

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Metoda Penelitian

Penelitian ini menggunakan tikus putih sebagai media percobaan. Setiap rangkaian percobaan dilakukan pada individu yang sama sehingga pengaruh suhu tubuh dan faktor fisiologi lain dapat diabaikan. Selama percobaan, tikus putih dibius dengan eter agar kecepatan dan kedalaman pernafasan lebih teratur dan memberikan kondisi penghisapan CO dalam keadaan istirahat.

Sebelum pengamatan, tikus putih diasapi dengan 10 batang rokok kretek filter selama 15 menit dalam ruangan berkapasitas  $\pm$  12 L. Hal ini dimaksudkan untuk memberikan paparan gas CO cukup tinggi agar kandungan  $Hb(CO)_4$  dalam darah mudah diamati.

Kandungan  $Hb(CO)_4$  dianalisis dengan metoda sel mikrodifusi pada menit ke 15 hingga ke 480. Hasil pengukuran pada menit ke 480 digunakan sebagai data analisis untuk waktu tak hingga. Selanjutnya setiap harga  $Hb(CO)_4$  dibandingkan dengan pengukuran awal dan diplotkan terhadap variasi waktu. Kurva yang diperoleh akan menjelaskan bagaimana karakteristik perubahannya. Sementara kecepatan reaksi, orde reaksi, dan konstanta reaksi akan ditentukan dengan menggunakan persamaan kinetika yang sesuai.

### 3.2. Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Alat yang digunakan :

1. Sel mikrodifusi conway
2. Mikroburet ( skala terkecil = 0,005 mL dan 1 tetes setara dengan 0,001 mL )
3. Gelas ukur 10 ml
4. Tabung reaksi + sumbat karet
5. Labu ukur : 100 mL dan 1 L
6. Pipet tetes
7. Pipet volume : 10 mL dan 1 mL + ball pipet
8. Neraca listrik
9. Minifotometer + cuvet
10. Pipet Hb
11. Kandang percobaan berkapasitas  $\pm$  12 L
12. Plastik mika
13. Stoples
14. Pipa kapiler hematokrit
15. Beaker glass
16. Pencatat waktu
17. Corong gelas

#### 3.2.2 Bahan yang digunakan

1. Sampel : Tikus putih yang memiliki :
  - berat rata-rata : 183,4 gram
  - umur : 3 bulan
  - jenis kelamin : jantan
2. Eter

3. Rokok kretek filter merk "GG"
4. Kapas
5. Akuades
6. Sodium bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) p.a.
7. Kalium sianida (KCN) p.a.
8. Kalium ferrisianida ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) p.a.
9. Kalium hidroksida (KOH) p.a.
10. Asam klorida (HCl) 0,01 N
11. Palladium klorida ( $\text{PdCl}_2$ ) p.a.
12. Asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 5 N
13. Bromofenol biru p.a.
14. Petroleum jelly
15. Natrium oksalat ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ) teknis
16. Seng klorida ( $\text{ZnCl}_2$ ) teknis

### 3.3 Perlakuan

1. Melalui bagian alas kandang, 10 batang rokok dibakar hingga asap memenuhi ruangan kandang.
2. Tiga tikus dimasukkan secara bersamaan.
3. Tikus dibuat tak sadar dengan pembiusan eter selama pengasapan maupun pengamatan.
4. Tikus dikeluarkan dari kandang percobaan setelah 15 menit dalam pengasapan.
5. Selanjutnya dilakukan pengambilan darah melalui mata pada menit ke 15, 30, 45, 60, 75, 105 dan 180 setelah keluar dari kandang.
6. Darah sampel ditampung dalam tabung reaksi yang telah

diisi dengan  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ .

7. Tabung reaksi ditutup serapat mungkin dengan sumbat karet.
8. Percobaan diatas diulang kembali untuk tiga tikus lain, namun pengambilan darah dilakukan setelah menit ke 15, 90, 120, 180, 240, 300, dan 480.
9. Kemudian ditentukan kadar  $\text{Hb}(\text{CO})_4$ nya.

### 3.4 Prosedur Analisis

#### 3.4.1 Preparasi larutan

1. Preparasi Larutan Drabkin.

Sebanyak 1 gram  $\text{NaHCO}_3$  ditambah 0,05 gram KCN dan 0,2 gram  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  dilarutkan dengan akuades hingga 1 L.

2. Preparasi Larutan Palladium klorida.

Sebanyak 0,09 gram  $\text{PdCl}_2$ , 10 ml HCl 0,01 N dan 0,5 gram  $\text{ZnCl}_2$  dilarutkan dengan pemanasan. Setelah dingin, diencerkan dengan akuades hingga volume 100 mL.

3. Preparasi Larutan Bromofenol Biru 0,25 %

Sebanyak 0,25 miligram bromofenol biru dilarutkan dalam 100 mL akuades.

#### 3.4.2 Analisis Hb total ( $\text{Hb}$ , $\text{Hb}(\text{O}_2)_4$ , $\text{Hb}(\text{CO})_4$ ) darah dengan minifotometer

1. Disiapkan cuvet berdiameter 1 cm yang bersih dan kering.
2. Larutan drabkin sebanyak 2,5 mL dimasukkan ke dalam

cuvet tersebut.

3. Darah sebanyak 0,1 mL ditambahkan ke dalam cuvet.
4. Campuran dikocok hingga homogen.
5. Harga konsentrasi Hb dibaca pada minifotometer dan hasil pembacaan menunjukkan kadar Hb darah dalam gr/dL.

#### 3.4.3 Optimasi penambahan $H_2SO_4$ pekat dan waktu analisis CO dalam darah.

Untuk mengetahui penambahan  $H_2SO_4$  yang optimal maka waktu analisis dibuat tetap 1,5 jam. Sedangkan penambahan  $H_2SO_4$  bervariasi hingga tidak diperoleh perbedaan yang berarti. Dalam percobaan ini telah dicoba penambahan  $H_2SO_4$  sebanyak 0,05 mL; 0,1 mL; 0,2 mL; 0,3 mL; dan 0,4 mL. Demikian pula optimasi waktu analisis dilakukan pada penambahan  $H_2SO_4$  0,2 mL dengan variasi waktu pengerjaan 1 jam; 1,5 jam; 2 jam; 3 jam; 6 jam; dan 8 jam. Selanjutnya diamati banyaknya titran KOH 0,01 N yang diperlukan untuk menitrasinya.

#### 3.4.4 Analisis kadar CO dalam darah

1. Dipersiapkan sel mikrodifusi yang benar-benar bersih dan kering.
2. Sisi-sisi sel mikrodifusi diolesi dengan petroleum jelly sehingga antara bagian penutup dan wadah dapat tertutup dengan baik.
3. Larutan  $PdCl_2$  sebanyak 1 mL dimasukkan ke ruangan sel

- bagian dalam.
4. Pada ruangan sel bagian luar dimasukkan 0,2 mL  $H_2SO_4$  5 N.
  5. Sel ditutup dengan penutupnya.
  6. Sebanyak 1,5 mL darah diencerkan dengan akuades hingga 6 mL, selanjutnya larutan dibagi untuk 3 kali analisis.
  7. Larutan darah sebanyak 2 mL dimasukkan ke ruangan sel bagian luar melalui lubang pada penutup sel.
  8. Penutup sel segera ditutup.
  9. Sel mikrodifusi diputar kira-kira 10-20 kali dengan hati-hati.
  10. Sel mikrodifusi dibiarkan selama 1,5 jam.
  11. Setelah 1,5 jam, 0,8 mL larutan pada ruangan sel bagian dalam dipindahkan ke gelas kimia.
  12. Larutan ini dititrasi dengan larutan KOH 0,01 N menggunakan indikator bromofenol biru 0,25 %. Akhir titrasi ditunjukkan oleh warna ungu kemerah-merahan.
  13. Sebagai larutan blanko dilakukan titrasi terhadap 0,8 mL  $FdCl_2$ .
  14. Volume KOH 0,01 N yang diperlukan dalam titrasi ini diamati dan dicatat (15).