogen ER-a. Oleh karena itu, pada dosis efektif genistein akan lebih banyak berikatan dengan ER-b dibanding ER-a sehingga terjadi peningkatan kadar SOD. Namun, bila dosis ditingkatkan hingga melebihi dosis efektif, ER-b akan menjadi jenuh menjadikan genistein berikatan dengan ER-a dalam jumlah yang cukup untuk munculnya efek. Padahal dalam sel yang mengekspresikan kedua reseptor estrogen tersebut, kerja ER-a dan ER-b umumnya berlawanan. Jadi, dengan peningkatan dosis bisa membuat turunnya kadar SOD serum. Berdasarkan penelitian tersebut diatas maka pada penelitian ini kami mencoba hanya menggunakan 1 macam dosis yaitu dosis 0,5 ml/kgBB yang menurut penelitian diatas sangat efektif.

- **Cara Kerja:**

Setelah 1 bulan tikus yang telah diapapar oleh asap kendaraan bermotor diberikan ekstrak kacang tunggak melalui alat sonde sesuai dengan dosis yang ditetapkan. Sonde yang bersisi ekstrak kacang tunggak dimasukan melalui mulut tikus hingga mencapai lambung, kemudian larutan dikeluarkan dari sonde sehingga masuk tepat ke dalam lambung tikus.

4.7.5 Pemaparan Asap Kendaraan Bermotor

- **Bahan** : Bahan bakar mesin
- **Alat** :

Untuk pemaparan asap kendaraan bermotor, alat yang digunakan adalah pemompa asap kendaraan yang dibuat oleh Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Alat ini terdiri dari kotak tempat paparan, tabung gas O₂, mesin yang sudah dimodifikasi sebagai penghasil asap kendaraan, reservoir asap supaya tekanan dan suhu asap kendaraan yang dihasilkan tidak terlalu tinggi, serta tempat penampung asap kendaraan sebelum masuk kotak. Pada rangkaian peralatan ini pastinya juga terdapat selang penyalur O₂ dan asap kendaraan yang dihasilkan, dilengkapi dengan kran pembuka/penutupnya.

- **Cara Kerja:**

1. Tikus ditimbang berat badannya dengan neraca Ohaus sebelum pemaparan.
2. Tempat pemaparan dibersihkan dari kotoran dan asap.
3. Peralatan yang akan digunakan untuk pemaparan diperiksa terlebih dahulu dan dipastikan dapat berfungsi dengan baik.
4. Untuk kelompok perlakuan I, II, dan III, sebelum dilakukan pemaparan, tikus diberikan ekstrak kacang tunggak 30 menit sebelumnya.
5. Selanjutnya tiga ekor tikus (satu kelompok perlakuan) dimasukkan ke dalam kotak dan segera ditutup. Dalam penelitian ini, satu kelompok perlakuan dibagi menjadi 2 tahap pemaparan, masing-masing 3 ekor tikus.
6. Pemaparan asap kendaraan dilakukan dengan cara menyalakan mesin dan kran penyalur asap dan O₂ sesuai dengan waktu yang telah ditentukan untuk masing-masing kelompok perlakuan (hingga maksimal 4 menit).

7. Setelah itu mesin dan kran penyalur dimatikan, lalu tutup kotak dibuka dan tikus dipindahkan ke kandang semula.
8. Setiap pemaparan asap kendaraan berikutnya, kotak selalu dibersihkan lebih dahulu dari sisa asap kendaraan sebelumnya.
9. Tahap-tahap di atas diulangi untuk kelompok perlakuan berikutnya.

4.7.6 Pengambilan Sampel

Pada akhir minggu ke empat, tikus wistar semua kelompok dianestesi dengan eter per inhalasi. Kemudian dilakukan pembedahan pada tikus, dan dilakukan perfusi dengan PBS pH7,4 untuk membersihkan darah dari organ. Setelah paru berwarna putih, paru diambil. Bila tidak segera digunakan, paru dapat disimpan dalam botol film, yang telah dicuci dengan larutan HCL 10% dan dibilas air, berisi PBS pH 7,4, kemudian disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C.

4.7.7 Pemeriksaan MDA Paru

Setelah dilakukan pembedahan pada organ tikus, kemudian dilakukan penghisapan cairan pada paru tikus dengan kertas tissue, timbang dengan neraca statistik sebanyak 0,3 gram, kemudian gerus dengan mortal sampai homogen. Tambahkan buffer Tris KCL pH 7,4 sebanyak 3 cc kedalam mortal. Bagi homogenat tersebut kedalam dua tabung reaksi masing-masing 1cc, Dimana tabung I sebagai tes, dan tabung II sebagai kontrol.

Tambahkan triton X 0,2% yang berfungsi untuk memecah sel sebanyak 250 μ L kedalam kedua tabung, Kemudian Vortex hingga homogen. Tambahkan TCA 100% sebanyak 100 μ L kedalam kedua tabung, kemudian vortex hingga homogen. Tambahkan HCL 1N sebanyak 250 μ L kedalam kedua tabung,

kemudian Vortex hingga homogen. Ke dalam tabung I (Tes), tambahkan asam Na-thio barbiturate 10% sebanyak 100 μ L, kemudian vortex hingga homogen.

Panaskan kedua tabung didalam *water bath* dengan suhu 105°C Selama 20 menit, Kemudian angkat dan biarkan pada suhu kamar. Senrifuse kedua tabung dengan kecepatan 2000-3000 rpm selama 10 menit. Ambil supernatan dalam tabung dengan pipet, kemudian saring dengan kertas saring yang diletakkan pada *blue tip* yang telah dipotong ujungnya, pisahkan tes dan kontrol. Tambahkan aquabidest pada supernatan yang telah disaring hingga mencapai volume 3 cc, kemudian baca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532nm.

Prinsip metode *thiobarbituric acid* (TBA) dari Flower *et al.* (1973), yang dikembangkan oleh Laboratorium Farmakologi Universitas brawijaya adalah sebagai berikut :

1. Pengaruh asam dan panas mempercepat dekomposisi lemak peroksida untuk membentuk MDA.
2. MDA direaksikan dengan TBA membentuk warna, Perubahan warna diukur dengan spektrofotometer panjang gelombang tertentu. MDA yang merupakan produk skunder dari lipid peroksidasi akan bereaksi dengan *thiobarbituric acid* (TBA) pada suasana asam (pH 2-3) dengan temperature 97-100°C memberikan warna merah muda.

Cara kerja pemeriksaan MDA dengan *spektrofotometer* adalah sebagai berikut:

1. Penentuan panjang gelombang (λ), maksimum (nm)
2. Pembuatan kurva baku.
3. Lalu pengukuran kadar MDA pada sampel dengan satuan μ g/10 gr massa.

4.8 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data

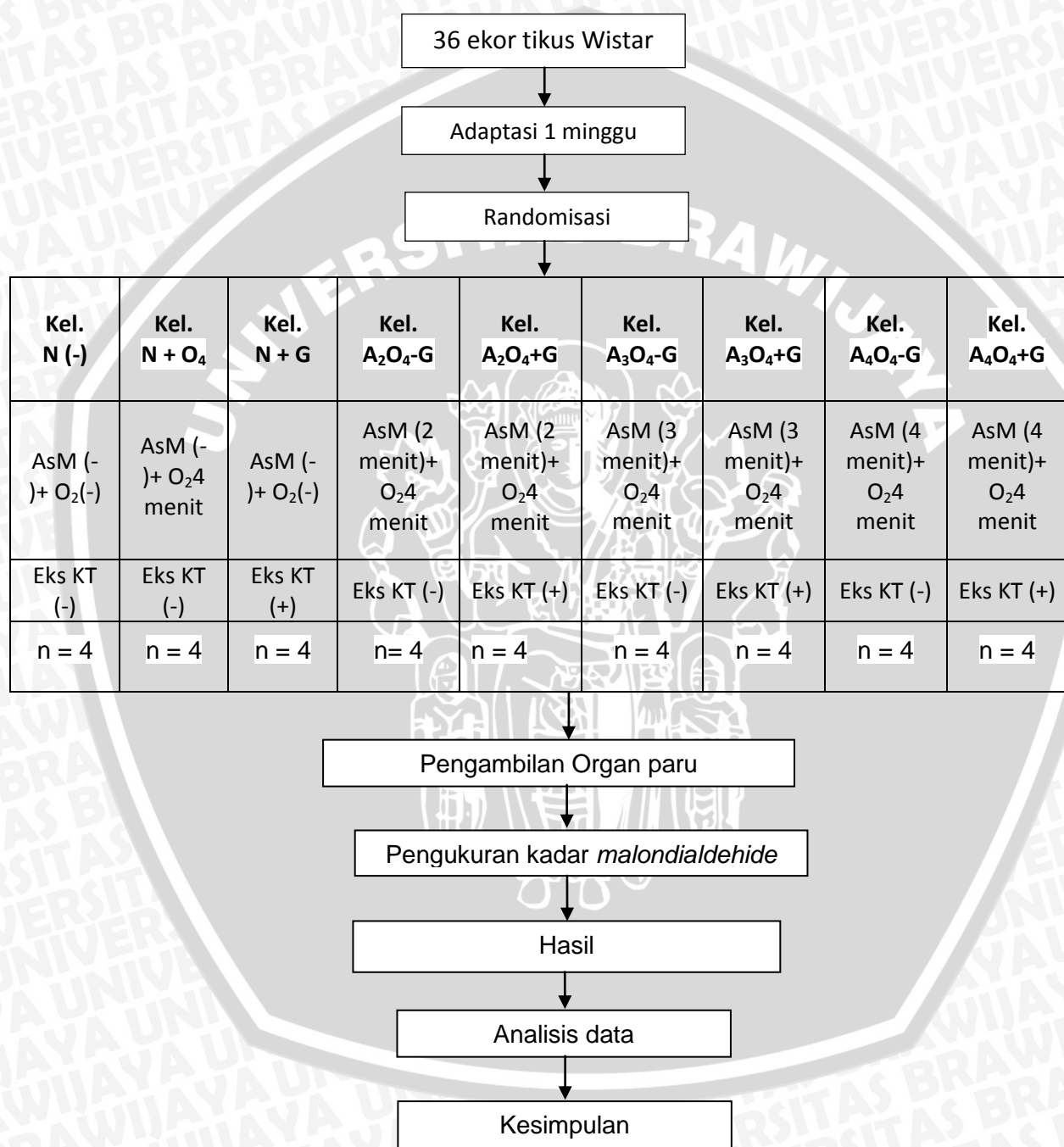
4.8.1 Pengumpulan Data

Data dalam penelitian ini dikumpulkan dari hasil evaluasi pada kelompok tikus Normal (-) , Normal (+) G , Normal (+) O₂ ,perlakuan I, II,III,IV,V dan VI. Setelah 1 bulan perlakuan dengan pemberian ekstrak kacang tunggak pada tikus yang terpapar asap kendaraan dilakukan evaluasi berupa pengukuran kadar *malondialdehyde* paru dan pencatatan hasil dari evaluasi.

4.8.2 Analisis Data

Analisis data hasil penelitian menggunakan metode Uji *kruskal wallis* dengan bantuan software *SPSS 17.00 for window*. Uji *kruskal wallis* dipilih sebagai metode analisis data karena dapat memperlihatkan ada tidaknya perbedaan kelompok-kelompok perlakuan dan membandingkan rata-rata masing-masing kelompok tersebut. Penelitian dianggap bermakna atau signifikan bila $p \leq 0,05$. Jika memang terdapat perbedaan antara kelompok perlakuan bermakna, dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney (post-hoc test)*. Hasil uji ini menunjukkan kelompok mana saja yang berbeda bermakna.

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Skema Alur Penelitian

Keterangan:
 AsM : Asap mesin
 Eks KT: Ekstrak kacang tunggak 0,5 mg/kgBB/hari